

Gdański Uniwersytet Medyczny

**HIPERGLIKEMIA I WARUNKI STRESU
OKSYDACYJNEGO A KOŃCOWE
PRODUKTY GLIKACJI BIAŁEK W
RÓŻNYCH STANACH KLINICZNYCH**

Aleksandra Śliwińska

Rozprawa doktorska

Promotor

Prof. dr hab. n. med. Wiesława Łysiak-Szydłowska

**Katedra Żywienia Klinicznego,
Zakład Dietetyki Ogólnej,
Wydział Nauk o Zdrowiu**

Gdańsk, 2009

*Składam gorące podziękowania mojemu promotorowi
Pani prof. dr hab. Wiesławie Łysiak-Szydłowskiej za opiekę naukową.
Dziękuję również serdecznie moim Współpracownikom,
Przyjaciółom i Rodzinie za wsparcie.*

SPIS TREŚCI

INDEKS SKRÓTÓW.....	5
WSTĘP.....	7
• Hiperglikemia.....	9
• Wolne rodniki.....	13
• Końcowe produkty glikacji białek.....	26
• Modyfikowana oksydatywnie albumina.....	32
CELE PRACY.....	34
MATERIAŁ I METODY.....	35
• Charakterystyka grup badanych.....	35
• Metody analityczne.....	38
▪ Oznaczenie końcowych produktów glikacji białek.....	38
▪ Oznaczanie modyfikowanej oksydatywnie albuminy.....	46
▪ Oznaczanie grup karbonylowych.....	52
• Analiza statystyczna.....	54
WYNIKI.....	55
• Grupa kontrolna.....	55
• Pacjenci z przewlekłą chorobą nerek	55
• Pacjenci z cukrzycą typu 2.....	59
• Pacjenci z chorobą niedokrwinną serca.....	63
• Pacjenci poddawani zabiegom operacyjnym.....	65
DYSKUSJA.....	71
• Końcowe produkty glikacji białek.....	72
▪ AGEs u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek.....	74
▪ AGEs pacjentów z cukrzycą typu 2.....	77
▪ AGEs u pacjentów poddawanych zabiegom operacyjnym.....	78

• Produkty peroksydacji białek.....	79
▪ GK u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek.....	81
▪ GK u pacjentów z cukrzycą typu 2.....	81
▪ GK u pacjentów poddawanych zabiegom operacyjnym.....	82
• Modyfikowana oksydatywnie albumina.....	83
▪ IMA w grupie kontrolnej.....	84
▪ IMA u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek.....	84
▪ IMA u pacjentów z cukrzycą typu 2.....	85
▪ IMA u pacjentów z chorobą niedokrwinną serca.....	86
▪ IMA u pacjentów poddawanych zabiegom operacyjnym.....	88
PODSUMOWANIE.....	90
WNIOSKI.....	91
STRESZCZENIE.....	92
ABSTRACT.....	94
PIŚMIENNICTWO.....	96
ANEKS.....	110

INDEKS SKRÓTÓW

- ACB – albumina wiążąca kobalt (Albumin Cobald Binding)
- ADA – Amerykańskie Towarzystwo Diabetologiczne
- AGEs – końcowe produkty glikacji białek (Advanced Glycation End products)
- ASA – Amerykańskie Towarzystwo Anestezjologów (American Society of Anesthesiologists)
- CK-MB – izoenzym sercowy kinazy kreatynowej
- CML – karboksymetylolizyna
- CPK – kinaza fosfokreatynowa
- cTnI – sercowa troponina I
- cTnT – sercowa troponina T
- DAG – diacyloglicerol
- DNPH – 2,4 – dinitrofenylhydrazyny
- DTT – 1,4-Dithio-DL-threitol (ditiotreitól)
- eNOS – endotelialna syntaza tlenu azotu
- ET-1 – endotelina
- FFI – 2-furylo-4(5)-(2-furanylo)1-H-imidazol
- GFR – współczynnik przesączania kłębuszkowego (Glomerular Filtration Rat)
- GK – grupy karbonyłowe - produkty peroksydacji białek
- GSH – glutation
- HbA1C – glikowana hemoglobina
- IL-1 – interleukina 1
- IL-6 – interleukina 6
- IMA – modyfikowana oksydatywnie albumina (Ischemia Modified Albumin)
- Myc – mioglobina - marker martwicy miokardium
- PAI-1 – inhibitor 1 aktywatora plazminogenu
- PTCA – śródnaczyniowa angioplastyka naczyń wieńcowych (przezskórna rewaskularyzacja mięśnia sercowego; Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty)
- RAGE – receptory końcowych produktów glikacji białek
- ROS – reaktywne formy tlenu
- SD – odchylenie standardowe

SOD – dysmutaza ponadtlenkowa

TF – czynnik tkankowy

TNF alfa – czynnik martwicy nowotworów

VCAM – czynnik adhezji

WHO – Międzynarodowa Organizacja Zdrowia

WZ – błąd względny

WSTĘP

Cukrzyca jest chorobą znaną od tysiącleci, a jej pierwsze opisy sięgają czasów starożytnych. Jednak jeszcze sto lat temu cukrzyca należała do rzadkich schorzeń. Obecnie natomiast stanowi olbrzymi problem zdrowotny charakteryzujący społeczeństwa wysoko uprzemysłowione. Cukrzyca, według definicji podanej przez Amerykańskie Towarzystwo Diabetologiczne (ADA) (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997), jest to grupa chorób metabolicznych, charakteryzujących się hiperglikemią, wynikającą z defektu dotyczącego wydzielania bądź działania insuliny lub z istnienia obu zaburzeń jednocześnie. Przewlekłe utrzymujący się podwyższony poziom cukru we krwi prowadzi do uszkodzenia oraz nieprawidłowej funkcji wielu narządów - zwłaszcza serca, naczyń krwionośnych, nerek, nerwów, narządu wzroku. Większość przypadków cukrzycy (ok.85-90%) to cukrzyca typu 2, która dotyczy populacji ludzi dorosłych. Cukrzyca typu 2, ze względu na gwałtowny wzrost zachorowalności jest uznawana za epidemię XXI wieku.

Przytaczając kolejną definicję, według Międzynarodowej Organizacji Zdrowia (WHO) (Alberti, Zimmet, 1998) określenie "cukrzyca" odnosi się do schorzenia metabolicznego o różnorodnej etiologii, charakteryzującego się przewlekłą hiperglikemią z zaburzeniami metabolizmu węglowodanów, tłuszczów i białek na skutek defektu wydzielania i (lub) działania insuliny.

Skutki cukrzycy obejmują przewlekłe uszkodzenie, dysfunkcję i niewydolność różnych narządów. Cukrzyca może się ujawniać charakterystycznymi objawami, takimi jak wzmożone pragnienie, wielomocz, nieostre widzenie i utrata masy ciała. W najcięższych postaciach choroby może się rozwinąć kwasica ketonowa lub nieketonowy stan hiperosmolarny doprowadzające do senności, śpiączki, a przy braku skutecznego leczenia - do zgonu. Często objawy są niezbyt nasilone lub nieobecne, a hiperglikemia w stopniu wystarczającym do spowodowania zmian morfologicznych i czynnościowych występuje na długo przed rozpoznaniem choroby. Do odległych następstw cukrzycy należą takie postępujące powikłania, jak: retinopatia mogąca doprowadzić do ślepoty; nefropatia, która może spowodować niewydolność nerek, oraz neuropatia, z którą się wiąże ryzyko owrzodzeń stóp, amputacji, rozwoju stawów Charcota oraz

dysfunkcji nerwowego układu autonomicznego, objawiającej się m.in. zaburzeniami funkcji seksualnych. Osoby z cukrzycą są obciążone zwiększonym ryzykiem choroby wieńcowej oraz miażdżycy tętnic obwodowych i mózgowych.

Cukrzyca jako choroba metaboliczna, której istotę stanowi bezwzględny lub względny niedobór insuliny bądź zmniejszenie wrażliwości tkanek na ten hormon (insulinooporność) ma również powiązanie z obecnością wolnych rodników w organizmie (Thompson i in., 1995). Istnieją dowody wskazujące, że stres oksydacyjny odgrywa istotną rolę w etiopatogenezie powikłań cukrzycowych, a mikroangiopatia cukrzycowa jest związana ze wzrostem stężenia wolnych rodników indukujących uszkodzenia oksydacyjne (Sinclair i in., 1991).

Cukrzycę uważa się za niezależny czynnik ryzyka choroby niedokrwiennej serca. Na ten czynnik składają się:

- Czynniki zagrożenia miażdżycą specyficzne dla cukrzycy: insulinooporność, dyslipidemia, hiperproinsulinemia, hiperinsulinomia, hiperglikemia, nasiloną glikacja białek, stres oksydacyjny.
- Zespoły aterogenne zależne od cukrzycy lub z nią skojarzone: otyłość trzewna, nadciśnienie tętnicze, zaburzenia krzepnięcia i fibrynolizy (trombofilia cukrzycowa), endoteliopatia, zespół polimetaboliczny, nefropatia cukrzycowa, neuropatia autonomiczna sercowo – naczyniowa.
- Czynniki genetyczne: wywiad rodzinny w kierunku chorób krążenia, płęć (Czech i in., 2001).

Insulinooporność znacząco wpływa na rozwój miażdżycy zwłaszcza w cukrzycy typu 2. Jej wpływ związany jest z zaburzeniami metabolizmu glukozy, lipidów, białek, jak również zaburzeniami proliferacji i różnicowania komórek oraz czynności śródbłonna. Insulinooporność ogranicza zużycie glukozy w mięśniach szkieletowych, nasila glukoneogenezę i zmniejsza syntezę glikogenu w wątrobie, przyczyniając się do przewlekłej hiperglikemii.

HIPERGLIKEMIA

Hiperglikemia to stan, w którym dochodzi do wzrostu poziomu glukozy we krwi ponad poziom prawidłowy. Hiperglikemia zwykle nie jest niebezpieczna, jeżeli podwyższenie poziomu cukru we krwi trwa krótko np. w wyniku reakcji organizmu na bodźce stresowe. Bardzo wysokie poziomy cukru mogą być przyczyną stanu zagrożenia życia, jeżeli nie są rozpoznane i prawidłowo leczone. Przedłużone okresy nawet umiarkowanie podwyższonego poziomu cukru mogą prowadzić do poważnych powikłań cukrzycy. Przy podwyższonym lub wysokim stężeniu glukozy we krwi obserwuje się również obecność glukozy w moczu (glukozuria), może także występować kwasica ketonowa (*diabetic ketoacidosis*) objawiająca się obecnością ciał ketonowych w moczu (ketonuria). Stany hiperglikemiczne objawiają się zazwyczaj: uczuciem pragnienia, sennością, apatią, ogólnym zmęczeniem, płytkim oddechem, wymiotami, bólami głowy i w ostatnim stadium śpiączką.

Hiperglikemia jest również fizjologiczną reakcją na stres. Odpowiedzią organizmu na stres jest aktywacja osi neuroendokrynnych, a także uwalnianie szeregu cytokin i czynników humoralnych, które wpływają na procesy wewnątrzkomórkowe. Hiperglikemia stresu i towarzysząca jej bardzo często insulinooporność występują powszechnie u pacjentów w ciężkim stanie klinicznym, po ciężkich urazach, operacjach, rozległych oparzeniach, przeszczepach i generalnie u pacjentów wymagających przebywania na oddziale intensywnej terapii. Istnieją dane wskazujące, że intensywna insulinoterapia prowadząca do normoglikemii poprawia rokowanie u pacjentów w stanach krytycznych (Wawrusiewicz-Kuryłonek, Górka, 2007).

Hiperglikemię uważa się za pierwotny czynnik odpowiedzialny za zmiany mikrokrążeniowe u chorych z cukrzycą (Baynes, Thorpe, 1999). Nie są jednak do końca poznane biochemiczne mechanizmy molekularne toksycznego działania wysokich stężeń glukozy na komórki endotelialne. Uważa się, że wysokie stężenie glukozy (hiperglikemia) indukuje stres oksydacyjny w komórkach i generuje powstanie reaktywnych form tlenu (ROS) (Baynes, Thorpe, 1999; Bayraktutan, 2002).

Procesy oksydacyjno-redukcyjne komórki, które są podstawą funkcjonowania łańcucha oddechowego, odpowiedzialne są za wytworzenie niezbędnej dla organizmu energii. Wolne rodniki stanowią niepożądane produkty uboczne reakcji oksydacyjno-redukcyjnych, natomiast bariera antyoksydacyjna w postaci antyoksydantów zabezpiecza organizm przed ich szkodliwym działaniem, w ten sposób zostaje zachowana równowaga pomiędzy powstawaniem a rozpadem wolnych rodników.

Zjawiska patologiczne takie jak: hiperglikemia, niedotlenienie, stany zapalne, zaburzają prawidłowy przebieg procesów oksydacyjno-redukcyjnych, prowadząc do nadprodukcji wolnych rodników i generacji stresu oksydacyjnego. W sytuacji nadmiaru wolnych rodników, działanie układu antyoksydacyjnego nie zapewnia wystarczającej ich eliminacji (Wardman, Candeias, 1996).

Wysokie stężenia glukozy prowadzą do zwiększenia stężeń równoważników redukcyjnych NADH i FADH₂ wewnątrz mitochondriów, poprzez zwiększenie ich wychwytu z cytoplazmy przez mitochondrialne mostki oksydacyjno – redukcyjne lub przez wychwyt pirogronianu przy udziale specyficznego przENOŚnika. Wysokie stężenie równoważników redukcyjnych w macierzy mitochondrium, zwiększa redukcję nośników elektronów w łańcuchu oddechowym, prowadząc do zwiększenia produkcji reaktywnych form tlenu (Greek i in., 2004; Zoratti i in., 2005).

W stanach hiperglikemicznych dochodzi również do zwiększenia stężenia jonów wapnia w komórce na skutek depolaryzacji błony komórkowej. Prowadzi to do aktywacji fosfolipazy A₂, która katalizuje następnie hydrolizę fosfolipidów błony komórkowej, uwalniając kwas arachidonowy generujący bezpośrednio wolne rodniki. Aktywacji ulega też oksydaza ksantynowa oraz syntaza tlenu azotu. Hiperglikemia powoduje generację wolnych rodników poprzez aktywację NAD(P)H oksydazy. Dodatkowo stymuluje syntezę *de novo* diacyloglicerolu (DAG), który aktywuje kinazę białkową C. Kinaza białkowa C indukuje zaś ekspresję genu i białka endotelialnej syntazy tlenu azotu (eNOS). Syntaza tlenu azotu w zależności od ilości kofaktora, substratu, prowadzi do syntezy wolnych rodników tj.: tlenu azotu, anionorodnika ponadtlenkowego (Cosentino i in.,

1997; Bayraktutan, 2002; Cosentino i in., 2003; Inoguchi i in., 2003; Talior i in., 2005).

Wszelkie wahania stężenia glukozy we krwi prowadzą do jej zaburzeń wewnątrzkomórkowego transportu i metabolizmu (Kaiser i in., 1992). W obrębie komórek przemiana glukozy zachodzi przy udziale kilku szlaków metabolicznych (tor glikolityczny, pentozowy, heksozaminowy, polioliowy). W szlaku polioliowym glukoza pod wpływem reduktazy aldozowej, ulega przemianie w sorbitol, a ten pod wpływem dehydrogenazy sorbitolu we fruktozę (Giugliano i in., 1996; Nishikawa i in., 2000). Powstanie sorbitolu zużywa NADPH. Zmniejszenie stężenia NADPH w komórce, obniża aktywność reduktazy glutationowej i syntazy tlenu azotu nasilając stres oksydacyjny (Bayraktutan, 2002).

Końcowe produkty glikacji białek AGEs, jako związki o wysokiej reaktywności, powstające w wyniku długiej ekspozycji białek na wysokie stężenie glukozy (hiperglikemia), generują reaktywne formy tlenu bezpośrednio bądź pośrednio przez aktywację NAD(P)H oksydazy (Giugliano i in., 1996; Nishikawa i in., 2000). Odpowiedzialne są za migrację monocytów, wytwarzanie cytokin i czynników wzrostu (Wautier i in., 1994).

Podsumowując, hiperglikemia indukuje stres oksydacyjny, generując powstawanie reaktywnych form tlenu, zwiększa metabolizm komórki, nasila przemiany szlaku polioliowego, powstawanie końcowych produktów glikacji białek (AGEs), aktywuje kinazę białkową C (CPK). Aktywacja tych wszystkich procesów jest ze sobą ściśle związana i przebiega na zasadzie sprzężeń zwrotnych (Giugliano i in., 1996).

Hiperglikemię uważa się za najistotniejszy czynnik ryzyka makroangiopatii w cukrzycy typu 2. Inne czynniki takie jak insulinooporność, wtórny hiperinsulinizm rzeczywiście przyspieszają miażdżycę, ale przy rozpoznaniu cukrzycy nie zwiększają ryzyka powikłań o charakterze makroangiopatii (Adler, 1999). Przewlekła hiperglikemia powoduje pobudzenie glikoprotein adhezyjnych na płytkach krwi oraz wydzielanie przez nie czynników mitogennych. Adhezji i agregacji płytek sprzyja również uszkodzenie śródbłonna. Hiperglikemia

zwiększa stężenie inhibitora aktywatora tkankowego plazminogenu (PAI-1) oraz aktywuje szlak diacyloglicerol-kinaza białkowa C w komórkach śródbłonna i w mięśniu sercowym, przyczyniając się jednocześnie do stymulacji czynników wzrostowych (Kozek, 2002).

Hiperglikemia zmienia strukturę tętnic powodując ich dysfunkcję na drodze wielu mechanizmów. Nasila nieenzymatyczną glikację różnych struktur zewnątrz – i wewnątrzkomórkowych, które nie ulegają dysocjacji, ale są na stałe gromadzone w ścianie naczyń. Między innymi dzieje się tak z końcowymi produktami glikacji białek (AGEs). AGEs inaktywują endogenne tlenki azotu i pobudzają produkcję endoteliny-1 odpowiedzialnej za skurcz naczyń (Kaiser i in., 1992).

Hiperglikemia sprzyja również uwalnianiu wolnych rodników, które uszkodzają śródbłonek naczyniowy. Zwiększona produkcja nadtlenków wynika z autooksydacji glukozy jak i z osłabienia aktywności enzymów antyoksydacyjnych takich jak dysmutaza ponadtlenkowa czy katalaza.

Hiperglikemia stanowi zasadniczą przyczynę powikłań cukrzycy. U chorych na cukrzycę stan dobrego wyrównania metabolicznego nie zabezpiecza jednak w pełni przed rozwojem powikłań o charakterze makroangiopatii. Nie są znane do końca mechanizmy łączące hiperglikemię z zaburzeniami funkcji i struktury ściany naczyniowej. Pod wpływem zwiększonych stężeń glukozy zmieniają się właściwości wielu komórek, głównie śródbłonna i komórek morfotycznych krwi: granulocytów obojętnochłonnych, monocytów, płytek krwi.

WOLNE RODNIKI

Termin „reaktywne formy tlenu” obejmuje zarówno wolne rodniki jak i inne toksyczne związki tlenu charakteryzujące się silnymi właściwościami utleniającymi, np. nadtlenek wodoru, tlen singletowy, kwas podchlorawy, tlenek azotu, dwutlenek azotu i inne. Określenie wolne rodniki dotyczy atomów, grup atomów lub cząsteczek zdolnych do samodzielnego istnienia i posiadających jeden lub więcej niesparowanych elektronów na zewnętrznej orbicie (Halliwell, 1984; Halliwell, 1993). Reaktywne formy tlenu są generowane w organizmach żywych o metabolizmie tlenowym, zarówno podczas prawidłowo przebiegających procesów metabolicznych, jak również w wyniku oddziaływania na organizm czynników środowiskowych takich jak: promieniowanie jonizujące, nadfioletowe, ultradźwięki, ksenobiotyki itp. (Schacter, 1986).

Prawidłowe funkcjonowanie organizmu zależy od zaopatrzenia energetycznego komórki, związanego z odpowiednią podażą tlenu oraz substratów energetycznych. Energia wytwarzana jest w reakcjach metabolicznych obejmujących procesy utlenienia i redukcji. Większość związków wysokoenergetycznych organizmy tlenowe uzyskują w czasie kontrolowanej, czteroelektronowej redukcji tlenu do wody, przy czym 98% tlenu zużywane jest w mitochondriach. (Grisham, Mc Cord, 1986; Bast, Goris, 1989). Paradoksalnie tlen jako podstawowy czynnik utrzymujący przy życiu organizmy tlenowe, w przypadku nadmiaru lub nieprawidłowego metabolizmu może być toksyczny dla ustroju (Grisham, Mc Cord, 1986). Przebywanie organizmów tlenowych w atmosferze o podwyższonej zawartości tlenu prowadzi do zahamowania aktywności np. dehydratazy dihydroksykwasów i pirofosfokinazy 5-fosforybozowej, zwiększa częstość mutacji i uszkodzeń błony komórkowej (Cross i in., 1987).

Człowiek, podobnie jak inne organizmy tlenowe, potrafi wykorzystać tlen bez szkody dla siebie. Równoległe z wykształceniem łańcuchów transportu elektronów i innych systemów enzymatycznych umożliwiających zużywanie tlenu, organizmy te wyznaczyły układy antyoksydacyjne (Halliwell, 1993). W

procesach zużywania tlenu, 2-5% O₂ nie ulega redukcji czteroелеktrodowej, lecz przekształceniu w tak zwane aktywne formy tlenu (Kolowca, 1993).

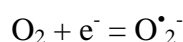
Najliczniej występujące reaktywne formy tlenu w organizmach ludzi i zwierząt to: rodnik ponadtlenkowy (O₂^{•-}), rodnik wodorotlenowy (•OH), tlen singletowy ¹O₂, nadtlenek wodoru (H₂O₂), kwas podchlorawy HClO i rodniki organiczne (LOO•, LO•, L•), rodnik tlenku azotu i dwutlenku azotu NO•, NO₂.

Wolne rodniki są niebezpieczne ze względu na swoją wysoką i niespecyficzną reaktywność; te właściwości umożliwiają wolnym rodnikom zapoczątkowanie licznych reakcji łańcuchowych prowadząc np. do peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (Esterbauer i in., 1991; Halliwell, 1993). Wolne rodniki stanowią, więc znaczący czynnik uszkadzający komórki.

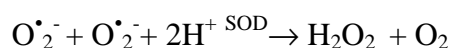
Źródła wolnych rodników w komórkach:

- w stanach fizjologicznych głównym źródłem rodników tlenowych są procesy oddechowe komórki. Powstają one jako produkty pośrednie w łańcuchu oddechowym, gdzie cząsteczka tlenu ulega redukcji przez 4 elektrony z wytworzeniem 2 cząsteczek wody lub jako produkt ostateczny niekompletnej redukcji O₂ w sprawnych czynnościowo mitochondriach (1-3%);
- produkcja przez leukocyty, eozynofile, monocyty i makrofagii jako reakcja na zakażenia organizmu,
- egzogenne (zanieczyszczenia atmosferyczne, dym papierosowy, ekspozycja na duże stężenie tlenu).
- procesy enzymatyczne katalizowane przy udziale: oksydazy NADPH, oksydazy ksantynowej, oksydazy aldehydowej, oksydazy diaminowej, dehydrogenazy dihydroorotowej, hydroksylazy antranilowej, lipooksygenazy, cyklooksygenazy;
- autooksydacja związków biologicznie czynnych: hydrochinonów, epinefryny, tetrahydropteryny, leukoflawiny, związków tiolowych, hemoglobiny;

Rodnik ponadtlenkowy (O₂^{•-}), powstaje w wyniku jednoelektronowej redukcji tlenu cząsteczkowego



Odznacza się wysoką reaktywnością i właściwościami lipofilnymi (Klebanoff, 1980; Babior, 1984). Charakteryzuje się znaczną cytotoksycznością, co potwierdzają badania na zwierzętach (Freeman, 1982; Mc Cord, 1985; Colli, 1991). Wytwarzany jest podczas wybuchu tlenowego komórek fagocytujących, w reakcjach autooksydacji zredukowanych związków (flawiny, epinefryna), w procesach mitochondrialnych i w retikulum endoplazmatycznym. Może występować jako utleniacz lub reduktor. W rozpuszczalnikach niepolarnych rodnik ponadtlenkowy jest zasadą, w roztworach wodnych działa jak silny czynnik redukujący bądź słaby czynnik utleniający. W wyniku reakcji w roztworach wodnych zachodzącej między dwoma rodnikami ponadtlenkowymi powstaje nadtlenek wodoru (reakcja redukcji) i cząsteczka tlenu (reakcja utleniania) (Root, 1977; Maslen i in., 1987).



Efektom powyższej reakcji dysmutacji, w której bierze udział około 80 % powstałych rodników ponadtlenkowych jest generowanie prawie całej ilości nadtlenku wodoru wytwarzanego w komórce (Root, 1977; Black i in., 1987; Maslen i in., 1987). H_2O_2 charakteryzuje się zdolnością przenikania przez błony biologiczne i powodowania uszkodzeń poza miejscem jego wytworzenia (Blake i in., 1987). Rodniki ponadtlenkowe nie wchodzi w reakcje z aminokwasami, kwasami karboksylowymi, nie wykazują działania bakteriobójczego. Rodnik ponadtlenkowy, może wędrować we krwi i atakować szereg struktur biologicznych. $\text{O}_2^{\bullet -}$ działa również jako środek rozszerzający naczynia i może odgrywać rolę w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej i regulacji wzrostu. Obserwuje się wpływ rodnika ponadtlenkowego na agregację płytek i degradację czynnika rozszerzającego naczynia – NO (Saran, 1989).

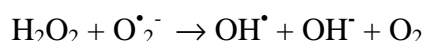
Nadtlenek wodoru (H_2O_2)

Jon nadtlenkowy O_2^{2-} powstający w środowisku pH 7.4 natychmiast ulega sprotonowaniu do nadtlenku wodoru. Enzymy katalizujące powstawanie

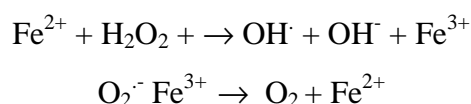
nadtlenku wodoru to: oksydaza moczanowa i oksydaza L-aminokwasów. Większość nadtlenku wodoru wytwarzanego w komórce pochodzi z reakcji dysmutacji; w warunkach fizjologicznych stanowi to 2 % zużytego tlenu, który przechodzi do H₂O₂ (Halliwell, 1993).

H₂O₂ charakteryzuje się zdolnością przenikania przez błony biologiczne i powodowania uszkodzeń poza miejscem jego wytworzenia (Blake i in., 1987). W obecności jonów metali przejściowych tj. żelaza i miedzi nadtlenek wodoru ulega rozpadowi do reaktywnego rodnika hydroksylogowego. Potwierdzono także insulinopodobne działanie nadtlenku wodoru na transport błonowy glukozy, na wykorzystywanie glukozy w procesie lipogenezy oraz na aktywację dehydrogenazy pirogronianowej (Hyslop i in., 1988; Chatham i in., 1989; Ramasarma, 1990).

Rodnik wodorotlenowy ([•]OH, hydroksylogowy) posiada bardzo wysoki potencjał redoks, co wskazuje na bardzo silne właściwości utleniające i jego wysoką reaktywność (Bartosz, 1995). Rodniki [•]OH mogą powstawać w wyniku bezpośredniej reakcji pomiędzy rodnikiem ponadtlenkowym i nadtlenkiem wodoru np. w czasie fagocytozy w tzw. reakcji Habera-Weissa (Willson, 1979; Babior, 1984).



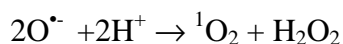
Reakcja ta katalizowana jest przez jony żelaza, miedzi lub innych metali przejściowych (kobaltu, niklu, manganu, chromu). Innym bardziej wydajnym źródłem rodników wodorotlenowych w układach biologicznych jest dwuetapowa reakcja Fentona (Fridovich, 1979; Klebanoff, 1980):



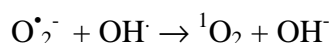
Pierwsza reakcja jest właściwą reakcją Fentona, druga zaś regeneruje jon żelazawy. Rodniki wodorotlenowe nie mają enzymatycznego „zmiatacza”, co niesie ze sobą określone następstwa dla organizmów, w których powstają w

wyniku stresu oksydacyjnego. Dla ochrony przed rodnikami OH[•] stosowane są nieenzymatyczne „zmiatacze rodnika wodorotlenowego”, czyli związki reagujące z tym rodnikiem z dużymi szybkościami, np. mrówczan, etanol, benzoesan, mannitol. W wyniku reakcji pomiędzy rodnikiem wodorotlenowym a cząsteczkami zmiataczy powstają oczywiście wolne rodniki zmiataczy, ale o mniejszej reaktywności niż OH[•], co stanowi istotę efektu ochronnego. Rodniki hydroksylowe nie penetrują do komórki i reagują z cząsteczkami sąsiadującymi. Niskie pH w strukturach takich jak lizosomy, fagosomy, sprzyjają ich powstawaniu. Rodniki hydroksylowe atakują wszystkie biologiczne molekuly tj. DNA, białka, wielonienasycone kwasy tłuszczowe (Halliwell, 1993).

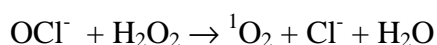
Inne reaktywne formy tlenu to: **tlen singletowy** (¹O₂), **anion podchlorynowy** (OCl⁻), nie są wolnymi rodnikami, ale wykazują również wysoką reaktywność i silne właściwości utleniające. Jednym z biologicznych źródeł tlenu singletowego może być rodnik ponadtlenkowy (Halliwell, 1993).



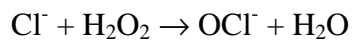
Ponadto tlen singletowy może powstawać także w wyniku innych reakcji w organizmie np. przy rozpadzie endonadtlenków i dysmutacji rodników nadtlenkowych LOO[•], czy w reakcji rodnika ponadtlenkowego z rodnikiem wodorotlenowym:



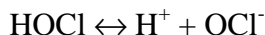
Tlen singletowy powstaje również w reakcji anionu podchlorynowego z nadtlenkiem wodoru (Halliwell, 1993)



Anion podchlorynowy (OCl⁻) powstaje w procesie fagocytozy przy udziale obecnej w granulocytach obojętnochłonnych mieloperoksydazy (MPO) w wyniku utleniania jonu chlorkowego do jonu podchlorynowego (Halliwell, 1993).



W pH zbliżonym do obojętnego kwas podchlorawy HClO występuje jako mieszanina formy zdysocjowanej i niezdisocjowanej i również jest źródłem anionu podchlorynowego:



Skutki działania reaktywnych form tlenu.

Wolne rodniki wykazują dużą reaktywność, dążą do skompensowania spinu i zdolne są do modyfikacji białek, lipidów, węglowodanów (Blake i in., 1987; Burda, 1991; Cambria i in., 1991; Chochrane, 1991). Reaktywne formy tlenu w wysokich dawkach działając na komórkę powodują zaburzenia jej struktury i funkcji, co ostatecznie prowadzi do śmierci komórki. Częstym celem ataku, dyfundujących lub powstających w nich wolnych rodników są błony komórkowe. Wpływ wolnych rodników na strukturę i funkcję błon komórkowych prowadzi do zmniejszenia płynności błon komórkowych a w efekcie do upośledzenia ich funkcji (Pfafferott i in., 1982; Marridonneau i in., 1983). Pod wpływem aktywnych form tlenu obserwujemy w obrębie błon biologicznych (Taylor, 1986; Halliwell, 1991;):

- modyfikację aktywności składników błony (np. enzymów, receptorów),
- zmiany struktury błony, rzutujące na funkcję i ich antygenowy charakter,
- utlenianie grup tiolowych, zmiany w stosunku wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i białek,
- inicjację peroksydacji wielonienasyconych kwasów,
- rozprężnięcie transportu błonowego.

W wyniku działania reaktywnych form tlenu w organizmach żywych dochodzi do uszkodzenia struktur kwasów nukleinowych a dokładnie uszkodzenia zasad nukleinowych, reszt cukrowych lub rozerwania wiązań fosfodiesterowych łączących nukleotydy, co prowadzi do rozerwania nici kwasów nukleinowych.

Powstałe uszkodzenia wywołane są działaniem głównie rodnika wodorotlenowego oraz tlenu singletowego, które wykazują szczególne powinowactwo do tymidyny (Halliwell, 1993). Cząsteczki DNA mogą być uszkodzane przez rodniki wodorotlenowe bezpośrednio lub pod wpływem końcowych produktów peroksydacji lipidów, które wykazują dużą toksyczność oraz działają mutagennie i kancerogennie (Knuutila, 1984). Powstałe zmiany odgrywają znacząca rolę w procesach starzenia się organizmów i karcinogenezie (Nakayama i in., 1983; Slater, 1984; Cross i in., 1987; Nobuyuki, 1988; Esterbauer i in., 1991; Witz, 1991).

Reaktywne formy tlenu mogą również uszkadzać białka poprzez modyfikację reszt aminokwasowych, grup prostetycznych oraz agregację lub fragmentację cząsteczek białkowych. Uszkodzenia te zmieniają antygenowość białek i zwiększają ich podatność na proteolizę (Blake, 1987). Spośród reszt aminokwasowych białek, oprócz reszt cysteiny i metioniny, również reszty lizyny, proliny, histydyny, tryptofanu, fenyloalaniny, tyrozyny i argininy są bardziej wrażliwe na uszkodzenia oksydacyjne niż pozostałe aminokwasy (Halliwell, 1993). Utlenianiu przez wolne rodniki ulegać mogą grupy tiolowe białek i innych związków, a powstałe rodniki tiolowe dimeryzują, tworząc dwusiarczki (Ceriello i in., 1991; Halliwell, 1991). Rodnik ponadtlenkowy i rodnik wodorotlenowy powodują utlenianie grup –SH białek oraz rozrywają wiązania dwusiarczkowe powodując denaturację niektórych białek (Matsubara, 1991; Miura i in., 1992). Uszkodzenia oksydacyjne białek prowadzą do szybkiej utraty ich aktywności biologicznej.

Lipidy ulegają peroksydacji pod wpływem reaktywnych form tlenu. Proces ten polega na wolnorodnikowym utlenianiu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych lub innych lipidów, prowadząc do powstawania nadtlenków tych związków. Rodnikami inicjującymi proces peroksydacji lipidów są rodnik wodorotlenowy OH[•], rodnik wodoronadtlenkowy HO₂[•] oraz tlen singletowy ¹O₂ (Halliwell, 1993). Peroksydacji ulegają wolne jak i zestryfikowane kwasy tłuszczowe. In vivo procesowi peroksydacji ulegają głównie reszty wielonienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzące w skład fosfolipidów, które są głównym składnikiem budulcowym błon komórkowych. Im więcej

cząsteczka kwasu tłuszczowego zawiera wiązań nienasyconych, tym łatwiej ulega on peroksydacji (Halliwell, 1993). Peroksydacja lipidów jest procesem nieenzymatycznym zachodzącym np. pod wpływem Fe^{2+} bądź enzymatycznym, katalizowanym przez cyklooksygenazę lub lipooksygenazę. Uważa się, że inicjacja peroksydacji lipidów przez aktywne formy tlenu rozpoczyna się w miejscu niedostępnym dla antyutleniaczy w następstwie reakcji katalizowanej przez metale związane z błonami biologicznymi (Bankson i in., 1993). Dla inicjacji procesu wystarcza niewielka ilość aktywnych form tlenu, bowiem proces rozprzestrzeniania się peroksydacji lipidów ma charakter samopodtrzymujący się a rodnik peroksydowy będący produktem peroksydacji lipidów podtrzymuje reakcję (Blake i in., 1987; Bankson i in., 1993). Proces peroksydacji odbywa się także w warunkach fizjologicznych. Jego intensywność jest jednak niewielka i regulowana przez peroksydazę glutationową, selenozależną, redukującą wodorotlenki do odpowiednich alkoholi (Waniek i in., 1990). Niebezpieczeństwem peroksydacji lipidów jest wytworzenie aldehydów wykazujących działanie mutagenne i rakotwórcze np. dialdehydu malonowego (Hurst, 1978).

Reaktywne formy tlenu powodują również uszkodzenia cukrów. Stwierdzono, że złożony wielocukier, kwaśny mukopolisacharyd – kwas hialuronowy, ulega depolimeralizacji w wyniku działania reaktywnych form tlenu. Przejawia się ona zmiennością lepkości roztworów tego mukopolisacharydu, co nie jest bez znaczenia dla właściwego funkcjonowania stawów.

Uszkodzenia reszt cukrowych glikolipidów i glikoprotein na powierzchni komórek, mogą prowadzić do zmian właściwości antygenowych tych cząsteczek (Greenwald, 1981).

Utlenione wolne rodniki mogą zmieniać również stan redoks par NAD/NADH i NADP/NADPH (Knuutila, 1984; Davies, 1986; Dean i in., 1991).

Rodniki produkowane przez leukocyty, eozynofile, monocyty i makrofagii są reakcją na zakażenia organizmu i powstają podczas tzw. wybuchu tlenowego.

Reakcja inicjowana jest przez wniknięcie patogenu do organizmu, co wyzwała kaskadę następujących po sobie procesów zwanych ostrą odpowiedzią zapalną. Dalej następuje wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych, wnikanie

zaktywowanych neutrofilów do zainfekowanej tkanki, oraz pobudzanie płytek krwi. Komórki żerne są przyciągane do zainfekowanych tkanek poprzez czynniki chemotaktyczne (np. fragment dopełniacza C5a, formylpeptydy, leukotrieny), a proces migracji odbywa się zgodnie z gradientem czynnika chemotaktycznego. Chemotaksja doprowadza fagocyta do celu, jakim jest patogen, który zopsonizowany czynnikiem chemotaktycznym ulega szybkiej internalizacji przez komórkę żerną (immunofagocytoza). W jej wnętrzu tworzy się pęcherzyk, zwany fagosomem, który ulega fuzji z lizosomem. Na tym etapie dochodzi do właściwej neutralizacji patogenu, dewastacja jego struktury i całkowity rozpad. Procesy, które do tego się przyczyniają można ogólnie podzielić na dwie kategorie:

- Mechanizmy beztlenowe: Zaliczamy tu szereg czynników, przede wszystkim enzymatycznych. W wyniku degranulacji lizosomu do wnętrza pęcherzyka zostaje uwolnionych szereg enzymów litycznych: elastaza, kolagenazy, lipazy, deoksyrybonukleazy, polisacharydazy, sulfatazy, fosfatazy. Najbardziej charakterystyczne wydzielane wówczas czynniki to: BPI (zwiększa przepuszczalność błony, aktywuje niektóre enzymy bakteryjne), katepsyna G (proteaza), defensyny (peptydowe antybiotyki, uszkodzające błonę i ją perforujące), kateliny (peptydy kationowe o podobnym do defensyn działaniu), lizozym - muraminaza (destabilizuje ścianę komórkową bakterii), laktoferyna (wiąże niezbędne bakteriom żelazo) i wiele innych.

- Mechanizmy tlenowe: Fagocyty aktywnie żerujące wykazują nawet kilkudziesięciokrotne zwiększenie zużycia tlenu, czemu towarzyszy gwałtowne zużywanie glukozy w cyklu pentozo-fosforanowym. Nie jest to typowy proces zachodzący w mitochondrium, nie hamują go azydki i cyjanki. Komórki fagocytujące masowo wytwarzają aktywne formy tlenu, których destruktywne działanie określa się mianem wybuchu tlenowego. Za wybuch tlenowy odpowiedzialny jest między innymi rodnik nadadtlenkowy. Donorem elektronu dla cząsteczkowego tlenu jest NADPH. Kolejną aktywną formą tlenu wytwarzaną przez fagocyty to nadadtlenek wodoru. W sytuacji odpowiednio wysokiego stężenia rodnika nadadtlenkowego, co dla zaktywowanej komórki żernej jest łatwe do osiągnięcia, ta reaktywna forma tlenu podlega spontanicznej dysmutacji, której produktem jest właśnie nadadtlenek wodoru. Gdy stężenie rodnika

ponadtlenkowego nie jest odpowiednio duże, uwidacznia się rola dysmutazy ponadtlenkowej - enzymu, który katalizuje reakcję syntezy.

Mechanizmy ochrony organizmu przed działaniem aktywnych form tlenu.

Organizmy tlenowe posiadają naturalny mechanizm obronny przed toksycznym działaniem reaktywnych form tlenu (oksydantów), nosi on nazwę bariery antyoksydacyjnej. Substancje, które opóźniają lub powstrzymują mechanizmy powstawania uszkodzeń przez wolne rodniki (uszkodzeń oksydacyjnych), to antyoksydanty.

Mechanizmy działania przeciwutleniaczy można podzielić na:

- enzymatyczne;
- nieenzymatyczne;
- obejmujące naprawę i usuwanie cząsteczek uszkodzonych przez reaktywne formy tlenu.

Enzymatyczne mechanizmy obrony komórek przed toksycznym działaniem wolnych rodników stanowią enzymy, które są pierwszą linią obrony przed reaktywnymi formami tlenu, spełniają bardzo ważną funkcję prewencyjną, polegającą na niedopuszczaniu do reakcji związków biologicznie ważnych z reaktywnymi formami tlenu. (Paller, 1988; Okuda i in., 1992). Należą do nich:

- dysmutaza ponadtlenkowa;
- katalaza;
- peroksydaza;
- reduktaza glutationowa.

Nieenzymatyczne mechanizmy obrony komórek przed toksycznym działaniem reaktywnych form tlenu to:

- antyoksydanty hydrofilowe i hydrofobowe (zmiatacze wolnych rodników);
- jony metali pierwiastków przejściowych;
- metalotioneiny;

Antyoksydanty hydrofilowe i hydrofobowe jako składniki żywienia.

Głównymi antyoksydantami hydrofilowymi są glutation zredukowany i kwas askorbinowy (witamina C).

W normalnych warunkach w komórkach eukariotycznych ponad 99% glutationu występuje w formie zredukowanej (GSH), w ilościach milimolarnych. Glutation w komórkach odpowiedzialny jest za: utrzymanie grup tiolowych białek w formie zredukowanej, wchodzenie w reakcje z nadtlenkami organicznymi, nadtlenkiem wodoru, z wolnymi rodnikami, z ksenobiotykami, z disulfidami białek oraz za pełnienie roli głównego wewnątrzkomórkowego buforu redoks. Glutation zredukowany uczestniczy ponadto w degradacji herbicydów, pestycydów, hamuje indukowanie przez rodnik ponadtlenkowy autooksydację adrenaliny oraz kontroluje wewnątrzkomórkowe stężenie tego anionu (Batteli, 1982; Aw i in., 1991; Torres i in., 1991). GSH w komórkach zwierzęcych występuje głównie w mitochondriach i odpowiedzialny jest za neutralizację reaktywnych form tlenu powstających w dużych ilościach w tych organellach (Darleyusmar i in., 1991; Kawano i in., 1991). Obniżenie stężenia GSH w komórkach zmniejsza ich oporność na toksyczne działanie ksenobiotyków (Nejad, Bottje, 1992).

Kwas askorbinowy (witamina C) posiada silne właściwości antyoksydacyjne wyrażające się wobec O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot , $HOCl$, rodników nadtlenowych, tlenu singletowego. Ponadto uważany jest za najważniejszy antyoksydant płynów pozakomórkowych w organizmie, jak również stanowi istotną ochronę antyoksydacyjną wewnątrz komórek (Halliwell, 1993). Witamina C zapewnia utrzymanie właściwego potencjału redoks w komórce. W dużych stężeniach wykazuje właściwości antyoksydacyjne, natomiast w niskich może działać jak prooksydant i stymuluje reakcje wolnorodnikowe zwłaszcza w obecności jonów metali przejściowych (Niki, 1991; Sai i in., 1992). Główne źródła witaminy C w codziennym pożywieniu to: owoce cytrusowe, rokitnik, róża, czarna porzeczka, papryka, kapusta, brokuły, pomidory, pietruszka, chrzan.

Kolejnym ważnym antyoksydantem należącym do antyoksydantów hydrofobowych jest witamina E (α -tokferol). Obecna jest ona w błonach komórkowych oraz w lipoproteinach osocza krwi (Packer, 1984; Yamamoto i in., 1986). Tokoferole reagując z wolnymi rodnikami zabezpieczają lipidy przed

utlenianiem a ich antyoksydacyjne działanie polega na zmiataniu wolnych rodników organicznych i terminacji reakcji peroksydacji lipidów. (Chow, 1991; Janero, 1991; Lee i in., 1992). Witamina E może również działać jako zmiatacz rodników nadadtlenkowych (Torres i in., 1991). Rodnik tokoferylowy natomiast jest stosunkowo mało reaktywny i nie uczestniczy w łańcuchu prolongacji reakcji wolnorodnikowej (Halliwell, 1993) i może być ponownie redukowany do α – tokferolu przez kwas askorbinowy. Produkty żywnościowe, które dostarczają naszemu organizmowi dużych ilości witaminy E to: oleje roślinne, kielki pszenicy, liściaste warzywa, żółtko jajka, rośliny strączkowe.

Do lipofilowych antyoksydantów należy β - karoten, jako prowitamina witaminy A. Występuje głównie w produktach roślinnych tj.: oleju sojowym i rzepakowym, koperku, morelach, mango, melonach, marchewce, kukurydzy.

Zmiataczami wolnych rodników są również niskocząsteczkowe związki takie jak: adrenalina, bilirubina, biliwerdyna, kwas moczowy i związki kompleksujące jony metali. Większość z nich tj. bilirubina, biliwerdyna i inne (Chahine i in., 1991; Mal i in., 1991) reagując z rodnikami nadadtlenkowymi nie dopuszczają do rozprzestrzeniania się reakcji wolnorodnikowych chroniąc jednocześnie komórki przed uszkodzeniami. Kwas moczowy, jako końcowy produkt przemiany puryn w organizmie, hamuje peroksydację lipidów, zaś siarkowy analog mocznika (tiomocznik) jest specyficznym zmiataczem rodników wodorotlenowych podobnie jak mrówczan sodu, etanol, butanol, glukoza, mannitol wychwytyują i unieczynnijają rodniki wodorotlenowe (Marridonneau i in., 1983; Fleming i in., 1988; Mangino i in., 1991; Salahudeen i in., 1991; Solaria i in., 1991). Związki kompleksujące jony metali mogą również zabezpieczać komórki przed możliwością wytwarzania wolnych rodników.

Jony metali grup przejściowych mogą również w określonych sytuacjach wykazywać właściwości antyoksydacyjne, katalizując dysmutację anionorodnika nadadtlenkowego, podobnie jak dysmutaza nadadtlenkowa, czy reagując z rodnikiem OH. Jony miedzi asocjowane z cząsteczkami białek np. albuminą surowicy, wykazują aktywność dysmutazy nadadtlenkowej. Jony manganu zabezpieczają przed toksycznością reaktywnych form tlenu, wygaszają tlen singletowy, zmiatają wolne rodniki tlenowe, hamują peroksydację lipidów w

błonach (Varani i in., 1991). Kompleksy jonów żelaza i EDTA katalizują dysmutację rodników ponadtlenkowych. Jony miedzi i manganu mogą być dostarczane do naszego organizmu również w codziennej diecie, która może również stanowić naturalną barierę przed wolnymi rodnikami. Produkty stanowiące bogate źródło manganu to: orzechy, pieczywo pełnoziarniste, warzywa strączkowe, czarne jagody, borówki, buraki, owies. Produkty, które są dobrym źródłem miedzi to: wątroba, zielone warzywa liściaste, orzechy, migdały, ostrygi, nasiona strączkowe.

Inną formą nieenzymatycznej ochrony przed działaniem reaktywnych form tlenu jest przechowywanie niewykorzystanych przez organizm jonów metali (sekwestr metali), co zabezpiecza przed powstawaniem rodników wodorotlenowych i innych. Najczęściej nadmiar jonów metali jest gromadzony w cząsteczkach wyspecjalizowanych białek magazynujących. Szczególne niebezpieczne dla organizmu są jony żelaza i miedzi, ponieważ mogą one w obecności H_2O_2 generować wolne rodniki. Jony żelaza w tkankach wiązane są przez transferrynę i ferrytynę. Jony miedzi występują w osoczu krwi; część z nich tworzy kompleksy z albuminą, aminokwasami i z ceruloplazminą (Chahine i in., 1991).

KOŃCOWE PRODUKTY GLIKACJI BIAŁEK (AGEs).

Końcowe produkty glikacji białek (advanced glycation end products – AGEs), powstają w sytuacji zwiększonej dystrybucji substratów tj. węglowodanów (hiperglikemia) i białek, tj. między innymi w cukrzycy i niewydolności nerek. Glikacja ma charakter nieenzymatyczny i jest przykładem potranslacyjnej modyfikacji białek, która polega na kondensacji grup karbonylowych cukrów redukujących z grupami aminokwasowymi białek ustrojowych. Piśmiennictwo podaje również określenie „glukozyłacja nieenzymatyczna” (Turyna, 1985) w przypadku, gdy cukrem redukującym jest glukoza, lub reakcja Maillarda - od nazwiska odkrywcy (Maillard, 1912).

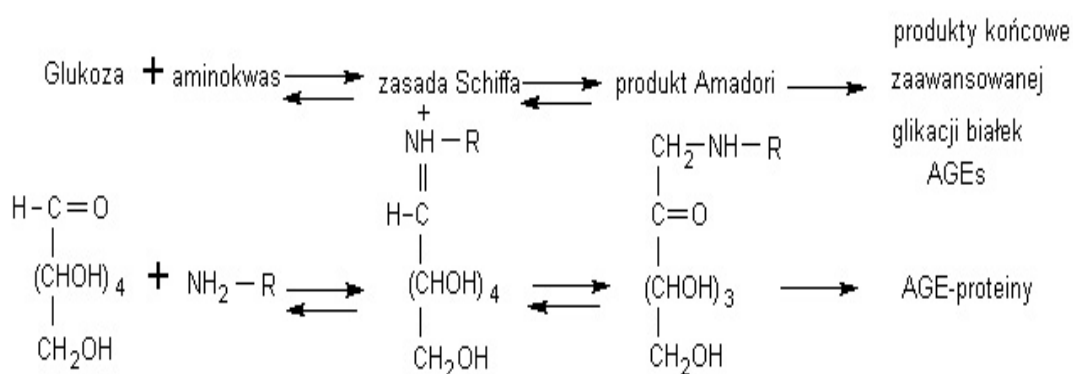
W zdrowym organizmie proces glikacji białek zachodzi spontanicznie bez udziału enzymów a jego produkty łatwo ulegają degradacji. W stanach patologicznych natomiast dochodzi do nasilenia procesu powstawania produktów glikacji (AGEs), są one wówczas magazynowane w organizmie i przyczyniają się do licznych powikłań między innymi w przebiegu cukrzycy.

AGEs mogą być również pochodzenia egzogenego; są dostarczane do organizmu człowieka razem z pokarmem. Szczególnie dużo produktów glikacji znajduje się w pieczonym chlebie (brązowej skórce) oraz mięsie pieczonym na ruszcie. Jednak udział egzogennych AGEs w całkowitej puli jest mały, a jako związki odporne na enzymatyczną i chemiczną hydrolizę są źle wchłaniane z przewodu pokarmowego (Sebecova i in., 2000)

Mechanizm powstawania końcowych produktów glikacji białek (AGEs).

Glukoza lub inne cukry proste (galaktoza, fruktoza) wchodzi w spontaniczną, nieenzymatyczną reakcję glikacji z licznymi białkami np. hemoglobina, albumina, kolagenem. Proces ten zostaje zapoczątkowany nieenzymatycznym wiązaniem grupy aldehydowej cukru redukującego z grupą aminową białka. Jest to pierwszy, szybko przebiegający, odwracalny etap glikacji prowadzący do powstania związku o charakterze zasady Shiffa (aldoiminy). Stan równowagi pomiędzy poziomem glukozy i ilością grup aminowych biorących udział w tej

reakcji trwa zaledwie kilka godzin. W drugim etapie glikacji, w procesie odwracalnej rearanzacji zasady Shiffa zwanej przegrupowaniem Amadori, powstaje bardziej trwała forma ketoaminowa, której czas półtrwania może obejmować ok. 28 dni. W przypadku zmodyfikowanych białek o długim okresie półtrwania (np. kolagen) dochodzi do dalszych przekształceń trwających kilka miesięcy. W zależności od pH środowiska zmienione białka ulegają reakcjom oksydacji, dehydratacji, fragmentacji i kondensacji z innymi grupami aminowymi (tzw. reakcjom Maillarda), co w konsekwencji prowadzi do formowania się stabilnych produktów końcowych zaawansowanej glikacji (advanced glycation endproducts – AGEs) (rys. 1). Za pomocą dostępnych metod analitycznych zidentyfikowano niektóre końcowe produkty glikacji tj.: 2-furylo-4(5)-(2-furanylo)1-H-imidazol (FFI), karboksymetylolizynę, (CML), pyralinę (5-hydroksy-metylo-1-alkiklopirolino-2-karaldehyd) i pentozydynę. Ich charakterystyczną cechą są: brunatno-żółte zabarwienie, specyficzne właściwości spektrofotometryczne (fluorescencja przy określonej długości fali) i zdolność do tworzenia między- i wewnątrzcząsteczkowych wiązań krzyżowych pomiędzy białkami (cross-links). Właściwości te są istotne przy oznaczaniu AGEs, należy jednak podkreślić, że izolacja i chemiczna identyfikacja AGEs jest trudna ze względu na ich heterogenną naturę i dużą wrażliwość na zmiany pH (Lee, Cerami 1992).

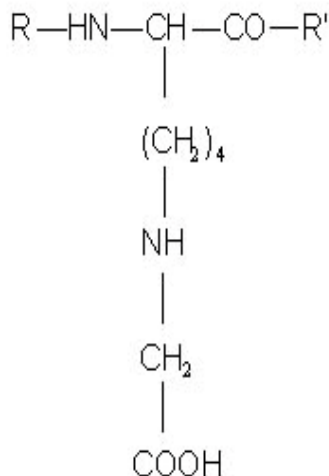


Rys. 1. Schemat tworzenia AGEs wg Lee'a i Ceramiego (R – reszty peptydowe) (Lee, Cerami, 1992).

Typy i właściwości fizykochemiczne niektórych końcowych produktów glikacji białek.

Spośród wielu AGEs najbardziej poznana została natura karboksymetylolizyny, pentozydyny i pyraliny.

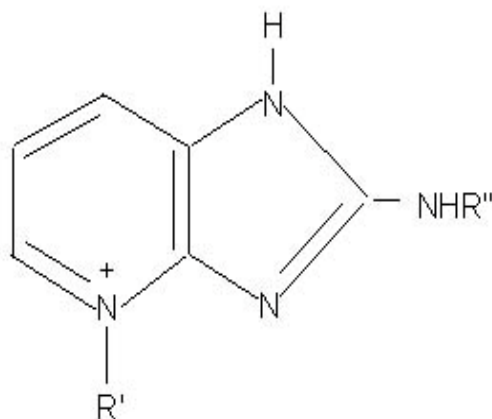
Karboksymetylolizyna (CML) opisana została w 1986 roku przez Ahmeda i in. (Ahmed i in., 1986). Powstaje na drodze rozszczepienia produktów Amadori lub zasad Shiffa między węglem C-2 i C-3 łańcucha wodorowęglowego w obecności tlenu lub podczas autooksydacyjnej glikacji (Dunn i in., 1990; Nagai i in., 1998). Hamują tę reakcję aminoguanidyna, enzymy rozkładające nadtlarki: dysmutaza ponadtlenkowa i katalaza oraz witamina E. Ze względu na silną zależność od tlenu oraz pośrednictwo rodnika hydroksylowego w jej powstawaniu (autooksydacyjna glikacja), jest ona uważana za marker stresu oksydacyjnego związanego z reakcjami utleniania węglowodanów i lipidów oraz odległych uszkodzeń białek w procesach starzenia się miażdżycy i cukrzycy (Regena i in., 1996). Właściwości fizykochemiczne CML zostały przedstawione w tabeli nr 1.



Rys. 2. Wzór struktury karboksymetylolizyny (R, R' – reszty peptydowe).

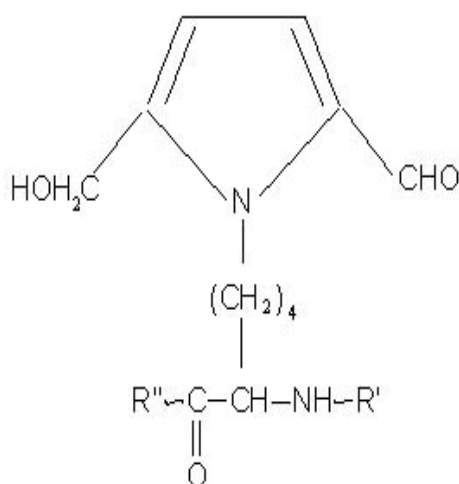
Pentozydyna powstaje w reakcji rybozy, ksylozy lub arabinozy z białkowymi resztami lizyny i argininy. Poza pentozami substratem przy tworzeniu pentozydyny może być też glukoza. Krótką charakterystykę fizykochemiczną pentozydyny przedstawiono w tabeli nr 1. Zawartość pentozydyny rośnie w tkance wraz z wiekiem. Obserwuje się także jej znaczną obecność w tkankach,

które charakteryzują się bardzo wolnymi przemianami kolagenu np. tchawicy, mniejszą natomiast w tkankach o szybszych przemianach kolagenu tj. oponie twardej, aorticie, rdzeniu nerki, skórze (Odetti i in., 1992).



Rys. 3. Wzór struktury pentozydyny (R, R' – reszty peptydowe).

Pyralina powstaje z 3-deoksyglukozonu - pośredniego produktu glikacji białek charakteryzującego się dużą reaktywnością (tabela nr 1), który ponownie inkubowany z białkami daje pyralinę (Otin i in., 1995). Oznaczenia z użyciem przeciwciał monoklonalnych dają możliwość obserwowania jej w zewnątrzkomórkowej macierzy wielu tkanek (Miyata i in., 1992). Jej właściwości fizykochemiczne zostały przedstawione w poniższej tabeli.



Rys. 4. Wzór struktury pyraliny (R, R' – reszty peptydowe).

Tabela nr 1. Właściwości fizykochemiczne niektórych AGEs (Nagai i in., 1998).

Właściwości chemiczne	(CML)	pentozydyna	pyralina	imidazol	3-deoksyglukozon
zdolność świecenia	–	+	–	–	–
tworzenie wiązań krzyżowych	+	+	–	–	–
reaktywność biochemiczna	–	–	–	–	+

Formy AGEs: rozpuszczalne i związane z białkiem.

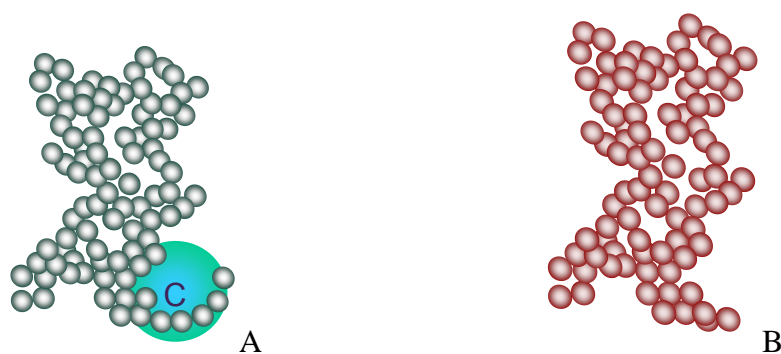
Pentozydyna i karboksymetylolizyna znajdujące się we krwi – w 90 % są związane z albuminą, a w 10 % są w stanie wolnym (Regena, i in., 1996). Rozpuszczalne w wodzie formy AGEs izoluje się wstępnie poprzez rozcieńczenie surowicy buforem fosforanowym i sączenie na sączku o porach 0,22 µm. Formy drobnocząsteczkowe przechodzą do roztworu i do oznaczania wykorzystywane są ich właściwości fluorescencyjne. Pomiar wykonywane są przy świetle wzbudzenia 370 nm i emisji 440 nm. Wyniki wyrażane są w umownych jednostkach fluorescencji (Nakayama i in., 1989). Makita i in. (Makita i in., 1992) wykazali, że funkcja AGEs związanego z białkiem o dużej masie cząsteczkowej jest podobna w grupach pacjentów z cukrzycą, obciążonych dodatkowo niewydolnością nerek, jak u osób zdrowych. Natomiast dramatyczne różnice występują w nisko cząsteczkowej frakcji AGEs (< 10000 daltonów) tzw. frakcji peptydowej AGEs, która była ponad czterokrotnie wyższa w surowicy osób dializowanych obciążonych cukrzycą. Pojedyncza sesja dializy zmniejszyła poziom AGEs zaledwie o około 20 %, w tym czasie poziom kreatyniny spadł o prawie 80 %, co wskazuje, że produkty te nie są transportowane przez błonę dializacyjną i kumulują się w organizmie (Makita i in., 1992).

Receptory dla AGEs.

Końcowe produkty glikacji białek w przeciwieństwie do produktów wczesnej glikacji są rozpoznawane przez specyficzne receptory komórkowe RAGE (receptors of advanced glycated end products). Zidentyfikowano je na powierzchni monocytów, makrofagów, komórek śródbłonna, fibroblastów, komórek mezangium i limfocytów T (Książek, Wiśniewska, 2001). Główna rola receptora RAGE polega na degradacji AGEs, a pośrednio na regulacji procesu przebudowy macierzy pozakomórkowej. Reakcja AGEs z receptorami RAGE nasila stres oksydacyjny, powoduje również uwalnianie cytokin prozapalnych: czynnika martwicy nowotworów (TNF alfa), IL-1, IL-6; czynników prozakrzepowych: czynnika tkankowego (TF), trombomoduliny; naczyńskurczowych: endoteliny (ET-1) oraz czynnika adhezji (VCAM) i czynników wzrostu (Kropiewnicka, Pączek, 2000; Książek, Wiśniewski, 2001). In vitro wykazano, że beta-2-mikroglobulina zmodyfikowana przez AGEs wiąże się z receptorem RAGE indukując reakcje komórkowe. Dochodzi do nasilenia chemotaksji zaktywowanych monocytów, które uwalniają interleukinę 1-beta i czynnik martwicy nowotworów alfa, pobudzające resorpcję tkanki kostnej. Biorąc pod uwagę zależność pomiędzy kontrolą glikemii i ligandami dla RAGE, można by przypuszczać, że ścisła kontrola glikemii chroni przed powikłaniami naczyniowymi w cukrzycy. Loredana i in. (Loredana i in., 2003) stwierdzają, że RAGE bierze udział w przyspieszonym tworzeniu zmian miażdżycowych i narastaniu tych zmian, a jego blokada może stanowić nową strategię stabilizacji miażdżycy i zapalenia naczyń w już istniejącej cukrzycy. Niektóre efekty biologiczne AGEs mogą być modyfikowane aminoguanidyną, przeciwciałami przeciwko RAGE i blokerami łączenia się AGEs z receptorami RAGE (probukol, trypsyna), te informacje mogą być przydatne w przeciwdziałaniu procesom glikacji u ludzi (Sebakowa, i in., 1999; Miyata i in., 2001).

MODYFIKOWANA OKSYDATYWNIE ALBUMINA (IMA).

Zmodyfikowana oksydatywnie albumina jako swoisty wskaźnik niedotlenienia, niesie ze sobą duże nadzieje jako biochemiczny parametr wskazujący między innymi na niedokrwienne uszkodzenie mięśnia sercowego i innych stanów klinicznych spowodowanych niedotlenieniem. Ludzka albumina surowicy jest białkiem krążącym we krwi transportującym jony metali przejściowych na N-końcu łańcucha aminokwasowego. Istotną cechą albuminy w połączeniu z jonami metali przejściowych jest zdolność zmiatania reaktywnych form tlenu (wolnych rodników). Ta właściwość albuminy niestety słabnie w sytuacjach niedotlenienia, jak również pod wpływem działania nadmiaru reaktywnych form tlenu, a więc w stresie oksydacyjnym. Wpływ tych czynników prowadzi do modyfikacji albuminy, a konkretnie do upośledzenia jej N-końca łańcucha aminokwasowego (lizyny), który staje się niezdolny do wiązania metali przejściowych, w tym jonów kobaltu, niklu lub miedzi. Brak tak istotnych aktywnych form albuminy przyczynia się do wzmożonego stresu oksydacyjnego (Bar-Or, 2001).



Rys. 5. Cząsteczka albuminy A) z normalnym N-końcem łańcucha aminokwasowego wiążącym jony miedzi; B) ze zmodyfikowanym N-końcem łańcucha aminokwasowego, niezdolna do wiązania jonów miedzi (wg <http://www.ischemia.com.>, 2004).

Zdolność modyfikacji cząsteczki albuminy w sytuacji niedotlenienia lub stresu oksydacyjnego używa się przy oznaczaniu parametru IMA. Dlatego też zmodyfikowana oksydatywnie albumina może stanowić swoisty wskaźnik

niedotlenienia, i niesie ze sobą duże nadzieje jako biochemiczny parametr wykazujący między innymi na niedokrwienne uszkodzenie mięśnia sercowego i innych stanów klinicznych spowodowanych niedotlenieniem. Znaczenie oznaczania IMA wiąże się z możliwością oceny wielkości szkód reperfuzyjnych występujących jako efekt zwiększania przepływu krwi przez pierwotnie niedotlenioną tkankę (Naskalski, 2005). U osób zdrowych także obserwuje się obecność tego markera, (określone zostały wartości referencyjne w prezentowanej pracy) natomiast nie stwierdzono korelacji z wiekiem, płcią, rasą, paleniem tytoniu. (<http://www.ischemia.com.>, 2004).

Istotną cechą IMA jest jej szybkie pojawienie się we krwi, bo już w kilka minut od incydentu niedotlenienia, największy wzrost występuje w 4-6 godzinie od pojawienia się niedotlenienia, a spadek następuje przed upływem pierwszej doby. W porównaniu z innymi markerami tj. cTnT, CK-MB, mioglobina (Myc), modyfikowana oksydatywnie albumina najwcześniej pojawia się we krwi.

W świetle literatury kardiologicznej (Bar-Or i in., 2000; Zapico-Muniz i in., 2004) stężenie IMA należy traktować raczej jako wskaźnik prognostyczny zagrażającego niedotlenienia, niż jako test potwierdzający ostry epizod wieńcowy. IMA jest, więc markerem mało swoistym dla mięśnia sercowego. Pasuje się on w grupie testów rozpoznających niedokrwinną chorobę serca w fazie określanej jako minimalne uszkodzenie mięśnia sercowego obecnie rozpoznawane na podstawie wzrostu stężenia cTnI lub cTnT nie przekraczającego progu rozpoznania zawału serca (Naskalski, 2005).

Podwyższone wartości modyfikowanej oksydatywnie albuminy uzyskuje się nie tylko u chorych z niedokrwieniem mięśnia sercowego, ale także z niedokrwieniem mięśni szkieletowych lub innych narządów (Zapico-Muniz i in., 2004), u osób z udarem mózgu, schyłkową przewlekłą niewydolnością nerek (ESRD), z wysokim stopniem infekcji, w zaawansowanych nowotworach (leukemia) (<http://www.ischemia.com.>, 2004). Nie wykazano podwyższonego poziomu IMA u osób z chorobą Crohna, chorobami autoimmunologicznymi, chorobami jelit, uszkodzeniami ortopedycznymi, u osób używających stymulantów (<http://www.ischemia.com.>, 2004).

CELE PRACY

Celem pracy było:

- 1) Opracowanie analityczne metod oznaczania końcowych produktów glikacji białek (AGEs) i modyfikowanej oksydatywnie albuminy (IMA).
- 2) Pomiar stężenia końcowych produktów glikacji białek (AGEs), stężenia modyfikowanej oksydatywnie albuminy (IMA) oraz produktów peroksydacji białek tj. grup karbonylowych (GK) w wybranych grupach pacjentów ze zwiększonym ryzykiem sercowo – naczyniowym.
- 3) Ocena wpływu zabiegu operacyjnego na stężenie markerów stresu oksydacyjnego: grup karbonylowych białek (GK), modyfikowanej oksydatywnie albuminy (IMA) i końcowych produktów glikacji białek (AGEs).

MATERIAŁ I METODY

Charakterystyka badanych grup

W badaniu wzięło udział 412 pacjentów w tym 158 kobiet i 254 mężczyzn.

Pacjentów podzielono na następujące grupy:

I. Grupa kontrolna - 30 zdrowych osób w tym 21 kobiet i 9 mężczyzn, średnia wieku wynosiła 38 ± 12 lat. W tej grupie badanych oznaczano: końcowe produkty glikacji białek (AGEs), modyfikowaną oksydatywnie albuminę (IMA), produkty peroksydacji białek – grupy karbonyłowe (GK).

II. Pacjenci z przewlekłą chorobą nerek wśród których wyróżniono 4 podgrupy:

1. Pacjentów z przewlekłą chorobą nerek w stadium III – V (GFR $45 - 6$ [ml/(min./1.73 m²)]), leczonych zachowawczo z Poradni Nefrologicznej AMG - 113 pacjentów (42 kobiety i 71 mężczyzn), średnia wieku pacjentów 65 ± 13 lat. W tej grupie badanej oznaczano: AGEs, IMA, GK, a warunkiem włączenia do badania było stężenie kreatyniny powyżej 1.4 mg/dl.
2. Pacjentów hemodializowanych z Kliniki Nefrologii i Transplantologii AMG – 43 pacjentów, w tym 16 kobiet i 27 mężczyzn, średni wiek pacjentów 55 ± 12 lat. W tej grupie pacjentów oznaczano AGEs.
3. Pacjentów dializowanych otrzewnowo z Kliniki Nefrologii i Transplantologii AMG - 44 pacjentów, w tym 15 kobiet i 29 mężczyzn, średni wiek pacjentów 57 ± 11 lat. W tej grupie oznaczano AGEs.
4. Pacjentów po zabiegu transplantacji nerki z Kliniki Nefrologii i Transplantologii AMG - 15 pacjentów. Krew pobierano na czczo 2 razy: I pobranie - przed przeszczepieniem nerki; II pobranie – po przeszczepieniu nerki. W tej grupie pacjentów oznaczano AGEs i IMA.

III. Pacjenci z cukrzycą typu 2 z Kliniki Nadciśnienia i Diabetologii AMG - 50 pacjentów (50 mężczyzn), w średnim wieku 52 ± 17 lat. W tej grupie badanych oznaczano wszystkie 3 parametry: AGEs, IMA, GK. Dodatkowo charakteryzowano grupę pod względem masy ciała i stężeniem kreatyniny w osoczu oraz glikowanej hemoglobiny (HbA1C). Wartości uzyskano z kart pacjenta. Średnia masa ciała 94.05 ± 16.83 kg. Średnie stężenie kreatyniny w osoczu 1.41 ± 0.88 mg/dl., średnie stężenie HbA1C 7.9 ± 2.18 g/dl.

IV. Pacjenci z chorobą niedokrwinną serca (27 pacjentów) z I Kliniki Chorób Serca AMG, których podzielono na dwie podgrupy:

1. Pacjenci, u których wykonano planową przezskórną rewaskularyzację mięśnia sercowego (PTCA - angioplastyka naczyń wieńcowych) - 19 pacjentów.
2. Pacjenci z bólem w klatce piersiowej bez zmian w badaniu EKG, którzy nie wymagali przeprowadzenia angioplastyki naczyń wieńcowych - 8 pacjentów
W obu podgrupach oznaczano modyfikowaną oksydatywnie albuminę (IMA), ale w różnych odstępach czasowych.

W pierwszej podgrupie badanie wykonano w pięciu punktach czasowych:

- I: przy przyjęciu na oddział;
- II: tuż po zabiegu;
- III: 1 godz. po zabiegu;
- IV: przy usunięciu koszulki (6 godz.);
- V: w kolejnej dobie po zabiegu.

W drugiej podgrupie wykonano badanie w dwóch punktach czasowych:

- I: pojawienie się bólu w klatce;
- II: doba od pojawienia się bólu w klatce piersiowej.

V. Pacjenci poddawani zabiegom operacyjnym z Kliniki Anestezjologii i Intensywnej Terapii AMG, operowani w znieczuleniu całkowitym. W badaniu wzięło udział 91 pacjentów (49 kobiet i 42 mężczyzn), średnia wieku 55 ± 16 . Krew pobierano w czterech punktach czasowych. I-sze pobranie - przed zabiegiem; II-gie pobranie - po intubacji; III-e pobranie - po 30 min. od rozpoczęcia zabiegu; IV-te – pobranie po wybudzeniu pacjenta. Średni czas trwania zabiegu wyniósł 108.8 min. Chorych podzielono na 4 grupy wg schematu przyjętego przez Amerykańskie Towarzystwo Anestezjologów – ASA (American Society of Anesthesiologists). Podziału dokonywał anestezjolog. ASA I – chory do 65 roku życia, zdrowy (30 chorych); ASA II – chory po 65 roku życia lub z niezbyt nasiloną chorobą ogólną przebiegająca bez ograniczenia jego wydolności (36 chorych); ASA III – pacjent z ciężką chorobą ogólnoustrojową, ograniczająca znacznie jego wydolność (24 chorych); ASA IV – chory z ciężką chorobą ogólnoustrojową stanowiącą zagrożenie dla jego życia (1 chora), grupa odrzucona w badaniu ze względu na małą liczebność. Do badania nie byli kwalifikowani chorzy przypisani do grupy ASA V. Skala ASA

ma na celu standardowe określenie fizycznego stanu chorego przygotowywanego do zabiegu operacyjnego. ASA nie określa samego stopnia ryzyka związanego ze znieczuleniem i z samym zabiegiem, ponieważ na ryzyko znieczulenia ma wpływ bardzo dużo elementów jak wiek chorego, rozległość zabiegu, czas trwania zabiegu, doświadczenie operatora.

Wśród pacjentów w tej grupie scharakteryzowano:

- A) 27 chorych z chorobą nowotworową poddanych zabiegom operacyjnym, w tym 11 chorych z nowotworem piersi, ośmiu chorych z nowotworem płuca, pięciu z nowotworami przewodu pokarmowego, jeden z nowotworem nerki;
- B) 27 chorych poddawanych zabiegom okulistycznym;
- C) 8 chorych poddawanych zabiegom chirurgii naczyniowej;
- D) 8 chorych po urazach poddawanych planowym zabiegom repozycji kości;
- E) 7 pacjentek z łagodnymi zmianami gruczołu sutkowego;
- F) 10 chorych poddanych zabiegom na jamie brzusznej, wyłączając grupę chorych nowotworowych, w grupie tej znaleźli się między innymi chorzy z chorobą Crohna;
- G) pozostałych chorych w liczbie 4 poddawanych innym zabiegom operacyjnym.

W grupie pacjentów poddawanych zabiegom operacyjnym oznaczano: AGEs, IMA, GK.

Pacjenci wyrażali pisemną zgodę na udział w badaniu zatwierdzonym przez Terenową Komisję Etyki Badań Naukowych przy AMG. Kopia zgody znajduje się w aneksie.

Krew do wszystkich badań pobierana była na czczo do próbówki bez antykoagulantu, wirowana przez 5 min. przy 3000 obr./min., następnie oddzieloną surowicę od krwinek zamrażano do czasu analiz w temperaturze - 70° C.

METODY ANALITYCZNE

Oznaczanie końcowych produktów glikacji białek (AGEs) – metoda bezpośrednia, spektrofluorescencyjna.

Stężenie końcowych produktów glikacji białek (AGEs) w surowicy oznaczano według metody opisanej przez Müncha i in. (Müncha i in., 1997) i opracowano pełną charakterystykę metody na potrzeby laboratoryjne Katedry Żywienia Klinicznego, AMG.

Zasada metody:

Pentozydyna, jeden z produktów glikacji białek, posiada właściwości fluoryzujące, w jej skład wchodzi pierścień imidazolo-(4,5b)-pirydynowy warunkujący zdolności do świecenia i tą jej cechą wykorzystuje się w oznaczeniach spektrofluorescencyjnych. Pentozydyna reprezentuje około 90 % wszystkich końcowych produktów glikacji białek (Takahashi i in., 1996).

Aparatura:

- spektrofluorymetr Perkin Elmer LS 50 B (USA),
- kuweta kwarcowa (fluorimetr Cuvet Silica) firmy SIGMA (USA),
d = 1 cm,
- sączi firmy Millipore (Irlandia), GSWP o wielkości porów 0.22 μm i średnicy 13 mm,
- nakładki na sącze - Swinnex firmy Millipore (Irlandia),
- strzykawka plastikowa firmy Millipore (Irlandia).

Odczynniki:

Bufor fosforanowy pH 7.9, o stężeniu 0.1 M/l w składzie diwodorofosforan (V) potasu (KH_2PO_4) i wodorofosforan (V) potasu (K_2HPO_4), firmy POCH S.A Gliwice (Polska).

Przygotowanie buforu fosforanowego:

Zważono 6.9545 g KH_2PO_4 i rozpuszczono w 500 ml wody, pH roztworu 4.8.

Zważono 8.709 g K_2HPO_4 i rozpuszczono w 500 ml wody, pH roztworu 8.5. Zmieszano KH_2PO_4 z K_2HPO_4 w stosunku 1:4 doprowadzając bufor do pH 7.9 1 molowym roztworem wodorotlenku sodu (1 M KOH) i 1 normalnym roztworem kwasu solnego (1 N HCl).

Postępowanie analityczne:

Krew pełną pobierano na czczo z żyły łokciowej do probówki bez antykoagulantu, następnie oddzielano surowicę od krwinek poprzez wirowanie przez 5 min. przy 3000 obr./min; 50 μ l surowicy dodawano do 4950 μ l buforu fosforanowego o pH 7.9 (rozcieńczenie surowicy 100 razy). Rozcieńczoną surowicę w buforze fosforanowym sączono na sączkach Millipor, o porach 0.22 μ m. przy użyciu plastikowych nakładek - swinnexów i strzykawek firmy Millipor. W 3000 μ l przesącza oznaczano fluorescencję przy długości fali emisji 440 nm. i wzbudzenia 370 nm. oraz szczelinie 15 nm. w temperaturze pokojowej, względem buforu fosforanowego w kuwecie kwarcowej. Próbę ślepią stanowiło 3000 μ l bufor fosforanowego o pH 7.9.

Obliczenia:

$$\frac{[(F_{\text{bad.}} - F_{\text{sl.}}) \times 100]}{C \text{ białka}}$$

C białka

$F_{\text{bad.}}$ – wartość fluorescencji próby badanej.

$F_{\text{sl.}}$ – wartość fluorescencji próby ślepej.

C białka – stężenie białka [g/100 ml surowicy]

W obliczeniach uwzględniano rozcieńczenie surowicy (100 razy) a uzyskane wynik wyrażano jako jednostki umowne na gram białka. Białko całkowite oznaczano metodą biuretową standardowo stosowaną w laboratorium z zastosowaniem zestawu firmy Roche, na aparacie Hitachi 704 (Japonia). Jednostka, w której wyrażany jest wynik [U Fl/g białka] jest jednostką umowną, oznacza zmianę fluorescencji przypadającą na gram białka w 100 ml surowicy.

W związku z opracowywaniem metody podjęto następujące postępowania:

1. Przygotowywanie własnego wzorca AGEs.

Podczas oznaczania i identyfikacji związków, niezbędne jest posiadanie wzorca, który daje możliwość wiarygodnego i pewnego oznaczenia w materiale badanym. Niestety największym problemem przy oznaczaniu końcowych produktów glikacji białek jest brak komercyjnie dostępnych wzorców związków najbardziej reprezentatywnych tj. głównie pentozydyny i karboksymetylolizyny. Na potrzeby analityczne przy opracowywaniu metody oznaczania AGEs posłużono się własnym inkubowanym materiałem wzorcowym końcowych produktów glikacji białek, który był mieszaniną AGEs, syntezę przeprowadzono w oparciu o badania Münch i in. (Münch i in., 1997).

Przebieg inkubacji był następujący:

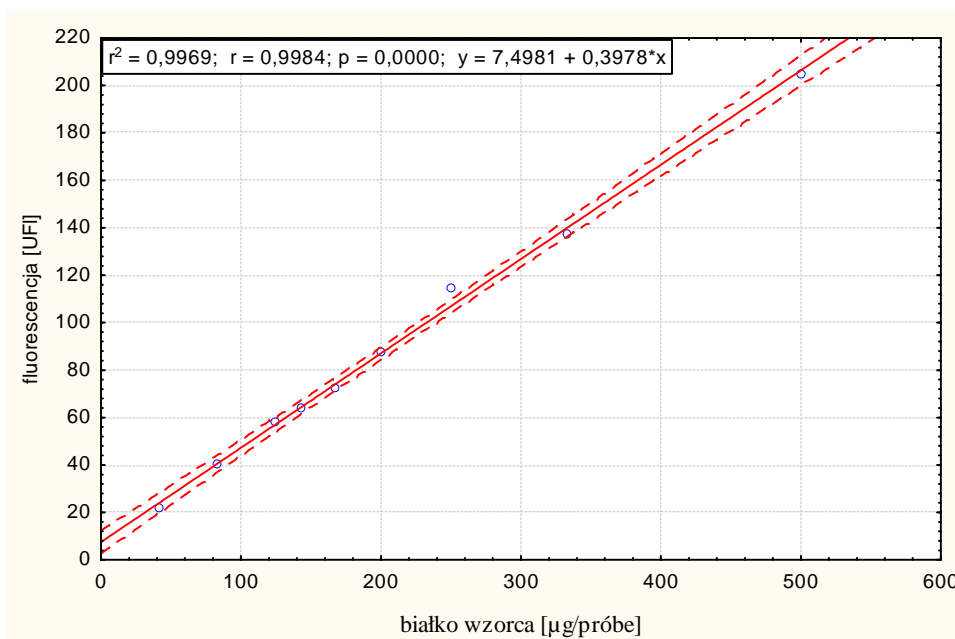
Przygotowano 1 M roztwór glukozy poprzez rozpuszczenie 18 g glukozy w 100 ml 0.1 M buforze fosforanu potasu o pH 7.9. Następnie w 10 ml 1 M roztworu glukozy w 0.1 M buforze fosforanu potasu rozpuszczono 0.5 g albuminy jaja kurzego i inkubowano w temp. 50°C przez 6 tygodni. Rozpuszczalne w wodzie AGEs były usuwane przez dializę, a uzyskany w ten sposób materiał glikowanego białka służył jako wzorzec.

Tak przygotowany wzorzec posłużył do sprawdzenia zakresu liniowości metody, powtarzalności i odzysku.

2. Wyznaczanie krzywej kalibracji inkubowanego wzorca.

Wzorzec AGEs rozcieńczono 1000 razy (10 µl wzorca + 9990 µl buforu fosforanowego- pH 7.9), sączono na sączku 0.22 µm (podjęto postępowanie identyczne jak przy oznaczaniu we krwi) i mierzono fluorescencję przy szczelinie 15 mm i przy długości fali emisji 440 nm. i wzbudzeniu 370 nm.

Wykonano krzywą kalibracji składającą się z 9 punktów (średnią wyliczano z dwóch pomiarów dla każdego punktu). Wykres zależności fluorescencji od ilości białka we wzorcu przedstawiono poniżej.



Rys. 6. Wykres zależności między fluorescencją a ilością białka wzorcowego.

Obserwowano zależność liniową fluorescencji od ilości białka we wzorcu.

3. Wyznaczanie powtarzalności dla wzorca AGEs.

Powtarzalność to zmienność wyników pomiarów wykonywanych przez jednego operatora kilkanaście razy (Stat. Soft).

Wzorec AGEs rozcieńczono 1000 razy (10 µl wzorca + 9990 µl buforu fosforanowego- pH 7.9), sączono na sączku 0.22 µm i przygotowano następnie 3 stężenia roztworu wzorca w buforze fosforanowym, dla każdego stężenia wykonano 12 powtórzeń i zmierzono fluorescencję względem ślepej (buforu fosforanowego - pH 7.9) średnie wartości przedstawiono w poniższej tabeli:

Tabela nr 2. Ocena błędu precyzji oznaczania wzorca AGEs.

Białko wzorca [µg/próbe]	125	200	500
Śr.Δ fluorescencji ± SD	56,1 ± 3,8	88,1 ± 2,2	198,4 ± 4,4
WZ	6,8%	2,5%	2,2%

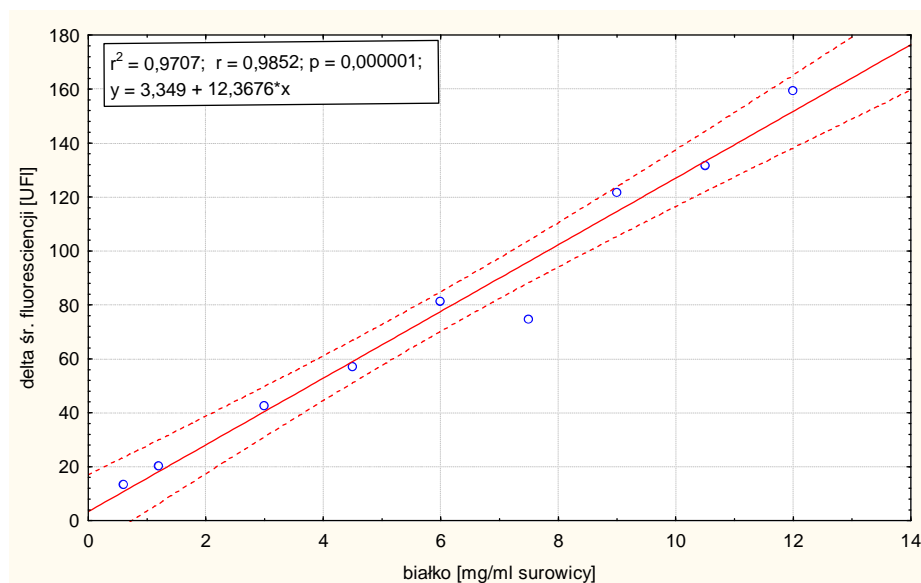
SD- odchylenie standardowe

WZ- błąd względny

Dla zawartości białka powyżej 200 µg/próbę, błąd precyzji osiągał stabilne wartości rzędu 2.2% - 2.5%.

4. Zakres liniowości w badanym materiale (surowicy).

Wykonano 9 różnych (rosnących) stężeń surowicy dodając odpowiednie ilości surowicy i buforu fosforanowego i mierzono w nich fluorescencję, od każdego pomiaru odjęto wartość ślepej (bufor fosforanowy pH 7.9), średnią wartość wyliczono z trzech kolejnych pomiarów, wyniki przedstawiono na poniższym wykresie.



Rys. 7. Wykres zależności liniowej między fluorescencją a stężeniem białka w surowicy.

Obserwowano zależność liniową pomiędzy fluorescencją a stężeniem białka w surowicy.

5. Powtarzalność metody oznaczania AGEs w surowicy.

Przygotowano 3 różne rozcieńczenia surowicy w buforze fosforanowym.

- 1) rozcieńczenie 50 razy (0.003 g białka/ml surowicy)
- 2) rozcieńczenie 100 razy (0.006 g białka/ml surowicy)
- 3) rozcieńczenie 500 razy (0.03 g białka/ml surowicy).

Dalsze postępowanie analityczne było zgodne z metodą. Dla każdego stężenia wykonano 15 powtórzeń i zmierzono fluorescencję względem ślepej (buforu

fosforanowego - pH 7.9), przy szczelinie 15 nm. Średnie wartości przedstawiono w tabeli nr 3.

Tabela nr 3. Ocena błędu precyzji oznaczania AGEs w surowicy.

Białko w surowicy [g białka/ml surowicy]	0,003	0,006	0,03
Śr.Δ fluorescencji ± SD	4,1 ± 1,2	22,0 ± 1,4	41,7 ± 1,4
WZ [%]	29	6,4	3,3

SD - odchylenie standardowe

WZ - błąd względny

Dla zawartości białka powyżej 0,006 g białka/ml surowicy, błąd precyzji osiągał stabilne wartości rzędu 3.3% - 6.4%. Rozcieńczenie przynajmniej 100 razy surowicy daje stabilne wyniki pomiarów AGEs.

6. Próba odzysku wzorca AGEs dodanego do surowicy.

Do badanego materiału – surowicy, dodawano znaną ilość substancji wzorcowej;

- Przygotowano roztwór wzorca AGEs w buforze fosforanowym 1000 razy rozcieńczony (10 µl + 9990 µl buforu fosforanowego pH 7.9) i sączono na sączku 0.22 µm.

- Przygotowano roztwór surowicy 34 razy rozcieńczony (100 µl surowicy + 3300 µl buforu fosforanowego pH 7.9).

- Fluorescencje mierzono w 3 mieszaninach roztworu wzorca, surowicy i buforu fosforanowego, które zmieszano w następujących proporcjach:

a) wzorzec + bufor 1:2

b) surowica + bufor 2:1

c) surowica + wzorzec 2:1

Średnie wartości fluorescencji wyliczono z 6 pomiarów w każdej serii.

Uzyskano następujące średnie wartości fluorescencji mieszanin:

a) wzorca w buforze fosforanowym – 75.3 ± 0.72 U FI

b) surowicy w roztworze fosforanowym – 53.0 ± 1.9 U FI

c) surowicy i wzorca – 118 ± 3.67 U FI

Obliczenia:

$$\text{Odzysk} = (c-b) / a \times 100\% = (118.3 - 53) / 75.3 \times 100\% = 86.7 \%$$

Odzysk dodanego wzorca podczas analizy wyniósł 86.7 %.

Przy opracowaniu metody oznaczania końcowych produktów glikacji białek wybrano następujące warunki techniczne:

- A) Do pomiaru ustawiono w spektrofлуorymetrze szczelinę rzędu 15 nm, przez którą przechodziły promienie fluorescencji.
- B) Standardowe sączenie rozcieńczonej surowicy/wzorca w buforze fosforanowym na sączkach Millipor, o porach 0.22 μm. przy użyciu nakładek na sączki – swinnexów firmy Millipor. Podczas sączenia pozbywamy się wielkocząsteczkowych układów, które mogłyby wpływać na zawyżenie wyniku fluorescencji. Fluorescencja sączonego roztworu surowicy w buforze fosforanowym wynosiła 11.0 ± 0.11 U Fl., a bez sączenia 15.6 ± 0.19 U Fl.
- C) Kuvetę kwarcową, która dawała niższe wartości fluorescencji w stosunku do kuvety polistyrenowej. Fluorescencja surowicy w buforze fosforanowym w kuvecie kwarcowej wynosiła 4.8 ± 0.2 , a w polistyrenowej 11.9 ± 0.5 U Fl. Te różnice w wartościach pomiarów fluorescencji świadczą o właściwościach nieinterferujących kuvety kwarcowej.
- D) Przechowywanie materiału biologicznego (surowicy) w temperaturze - 70° C. W tych warunkach poziom AGEs w surowicy utrzymywał się na niezmiennym poziomie przez 30 dni. Pomiaru dokonywano codziennie przez 30 dni, rozcieńczając surowicę 100 razy mierząc fluorescencję przy długości fali emisji 440 nm i wzbudzeniu 370 nm i szczelinie 15 nm. Średnie wartości fluorescencji w ciągu 30 dni wyniosły dla - 70° C 33.16 ± 0.85 U Fl, dla temperatury -20 ° C 34.19 ± 1.55 U Fl, dla +8° C 36.77 ± 15.68 U Fl. Największą trwałość AGEs w surowicy utrzymują podczas przechowywania jej w temperaturze - 70° C.

Wartości referencyjne AGEs.

Zakres stężenia AGEs w grupie kontrolnej przyjmuje wartości od 272 do 540 U Fl/g białka. Średnie wartości stężeń to 401 ± 83 U Fl/g białka. Badanie wykonano u 30 zdrowych osób.

Oznaczanie modyfikowanej oksydatywnie albuminy (IMA).

Stężenie modyfikowanej oksydatywnie albuminy w surowicy oznaczano według metody opisanej przez Bhagavana i in. (Bhagavan i in., 2003).

Zasady metody:

Obecność albuminy zmodyfikowanej w ognisku niedokrwienia IMA (ischemia modified albumin) można wykryć mierząc zdolność albuminy surowicy do wiązania jonów kobaltu (Bhagavan i in., 2003). Metoda polega na kolorymetrycznym oznaczeniu stężenia barwnego kompleksu, jaki powstaje na skutek wiązania jonów kobaltu przez DTT. W warunkach laboratoryjnych IMA oznaczano przez dodanie znanej ilości jonów kobaltu do surowicy krwi. Nadmiar jonów kobaltu oznaczano przez dodanie ditiotreitolu (DTT) tworzącego z jonami Co^{2+} barwny kompleks świadczący o stężeniu jonów kobaltu. Stężenie zmodyfikowanej oksydatywnie albuminy wyliczono jako różnicę w absorbancji światła przy 470 nm między próbkami zawierającymi surowicę i bez surowicy. Jako kontrolę stosowano kalibrator testu Albumin Cobalt Binding (ACB, Roche Cobas Integra).

- 1. $\text{Co}^{2+} + \text{albumina} \rightarrow \text{Co- albumina} + \text{Co}^{2+}$**
- 2. $\text{Co}^{2+} + \text{DTT} \rightarrow \text{Co-DTT}$ (barwny kompleks)**

Aparatura:

Spektrofotometr UV/ Vis LKB Pharmacia (Anglia)

Kuweta akrylowa firmy Sarstedt (Niemcy) d=1 cm

Odczynniki:

Chlorek kobaltu (II) CoCl_2 firmy SIGMA (USA)

1,4-Dithio-DL-threitol (DTT) firmy Biochemika (Kanada)

Chlorek sodu (NaCl) firmy POCH S.A Gliwice (Polska)

Przygotowanie odczynników:

1. Chlorek kobaltu (II) CoCl_2 - zważono 0.5 g CoCl_2 i rozpuszczono w 500 ml wody destylowanej,

- 1,4-Dithio-DL-threitol (DTT) - zważono 3.75 mg DTT i rozpuszczono w 2.5 ml wody destylowanej,
- Chlorek sodu – NaCl – zważono 4.5 g NaCl i rozpuszczono w 500 ml wody destylowanej.

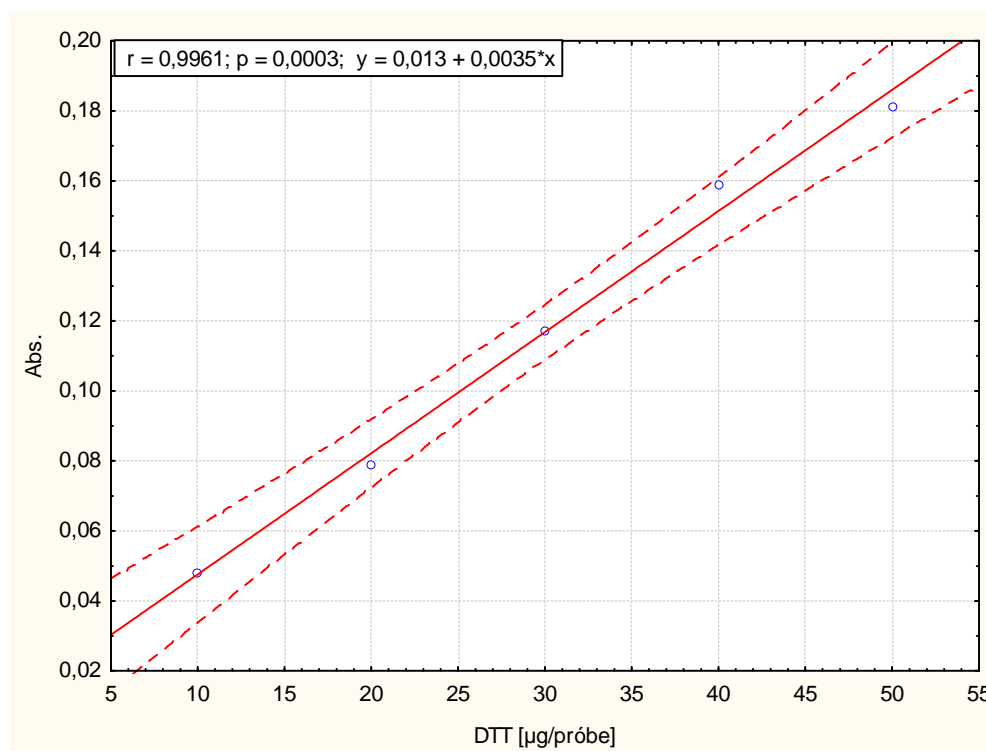
Postępowanie analityczne:

Krew pełną pobierano na czczo, do próbki bez dodatku antykoagulantu, po wykrzepnięciu krew wirowano 5 min. przy 5000 obr./ min. i surowicę oddzielano do osobnej próbki. Do 200 μ l surowicy dodawano 50 μ l chlorku kobaltu, dziesięć minut inkubowano, dodawano następnie 50 μ l DTT i 2 minuty inkubowano i dodawano 1000 μ l chlorku sodu. Próby mierzono przy długości fali 470 nm na aparacie Spektrofotometr UV/ Vis LKB Pharmacia po 30 min. w stosunku do próby ślepej nie zawierającej DTT.

W związku z opracowywaniem metody podjęto następujące postępowania:

1. Wyznaczanie krzywej kalibracji metody.

A) Zbadano zależność absorbancji od ilości DTT przy stałej objętości CoCl_2 .



Rys. 8. Wykres zależności między absorbancją a ilością dodawanego DTT przy stałej i ilości CoCl_2 .

W badanych warunkach występuje wprost proporcjonalna zależność między absorbancją a ilością dodanego DTT.

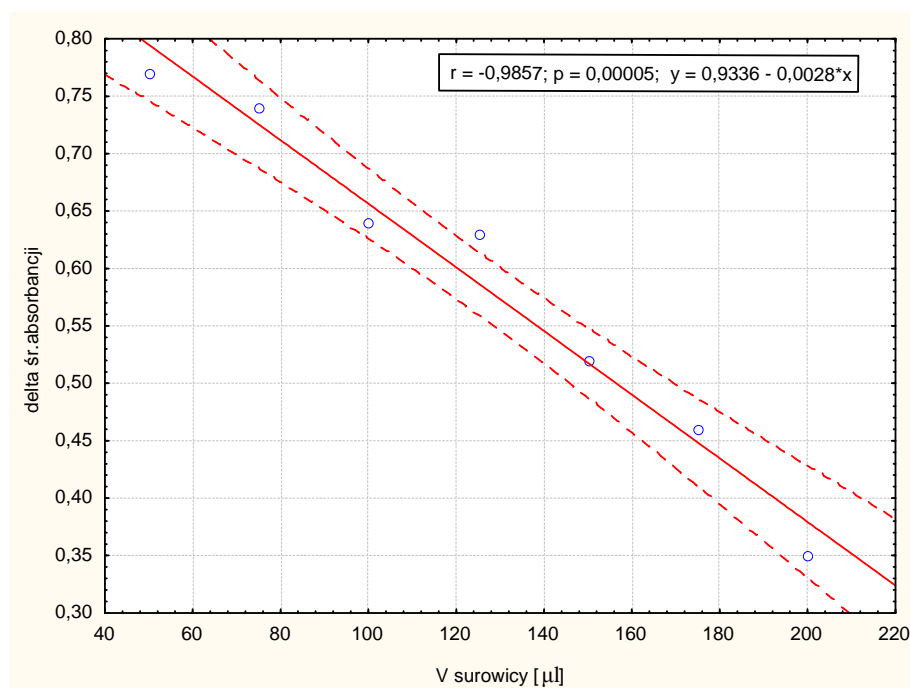
B) Zbadano zależność absorbancji od objętości dodanej surowicy przy stałej objętości CoCl_2 (50 μl) i stałej objętości DTT (50 μl).

Wykonano 7 różnych stężeń (rosnących) surowicy mieszając odpowiednie ilości surowicy i wody (tabela nr 4).

Tabela nr 4. Przygotowane rozcieńczenia surowicy w wodzie.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	Śl.
Surowica [μl]	50	75	100	125	150	175	200	200
H_2O [μl]	150	125	100	75	50	25	-	-

Następnie dodano odczynniki według procedury i mierzono ekstynkcję przy długości fali 470nm po 30 min wobec wody. Każdy wynik był dwukrotnie mierzony i trzy razy powtarzany, wyliczono średni wynik i pomniejszono o wartość ślepej. Dane przedstawiono na wykresie (rys. 9).



Rys. 9. Wykres zależności absorbancji od objętości surowicy w metodzie oznaczania IMA.

W końcowej objętości 1300 μl , próbka zawierała 50 μl CoCl_2 i 50 μl DTT oraz zmienne jak na wykresie objętości surowicy.

Z wykresu przedstawionego na rys. 9 wynika, że zależność między ilością dodanej surowicy a wielkością absorbancji ma charakter liniowy, odwrotnie proporcjonalny. Oznacza to, że im większa zdolność wiązania kobaltu przez albuminę surowicy tym niższa wartość absorbancji światła. Zarazem oznacza to, że zmodyfikowanie oksydacyjne albuminy będzie powodowało wzrost absorbancji.

2. Powtarzalność metody.

Błąd powtarzalności badano w 2 seriach pomiarów ($n=10$) dla dwóch różnych surowic. Średnie wyników obu serii przedstawiono tabeli nr 5.

Tabela nr 5. Ocena błędu precyzji oznaczania IMA w surowicy.

Nr serii pomiarów	1	2
Śr. Δ absorbancji \pm SD	0,34 \pm 0,02	0,42 \pm 0,02
WZ	3,6 %	3,0 %

Podczas oznaczanie modyfikowanej oksydacyjnie albuminy, błąd precyzji osiągał bardzo stabilne wartości rzędu 3.0% - 3.6%.

3. Próba odzysku.

Przygotowano 3 roztwory:

- wodny roztwór surowicy I (100 μl surowicy +100 μl H_2O)
- wodny roztwór surowicy II (100 μl surowicy + 100 μl H_2O)
- mieszaninę wodnych roztworów surowicy I i II (50 μl surowicy I +50 μl surowicy II + 100 μl H_2O).

W tak przygotowanych roztworach oznaczano modyfikowaną oksydacyjnie albuminę według wyżej opisanej metody.

Uzyskano następujące wartości absorbancji

- wodnego roztworu surowicy I – 0.78
- wodnego roztworu surowicy II – 0.86
- mieszaniny wodnych roztworów surowicy I i II – 0.84

Obliczenia:

$$\text{Odzysk: } \frac{1}{2} a + \frac{1}{2} b = c$$

$$\text{Odzysk: } \frac{1}{2} 0.78 + \frac{1}{2} 0.86 = 0.84$$

$$\text{Odzysk: } 0.39 + 0.43 = 0.84$$

$$\text{Odzysk: } 0.82 = 0.84$$

$$\text{Odzysk} = 97.6 \%$$

Wartość odzysku wynosiła 97.6 %.

Podczas pracy analitycznej nad opracowaniem metody oznaczania modyfikowanej oksydatywnie albuminy (IMA) przyjęto następujące warunki techniczne:

- A) Czas rozwijania się barwnego kompleksu. Sprawdzono, że maksymalny czas rozwijania barwnego kompleksu był równy 30 min. i ten czas inkubacji przyjęto w oznaczeniach.
- B) Przechowywanie materiału biologicznego (surowicy). Surowica, w której oznacza się modyfikowaną oksydatywnie albuminę, zachowuje stabilność przez dłuższy czas w temperaturze min. -30°C , podczas długiego okresu pomiędzy pobraniem krwi a oznaczeniem IMA proponuje się przechowywanie materiału badanego w temperaturze -70°C nawet do 6 miesięcy.

Obliczenia jednostki wyrażania modyfikowanej oksydatywnie albuminy.

Stężenie modyfikowanej oksydatywnie albuminy w surowicy wyrażono w jednostkach umownych [U/ml sur.] wykorzystując kalibrator zestawu firmy Roche [Cobas Integraf: Test Albumin Cobalt Binding (ACB)]. 1 jednostka umowna modyfikowanej oksydatywnie albuminy w surowicy [1 U/ml sur.] daje zmianę absorbancji o 0.00366, tak więc 100 jednostek modyfikowanej oksydatywnie albuminy na ml surowicy [100 U/ml sur.] odpowiada absorbancji 0.366.

Do obliczeń stosowano poniższe równanie:

$$C_{\text{bad.}} = (\Delta E_{\text{bad.}} / E_{\text{wz.}}) \times C_{\text{wz.}}$$

$E_{\text{wz.}} = 0,366$ (ekstynkcja wzorca).

$C_{\text{wz.}} = 100$ U/ml (stężenia IMA we wzorcu).

$\Delta E_{\text{bad.}}$ = różnica między ekstynkcją próby badanej a ekstynkcją próby ślepej.

Wartości referencyjne.

Zakres stężenia IMA w grupie kontrolnej przyjmuje wartości od 32.2 do 104.9 U/ml surowicy. Średnie wartości to 76 ± 14 U/ml surowicy. Badanie wykonano u 30 zdrowych osób.

Oznaczanie grup karbonylowych (GK) – produktów peroksydacji białek.

Oznaczenia grup karbonylowych dokonano w oparciu o metodę opracowaną przez Katedrę Żywienia Klinicznego AMG (Garibaldi, Aragno, 1994).

Zasady metody:

Metoda służy do oceny nasilenia stresu oksydacyjnego w organizmie. Oznaczenie oparte jest na reakcji grup karbonylowych białek z 2,4 – dinitrofenylhydrazyną – (DNPH). W wyniku reakcji powstają 2,4-dinitrofenylohydrazony, które mają charakterystyczne żółte zabarwienie i ich stężenie jest oznaczone kolorymetrycznie przy długości fali 370 nm.

Aparatura i oprzyrządowanie:

Aparatura:

Spektrofotometr pracujący w zakresie 0-2 absorbancji przy długości fali 370 nm – aparat Epoll, kuweta 1 cm plastikowa.

Odczynniki i ich przygotowanie:

1. 2 M HCl stężony HCl 35-38% (ok. 32.64 M/l) rozcieńczono 16 razy np. 30 ml stężonego HCl i dopełnić wodą do 480 ml.
2. 10 mM 2,4-DNP w 2 M HCl – odważono 495.35 mg 2,4-DNP i uzupełniono 2 M HCl do objętości 250 ml.
3. 20 % kwas trójchlorooctowy – odważono 100 g kwasu trójchlorooctowego i rozpuszczono w wodzie i dopełniono do objętości 500 ml.
4. 6 M chlorowodorek guanidyny – odważono 275,126 g chlorowodoru guanidyny i 1.306 g KH_2PO_4 rozpuszczono w 200 ml wody, miareczkowano 20 % kwasem trójchlorooctowym do pH 2.3, dopełniono wodą destylowaną do objętości 500 ml.
5. Mieszanina octanu etylu z etanolem w stosunku 1:1 – np. 50 ml octanu etylu i 50 ml 96% etanolu zmieszano w zlewce.

Postępowanie analityczne:

Krew 1 ml pobrano na skrzep. Odwirowano przy 5000 x g przez 5 min. Do oznaczenia użyto 20 μ l surowicy. Surowice można przechowywać w temperaturze $- 20^{\circ}$ C przez 1 miesiąc, dłuższy czas przechowywania wymaga niższych temperatur.

Dla każdej badanej próby oraz standardu przygotowano po 2 próbówki typu eppendorf 1.5 ml. Jedną oznaczono jako badaną drugą jako ślepą. Do próby badanej i ślepej dodano 0.5 ml 2,4 – DNP, do próby ślepej 0.5 ml HCl. Próby inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 h, wortexowano co 10 sek. Po 1 h do próby badanej i ślepej dodano po 1 ml kwasu trójchlorooctowego, następnie wirowano próbki przez 3 min. przy 11000 obrotów/min. Zlano supernatant i zalano osad 1 ml mieszaniny octanu etylu z etanolem, zwortexowano i zostawiono na 10 min. w temp. pokojowej, następnie wirowano przez 3 min. przy 11000 obrotów/min., czynność z mieszaniną octanu etylu i etanolu powtórzono 3-krotnie. Po zlaniu supernatantu do obu probówek dodano 0.6 ml 6 M chlorowodoru guanidyny, zwortexowano przez 10 sek. i zostawiono na 24 h w temp. pokojowej w ciemnym miejscu (do rozpuszczenia osadu). Po 24 h zmierzono absorbancję próbki badanej i ślepej przy długości fali 366 nm. W badanych próbkach wykonano oznaczenie białka całkowitego metodą biuretową standardowo stosowaną w laboratorium z zastosowaniem zestawu firmy Roche, na aparacie Hitachi 704.

Obliczenia:

Od absorbancji próby badanej odjąć absorbancję próbę ślepą. Zawartość grup karbonylowych trzeba obliczyć na podstawie milimolowego współczynnika absorpcji powstałego hydrazonu, który wynosi $22 \text{ mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (0.022 nmol/0.02 ml próby).

Przeliczenie absorbancji z użyciem milimolowego współczynnika absorbancji

$$\Delta \text{ Abs.} / 0.022 \text{ (współczynnik molowy) [nmol/0.02 ml próby]}$$

$$\text{Peroksydacja białka} = (\text{nmol/0.02 ml próby}) / (\text{białko w mg/0.02 ml próby})$$

$$\text{Peroksydacja białka (GK)} = [\text{nmol/ mg białka}]$$

$$\Delta \text{ Abs.} = (\text{Abs.}_{\text{bad.}} - \text{Abs.}_{\text{śl.}})$$

Wartości referencyjne

Zakres stężenia GK w grupie kontrolnej przyjmuje wartości od 0.68 do 2.38 nmol/mg białka. Średnie wartości to 1.58 nmol/mg białka. Badanie wykonano u 30 zdrowych osób.

ANALIZA STATYSTYCZNA

W pracy prowadzono obliczenia przy użyciu programu komputerowego „Statistica 8” firmy Stat-Soft licencjonowanego dla Akademii Medycznej w Gdańsku. W pracy przyjęto poziom istotności statystycznej $p < 0.05$. Każdą zmienną o charakterze ciągłym oceniano pod względem zgodności jej rozkładu z rozkładem normalnym. Zmienne o rozkładzie zgodnym z normalnym analizowano metodami parametrycznymi. Do oceny różnic pomiędzy takimi zmiennymi stosowano test t-Studenta oraz analizę wariancji ANOVA z testami post-hoc. Zmienne, których rozkład odbiegał od rozkładu normalnego analizowano metodami nieparametrycznymi. Dla porównania dwóch zmiennych o charakterze ciągłym stosowano test U Manna-Whitneya. Korelacje oceniano metodą Spearmana.

WYNIKI

I. Grupa kontrolna - ustalenie wartości referencyjnych parametrów badanych.

Badanie przeprowadzono na grupie 30 osób pracowników Akademii Medycznej. W badanej grupie kontrolnej średnie stężenia AGEs w surowicy wynosiły 401 ± 83 Fl/g białka, albuminy oksydatywnie modyfikowanej (IMA) 76 ± 14 U/ml, grup karbonylowych 1.58 ± 0.46 nmoli/mg białka.

Tabela nr 6. Średnie wartości referencyjne w grupie kontrolnej.

	AGEs [Fl/g białka]	IMA [U/ml surowicy]	GK [nM/mg białka]
Grupa kontrolna n=30 (K=21; M=9)	401 ± 83	76 ± 14	$1,58 \pm 0,46$

II. Grupa pacjentów z przewlekłą chorobą nerek.

W grupie pacjentów z przewlekłą chorobą nerek wyróżniono 4 podgrupy:

- 113 pacjentów z przewlekłą chorobą nerek w stadium III – V uszkodzenia nerek (GFR $45 - 6$ [ml/(min./1.73 m²)]), leczonych zachowawczo,
- 43 pacjentów hemodializowanych
- 44 pacjentów dializowanych otrzewnowo,
- 15 pacjentów po zabiegu transplantacji nerki.

W podgrupie pacjentów z przewlekłą chorobą nerek w stadium III – V, leczonych zachowawczo, oznaczano stężenie końcowych produktów glikacji białek (AGEs), stężenie zmodyfikowanej oksydatywnie albuminy (IMA) oraz stężenie grup karbonylowych (GK) i kreatyniny.

W podgrupach pacjentów hemodializowanych i dializowanych otrzewnowo oznaczano stężenie końcowych produktów glikacji białek (AGEs).

W podgrupie pacjentów po zabiegu transplantacji nerki porównywano stężenia AGEs przed i po przeszczepieniu nerki. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli nr 7.

Tabela nr 7. Średnie stężenia AGEs, IMA, GK i kreatyniny w surowicy krwi u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek.

Podgrupa badana	AGEs [Fl/g białka]	IMA [U/ml surowicy]	GK [nM/mg białka]	Kreatynina [mg/dl]
Z przewlekłą chorobą nerek stadium III – V, leczona zachowawczo	706* ± 219	99** ± 107	1,19*** ± 0,57	2,68±1,15 (1,41-8,20)
Hemodializowana	1481* ± 1245	-	-	-
Dializowana otrzewnowo	1407* ± 1631	-	-	-
Po zabiegu transplantacji nerki				
Przed przeszczepieniem	710** ± 398	98** ± 14	-	-
Po przeszczepieniu	545** ± 137	99** ± 13		

* $p < 0.01$ vs gr. kontrolna (gr. kontrolna tab. nr 6)

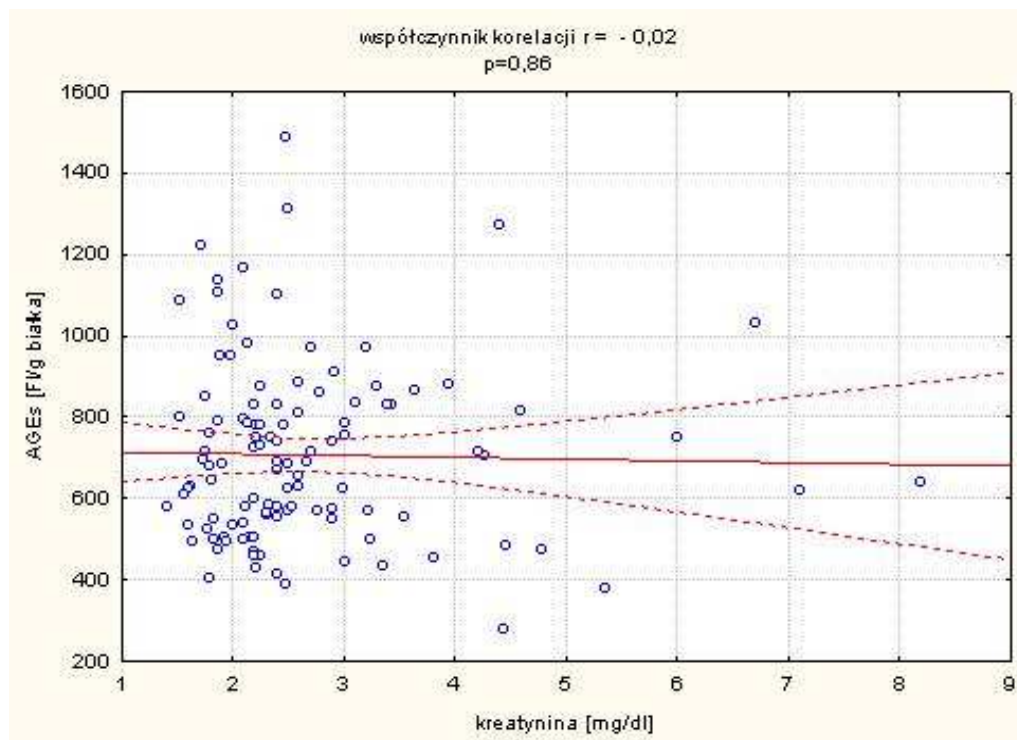
** $p < 0.05$ vs gr. kontrolna

*** $p = 0.003$ vs gr. kontrolna

W grupie pacjentów z przewlekłą chorobą nerek w stadium III – V w okresie leczenia zachowawczego, wartości stężenia AGEs wynosiły średnio 706 ± 219 Fl/g białka; wartości stężenia modyfikowanej oksydatywnie albuminy (IMA) wynosiły średnio 99 ± 107 U/ml surowicy; wartości stężenia grup karbonylowych (GK) wynosiły średnio 1.19 ± 0.57 nM/mg białka. Uzyskane wyniki AGEs jak i IMA były wyższe niż w grupie kontrolnej odpowiednio o 76% ($p < 0.01$) i 30% ($p < 0.05$). Wysoka wartość SD dla wyników IMA, sugeruje znaczną heterogenność tej grupy pacjentów.

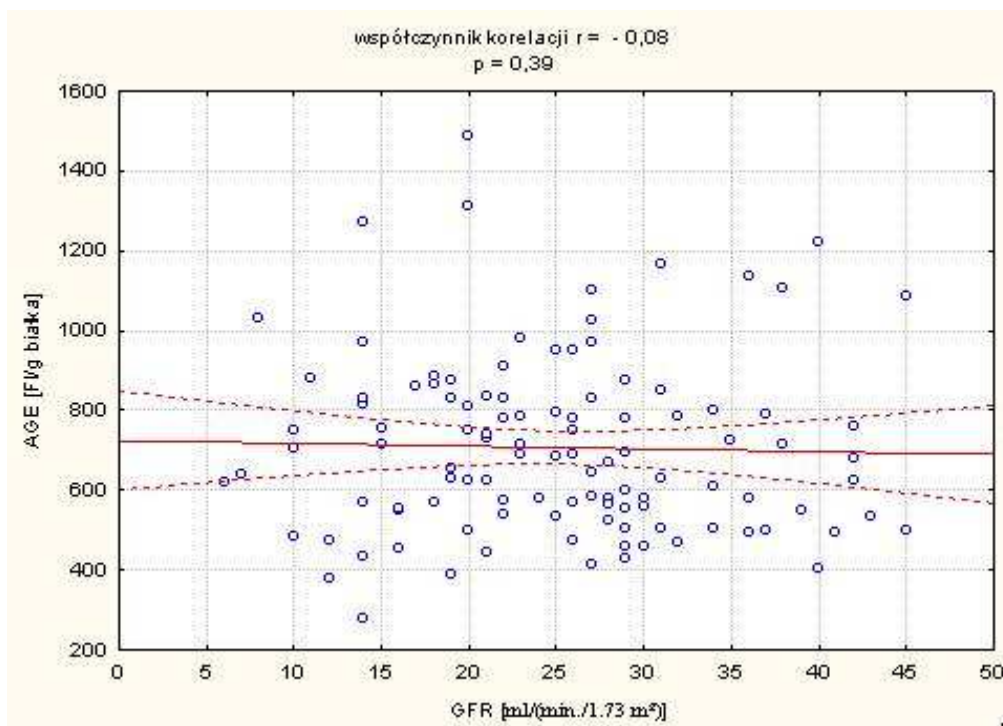
Stężenia grup karbonylowych w tej grupie pacjentów przyjmowały wartości niższe niż w grupie kontrolnej i były to różnice istotne statystycznie ($p = 0.003$). Stężenia kreatyniny były średnio 2 razy wyższe w stosunku do wartości referencyjnych.

Nie wykazano korelacji pomiędzy AGEs a stężeniami kreatyniny u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek w stadium III – V w okresie leczenia zachowawczego ($r=-0.02$, $p=0.86$) (rys. 10).



Rys. 10. Wykres korelacji pomiędzy stężeniem AGEs a stężeniem kreatyniny u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek stadium III - V, leczonych zachowawczo.

Nie uzyskano również korelacji między współczynnikiem przesączania kłębuszkowego (GFR) a stężeniami AGEs ($r = -0.08$, $p = 0.39$) (rys. 11)



Rys. 11. Wykres korelacji pomiędzy stężeniem AGEs a GFR u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek w stadium III - V, leczonych zachowawczo.

Nie wykazano również w tej grupie pacjentów zależności istotnych statystycznie między AGEs i IMA ($r=-0.04$, $p= 0.64$), AGEs i GK ($r=0.14$, $p=0.14$), stężeniem kreatyniny a IMA ($r=- 0.05$, $p=0.6$), stężeniem kreatyniny a GK ($r=-0.03$, $p=0.7$), IMA a GK ($r=0.03$, $p=0.8$).

W grupie pacjentów hemodializowanych średnia wartość stężenia AGEs wynosiła 1481 ± 1245 Fl/g białka. Uzyskane wyniki AGEs były 3.6 razy wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej i różnica ta była wysoce znamienna statystycznie ($p<<0.01$).

W grupie pacjentów dializowanych otrzewnowo wartości stężenia AGEs wynosiły 1407 ± 1631 Fl/g białka. Uzyskane wyniki były znamienne 3.5 razy wyższe niż w grupie kontrolnej i różnica ta była wysoce znamienna ($p<<0.01$).

W grupie pacjentów dializowanych otrzewnowo jak i hemodializowanych zwraca uwagę rozproszenie wyników (wysoka wartość SD), sugerujące znaczną heterogenność tych grup pacjentów. Dodatkowo nie wykazano różnic istotnych

statystycznie w stężeniach AGEs pomiędzy grupą hemodializowanych a dializowanych otrzewnowo ($p>0.05$).

W grupie pacjentów po zabiegu transplantacji nerki, uzyskane wartości stężenia AGEs przed przeszczepieniem nerki i po przeszczepieniu nerki były znacznie wyższe niż w grupie kontrolnej ($p<0.05$). Przed przeszczepieniem nerki stężenia AGEs wynosiły 710 Fl/g białka, natomiast po przeszczepieniu wartości stężenia AGEs wynosiły 545 Fl/g białka. Uzyskano niższe wartości stężenia AGEs po przeszczepieniu nerki względem wartości stężeń oznaczonych przed przeszczepieniem. Nie wykazano jednak, że wartości stężenia AGEs obniżyły się znacząco po przeszczepieniu nerki w stosunku do wartości stężeń AGEs uzyskanych przed przeszczepieniem ($p=0.15$).

Wartości stężenia IMA przed i po przeszczepieniu nerki praktycznie nie różniły się między sobą, natomiast w obu przypadkach były wyższe o 30 % od wartości stężeń w grupie kontrolnej i były to różnice istotne statystycznie ($p<0.05$). Dodatkowo nie wykazano korelacji pomiędzy stężeniami IMA i AGEs zarówno przed przeszczepieniem nerki ($r=0.24$, $p=0.39$) jak i po przeszczepieniu nerki ($r=0.14$, $p=0.63$).

III. Pacjenci z cukrzycą typu 2.

Badaniami objęto 50 pacjentów z cukrzycą typu 2, u których oznaczano w surowicy krwi stężenie końcowych produktów glikacji białek (AGEs), stężenie modyfikowanej oksydatywnie albuminy (IMA), stężenie grup karbonylowych (GK) oraz kreatyniny. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli nr 8.

Tabela nr 8. Średnie wartości stężenia AGEs, IMA, GK, kreatyniny, HbA1C w surowicy krwi u pacjentów z cukrzycą typu 2.

AGEs [Fl/g białka]	IMA [U/ml surowicy]	GK [nM/mg białka]	Kreatynina [mg/dl]	HbA1C [%]
506* ± 191	94** ± 30	1,38 ± 0,87	1,41 ± 0,88	7,9 ± 2,2

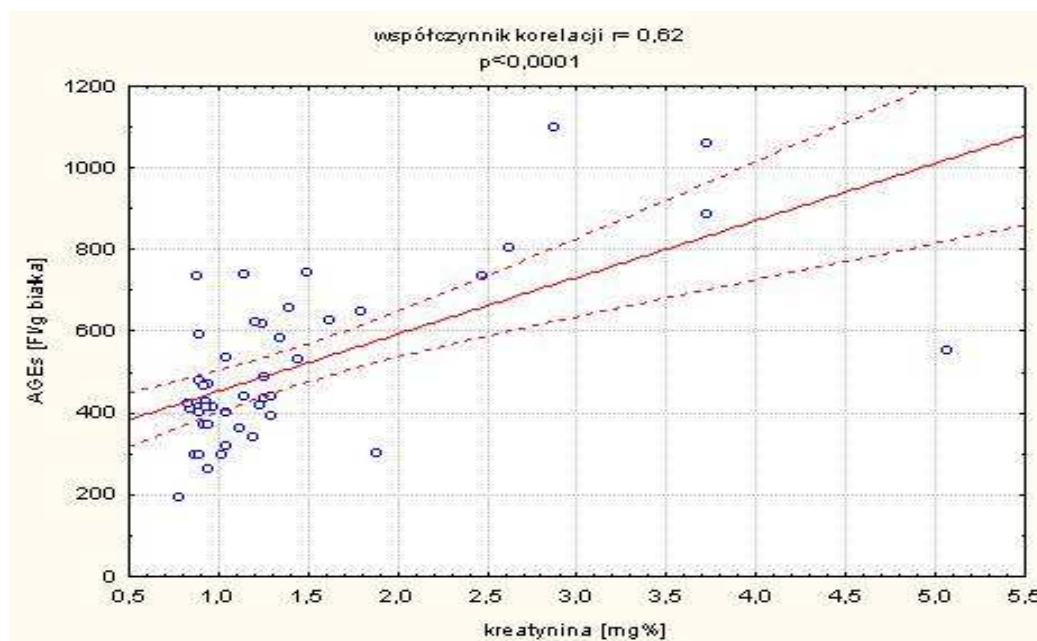
* $p=0.008$ vs grupa kontrolna (gr. kontrolna – tab.6)

** $p=0.004$ vs grupa kontrolna

W grupie pacjentów z cukrzycą typu 2 wartości stężenia AGEs średnio wyniosły: 506 ± 191 Fl/g białka; wartości stężenia IMA średnio wyniosły: 94 ± 30 U/ml surowicy; GK średnio wyniosły: 138 ± 0.87 nM/mg białka; średnia wartość kreatyniny wynosiła: 1.41 ± 0.88 mg/dl. Średnie wartości glikowanej hemoglobiny uzyskane z kart pacjentów wyniosły 7.9 ± 2.2 g/dl.

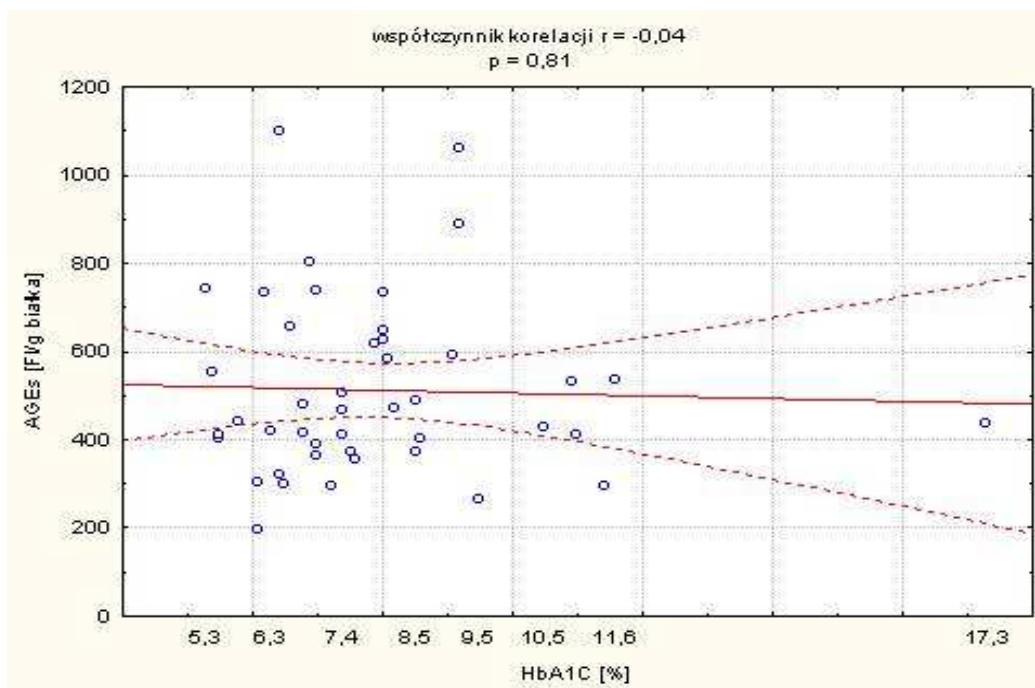
Uzyskane wyniki stężenia AGEs w grupie pacjentów z cukrzycą były znamienne wyższe (+26%) niż w grupie kontrolnej ($p=0.008$). Wykazano również wyższe wartości stężenia IMA w grupie badanej (+24%) względem grupy kontrolnej ($p=0.004$)

Wartości stężenia GK były natomiast w zakresie wartości referencyjnych (GK vs grupa kontrolna $p=0.22$). Wykazano również znamiennej korelację pomiędzy stężeniem kreatyniny w surowicy a stężeniem AGEs ($r=0.62$, $p<0.0001$) (rys. 12).



Rys. 12. Wykres korelacji pomiędzy stężeniem AGEs a stężeniem kreatyniny u pacjentów z cukrzycą typu 2.

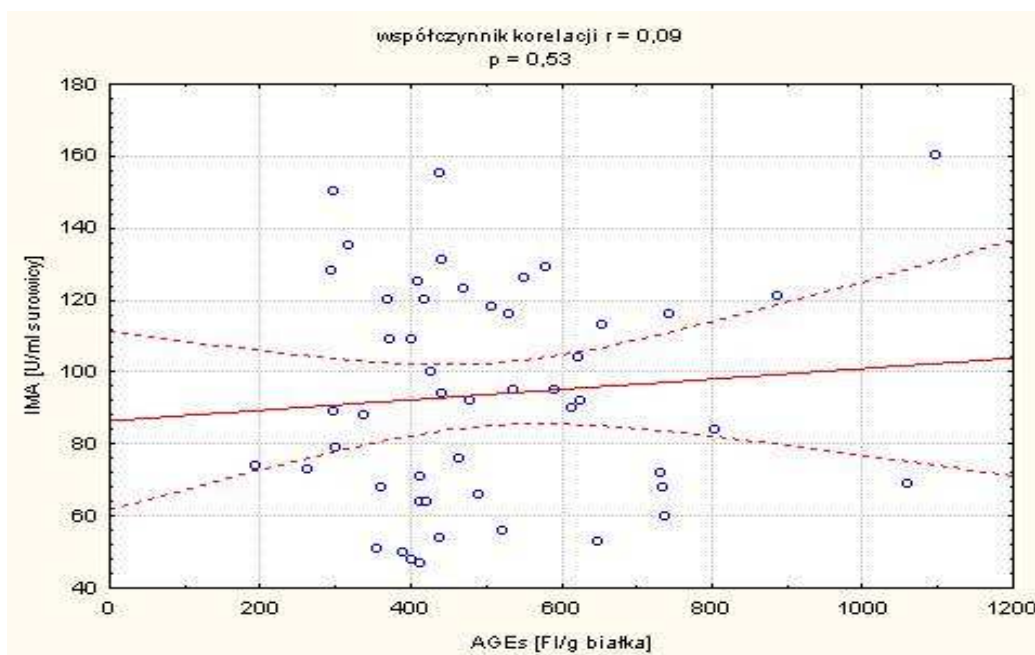
Badano zależność stężenia końcowych produktów glikacji białek (AGEs) od stężenia glikowanej hemoglobiny (HbA1C) (rys. 13).



Rys. 13. Wykres korelacji AGEs i HbA1C u pacjentów z cukrzycą typu 2.

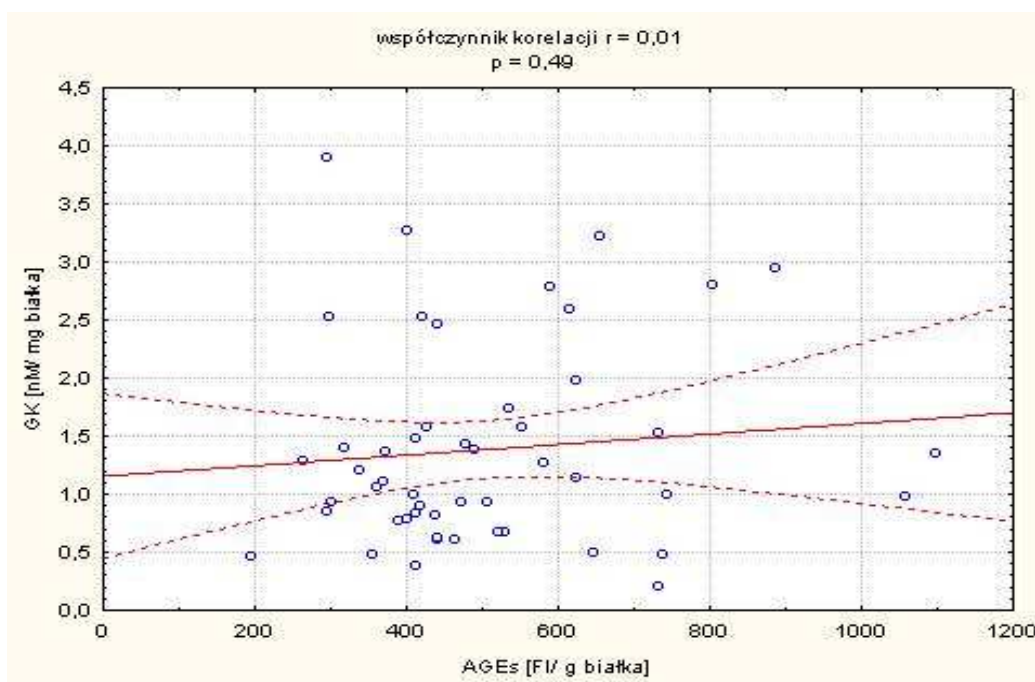
Nie wykazano istotnych statystycznie zależności między końcowymi produktami glikacji białek a glikowaną hemoglobiiną ($r = -0,04$, $p = 0,81$).

Nie wykazano również istotnych statystycznie korelacji między stężeniami AGEs i IMA u pacjentów z cukrzycą typu 2 ($r = 0,09$, $p = 0,53$) (rys. 14).



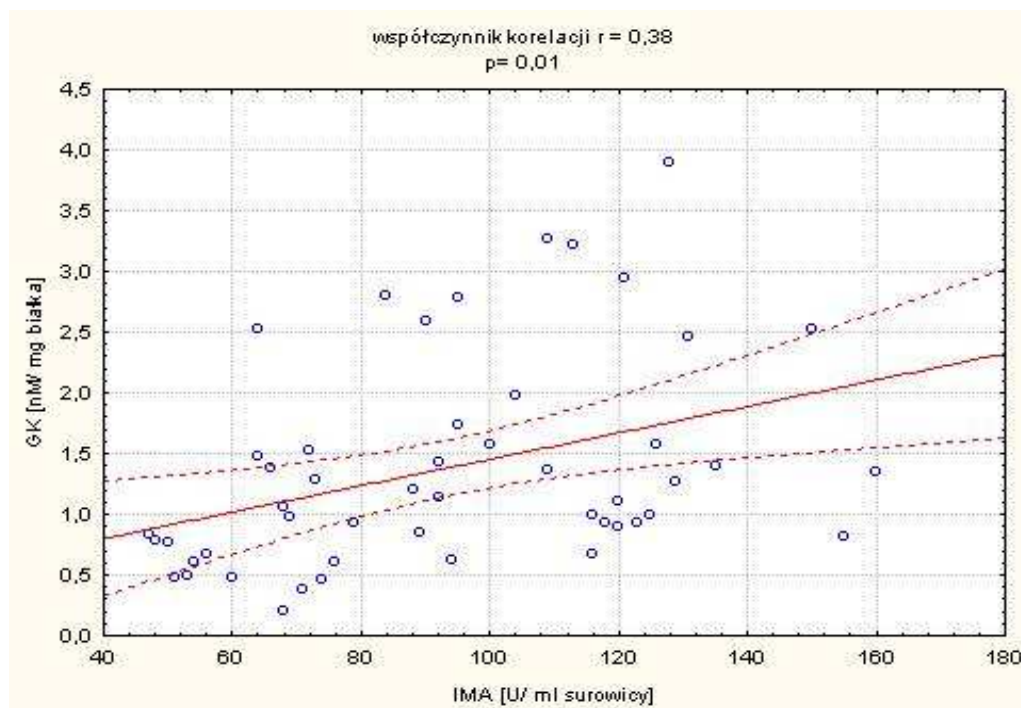
Rys. 14. Wykres korelacji AGEs i IMA u pacjentów z cukrzycą typu 2.

Wykazano również brak zależności istotnych statystycznie między stężeniem AGEs i GK u pacjentów z cukrzycą typu 2 ($r=0.10$, $p=0.49$) (rys. 15). Dodatkowo nie wykazano różnic istotnych statystycznie między stężeniem IMA a kreatyniną ($r=0.15$, $p=0.30$).



Rys. 15. Wykres korelacji AGEs i GK u pacjentów z cukrzycą typu 2.

Wykazano natomiast korelację między stężeniem modyfikowanej oksydacyjnie albuminy (IMA) a stężeniem grup karbonylowych (GK) u pacjentów z cukrzycą typu 2 ($r=0.38$, $p=0.01$) (rys. 16).



Rys. 16. Wykres korelacji IMA i GK u pacjentów z cukrzycą typu 2.

IV. Grupa pacjentów z chorobą niedokrwienną serca.

W tej populacji pacjentów porównano stężenia IMA w różnych odstępach czasowych. Badanie przeprowadzono u pacjentów, u których wykonano planową przezskórną rewaskularyzację mięśnia sercowego (angioplastykę z użyciem balonu - PTCA) (tabela nr 9) oraz w grupie pacjentów z objawami bólu w klatce piersiowej bez zmian w badaniu EKG (tabela nr 10).

W grupie pacjentów z chorobą niedokrwienną serca, badano dynamikę zmian stężenia IMA w trakcie rewaskularyzacji naczyń wieńcowych. Krew do badań pobierano w pięciu punktach czasowych:

I: przed zabiegiem

II: bezpośrednio po zabiegu

III: 1 godzina po zabiegu

IV: przy usunięciu koszulki (6 godzin po zabiegu)

V: 24 godziny po zabiegu.

W grupie pacjentów z bólem w klatce piersiowej bez zmian w badaniu EKG pomiaru dokonywano w dwóch punktach czasowych:

I: pojawienie się bólu w klatce piersiowej

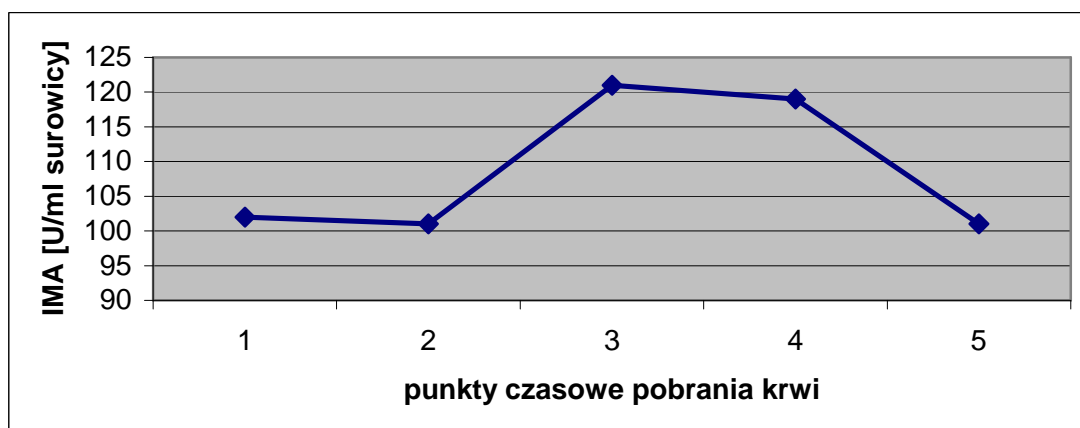
II: doba od pojawienia się bólu w klatce piersiowej

Wyniki przedstawiono w tabeli 9 i 10.

Tabela nr 9. Wartości średnich stężeń IMA u pacjentów z chorobą wieńcową serca, u których wykonano planową przeszskórną rewaskularyzację mięśnia sercowego.

Punkty czasowe pobrania krwi (n=19)	IMA [U/ml surowicy]
I: przy przyjęciu pacjenta (n =17)	102* ± 12
II: tuż po zabiegu (n =13)	101*± 37
III: 1 h po zabiegu (n =19)	121* ± 26
IV: przy usunięciu koszulki (6 h), (n =19)	119* ± 30
V: 24 h po zabiegu, (n =17)	101* ± 28

*p < 0.005 - I, II, III, IV, V vs gr. kontrolna (gr. kontrolna tab. nr 6).



Rys. 17. Stężenia IMA w pięciu punktach czasowych u pacjentów z przeszskórną rewaskularyzacją mięśnia sercowego.

Stężenia modyfikowanej oksydacyjnie albuminy (IMA) w grupie badanej we wszystkich punktach czasowych były wyższe względem grupy kontrolnej od 32% do 60%, te różnice były znamienne statystycznie ($p < 0.005$). Najwyższe wartości stężenia mierzonego parametru obserwowano w pierwszej godzinie po zabiegu, wzrost rzędu 16%, w stosunku do wartości początkowego stężenia. Natomiast tendencję spadkową stężenia mierzonego parametru stwierdzono już w szóstej godzinie od zakończenia zabiegu, następnie w ostatnim punkcie czasowym - po 24 godzinach od przeprowadzonego zabiegu, dalej obserwowano spadek stężenia mierzonego parametru (rys. 17).

Tabela nr 10. Średnie stężenia IMA w grupie pacjentów z bólem w klatce piersiowej bez zmian w badaniu EKG.

Punkty czasowe pobrania krwi (n=8)	IMA [U/ml surowicy]
I: pojawienie się bólu w klatce piersiowej	88* ± 12
II: doba od pojawienia się bólu w klatce piersiowej	97* ± 18

*p < 0.05 - I, II, vs gr. kontrolna (gr. kontrolna tab. nr 6).

W grupie pacjentów z chorobą niedokrwinną serca, u których pojawił się ból w klatce piersiowej przy jednoczesnym braku zmian w badaniu EKG, wartości stężenia IMA średnio wynosiły: w momencie pojawienia się incydentu bólu – 88 ± 12 U/ml surowicy, po 24 godzinach od pojawienia się bólu – 97 ± 18 U/ml surowicy. Wartości stężenia IMA w obu pobraniach były wyższe niż wartości w grupie kontrolnej, były to różnice znamienne statystyczne (p<0.05), nie wykazano jednak różnic istotnych statystycznie między poszczególnymi pobraniami (p=0.2).

V. Pacjenci poddawani zabiegom operacyjnym.

Pacjenci włączeni do tej grupy różnili się podstawową jednostką chorobową (nozologiczną), wyjściowym stanem klinicznym, czasem trwania zabiegu operacyjnego. Wspólnym mianownikiem było natomiast prowadzenie znieczulenia ogólnego i uraz związany z zabiegiem chirurgicznym.

Uzyskane wyniki oznaczeń stężeń końcowych produktów glikacji białek (AGEs), modyfikowanej oksydacyjnie albuminy (IMA) i grup karbonylowych (GK) przedstawiono w tabeli nr 11 dla wszystkich pacjentów, w tabeli nr 12, 13, 14 przedstawiono stężenia badanych parametrów zależnie od ryzyka ocenianego w skali ASA.

Tabela nr 11. Średnie stężenia AGEs, IMA, GK w całej populacji pacjentów poddawanych zabiegom operacyjnym.

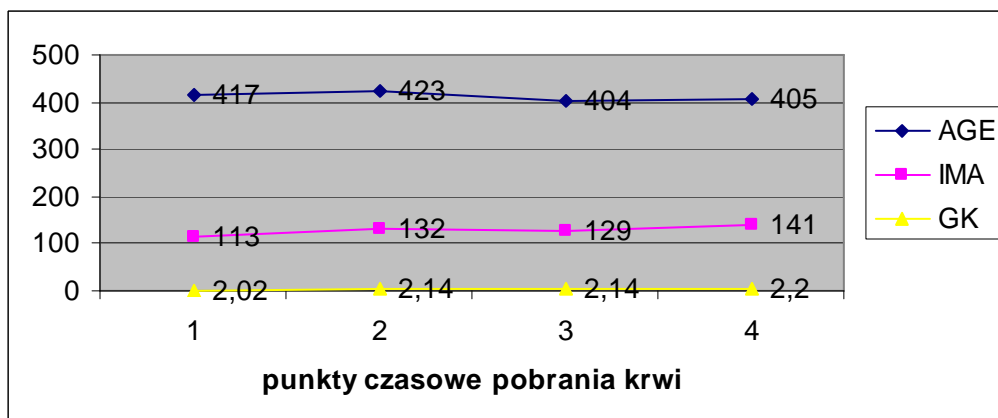
Parametry (n= 91)	Punkty czasowe pobrania krwi			
	I przed zabiegiem	II po intubacji	III 30 min. zabiegu	IV wybudzenie
AGEs [Fl/mg białka]	417 ± 180	423 ± 154	404 ± 127	405 ± 173
IMA [U/ml surowicy]	113* ± 31	132** ± 32	129** ± 25	141** ± 44
GK [nM/mg białka]	2,02 ± 1,3	2,14 ± 1,3	2,14 ± 1,3	2,20***± 1,4

*p<0.001 vs gr. kontrolna (gr. kontrolna - tab. nr 6)

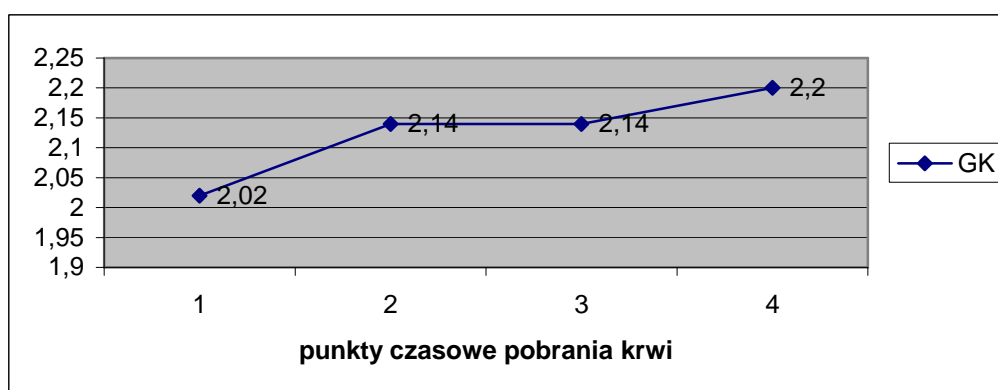
**p<0.001 II,III, IV pobranie vs I pobrania

***p<0.05 IV pobranie vs grupa kontrolna

W grupie pacjentów poddawanych zabiegom operacyjnym, wartości stężenia AGEs były porównywalne ze stężeniem w grupie kontrolnej (p=0.65) we wszystkich badanych punktach czasowych. Wartości stężeń GK w trzech pierwszych punktach czasowych pobrań krwi nie różniły się istotnie statystycznie od stężeń uzyskanych w grupie kontrolnej. W ostatnim punkcie czasowym zaobserwowano natomiast różnicę stężeń grup karbonylowych znamiennej statystycznie w stosunku do wartości stężeń w grupie kontrolnej (p<0.05). Uzyskane wyniki stężeń IMA w grupie 91 pacjentów były znamienne wyższe (113 ± 31 U/ml surowicy) niż w grupie kontrolnej (76 ± 14 U/ml surowicy) (p<0.001) i dotyczyło to każdego punktu czasowego, a zwłaszcza przy intubacji (II pobranie) i po wybudzeniu pacjenta (IV pobranie) (rys. 18). Wszystkie stężenia IMA uzyskane w trakcie zabiegu i po wybudzeniu pacjenta były istotnie statystycznie wyższe niż stężenia IMA przed rozpoczęciem zabiegu (p<0.001). Dodatkowo wykazano różnicę istotną statystycznie między stężeniami IMA w 30 minucie zabiegu i po wybudzeniu pacjenta (p<0.05).



Rys. 18. Stężenia AGEs, IMA, GK w grupie pacjentów poddawanych zabiegom operacyjnym, w czterech punktach czasowych pobrania krwi.



Rys. 19. Stężenia GK w grupie pacjentów poddawanych zabiegom operacyjnym, w czterech punktach czasowych pobrania krwi.

Na rysunku 18 i 19 przedstawiono dynamikę zmian stężeń poszczególnych parametrów. Wartości stężeń AGEs były na poziomie wartości stężeń referencyjnych, dodatkowo obserwowano spadek wartości stężeń AGEs (bez różnic istotnych statystycznie) w poszczególnych punktach czasowych pobrania krwi. Stężenia IMA wzrastały w poszczególnych punktach czasowych. Wartości stężeń GK wykazywały tendencję wzrostową (bez różnic istotnych statystycznie trzech kolejnych pobrań krwi względem grupy kontrolnej) w poszczególnych punktach czasowych, najwyższą wartość znamioną statystycznie uzyskały podczas wybudzenia pacjenta (rys. 19).

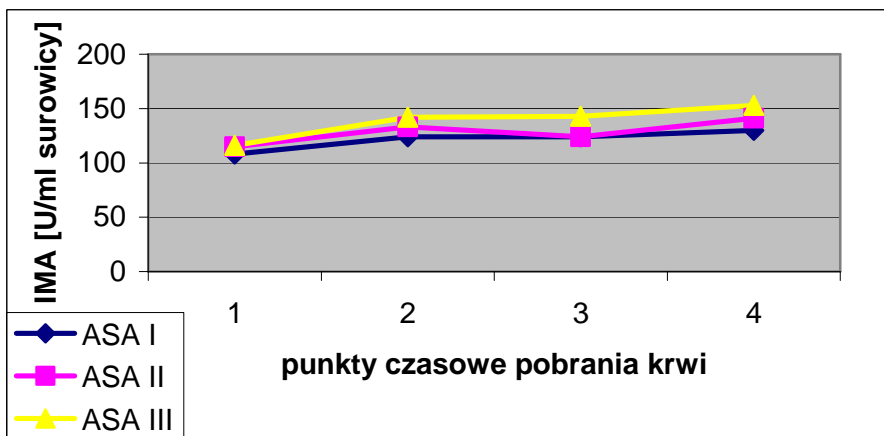
Tabela nr 12. Średnie stężenia IMA (U/ml surowicy) w różnych grupach ryzyka wg skali ASA.

Grupa ryzyka	Punkty czasowe			
	I pobranie	II pobranie	III pobranie	IV pobranie
ASA I n=30	108 ± 38	124* ± 25	124* ± 22	130* ± 28
ASA II n=34	115 ± 29	133* ± 31	124* ± 21	141* ± 36
ASA III n=24	116 ± 24	142* ± 38	142* ± 31	153* ± 40

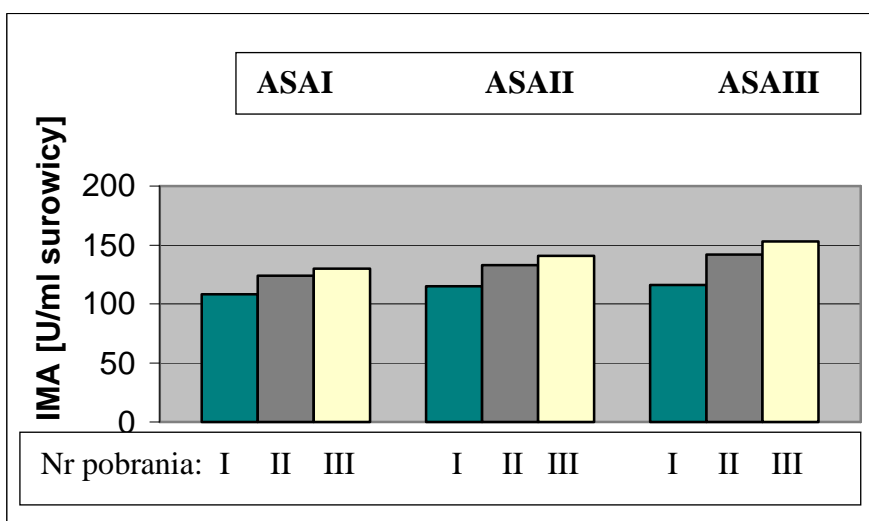
*p<0.05 – I vs II, III, IV.

We wszystkich grupach ryzyka wykazano istotną statystycznie różnicę między stężeniami IMA przed zabiegiem a kolejnymi punktami czasowymi (p<0.05). Obserwowano również wyższe wartości stężenia IMA w poszczególnych punktach czasowych w zależności od stopnia skali ASA.

Sprawdzono zależność stopnia niedotlenienia od skali ryzyka ASA. Jednoczynnikowa analiza wariancji wykazała efekt skali ASA. Szczegółowa analiza wykazała, że najwyższe stężenia IMA są w grupie ASA III (142 U/ml surowicy) w porównaniu z ASA II i ASA I (124 U/ml surowicy) przy p=0.009. Analiza wariancji nie ujawniła innych efektów głównych, ale wykazano istotne różnice w stężeniu IMA między ASA I a ASA III po intubacji pacjenta (II pobranie) (p=0.049), między ASA I i ASA III (p=0.009), oraz ASA II i ASA III (p=0.005) w 30 minucie zabiegu (III pobranie), między ASA I i ASA III (p=0.03) po wybudzeniu pacjenta (IV pobranie). Dodatkowo szczegółowe analizy statystyczne wykazały, że przed zabiegiem (I pobranie) nie ma różnic istotnych statystycznie między stężeniami IMA a grupami w skali ASA.



Rys. 20. Stężenia IMA dla ASA I, ASA II i ASA III w grupie pacjentów poddawanych zabiegom operacyjnym.



Rys. 21. Stężenia IMA zależne od skali ASA w różnych punktach czasowych.

Rysunek 20 i 21 pokazują, że wartości stężeń IMA we krwi, związane są ze skalą ASA i w zależności od stopnia ryzyka choroby uzyskują wyższe wartości.

Tabela nr 13. Średnie stężenia AGEs (Fl/mg białka) w różnych grupach ryzyka wg skali ASA.

Grupa ryzyka	Punkty czasowe			
	I pobranie	II pobranie	III pobranie	IV pobranie
ASA I	393 ± 153	404 ± 112	418 ± 122	405 ± 150
ASA II	416 ± 207	395 ± 104	383 ± 100	396 ± 178
ASA III	423 ± 163	472 ± 231	404 ± 138	406 ± 201

Analiza jednoczynnikowa wariancji wykazała, że nie ma różnic istotnych statystycznie w stężeniach AGEs pomiędzy grupami ASA.

Tabela nr 14. Średnie stężenia GK (nmole/mg białka) w różnych grupach ryzyka wg skali ASA.

Grupa ryzyka	Punkty czasowe			
	I pobranie	II pobranie	III pobranie	IV pobranie
ASA I	2,14 ± 1,49	2,29 ± 1,49	1,98 ± 1,04	2,42 ± 1,53
ASA II	2,00 ± 1,19	2,14 ± 1,07	2,24 ± 1,48	1,99 ± 1,63
ASA III	1,72 ± 0,79	1,94 ± 1,00	2,13 ± 1,38	2,20 ± 1,15

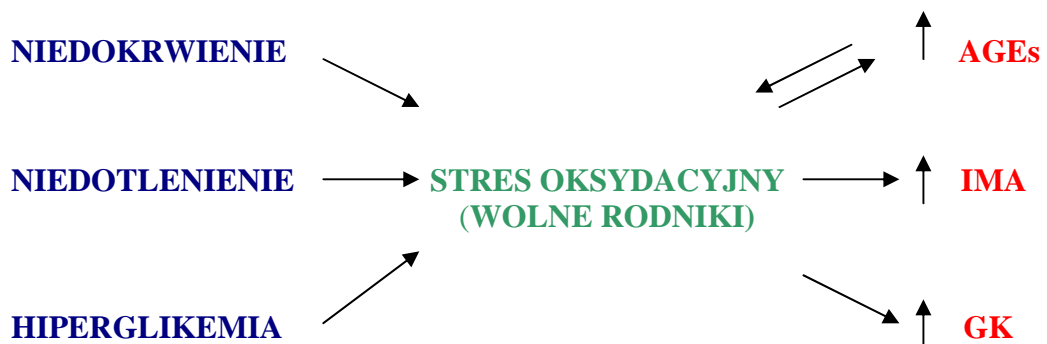
Obserwowano różnice w stężeniach GK w zależności od przynależności pacjenta do grup ryzyka w skali ASA (tabela nr 14).

Jednak jednoczynnikowa analiza wariancji nie wykazała efektu głównego, czyli istotnych różnic w stężeniach GK pomiędzy grupami pacjentów w skali ASA.

DYSKUSJA

Hiperglikemia jest jednym z czynników powodujących uszkodzenie śródbłonna naczyniowego, pobudza również nadprodukcję wolnych rodników tlenowych. W warunkach zwiększonej obecności substratów (węglowodany, glikowane białka) dla procesów oksydacji, dochodzi do większego zapotrzebowania na antyoksydanty. W konsekwencji prowadzi to do zaburzenia równowagi pro i antyoksydacyjnej.

Nadmierny stres oksydacyjny w połączeniu z hiperglikemią prowadzi do powstawania końcowych produktów glikacji białek (AGEs). Pojawia się mechanizm „błędnego koła”, ponieważ nagromadzenie się AGEs w organizmie sprzyja jednocześnie nasileniu stresu oksydacyjnego oraz zmniejszeniu stężenia tlenu azotu, co w konsekwencji może prowadzić do pojawienia się powikłań sercowo - naczyniowych (rys. 22).



Rys. 22. Schemat zależności warunków stresu oksydacyjnego, niedotlenienia i hiperglikemii na wzrost AGEs, IMA, GK.

W przedstawianej pracy oznaczono końcowe produkty glikacji białek (AGEs), które są wskaźnikiem długotrwałego stresu oksydacyjnego. Oznaczono również produkty peroksydacji białek, czyli grupy karbonyłowe (GK), które są markerem nadprodukcji reaktywnych form tlenu, oraz modyfikowaną oksydatywnie albuminę (IMA), która jest markerem niedotlenienia pojawiającym się podczas krótkotrwałego stresu oksydacyjnego.

Wspólnym mianownikiem dla oznaczanych parametrów w prezentowanej pracy są warunki ich powstawania, czyli stres oksydacyjny, który wiąże się z powikłaniami sercowo-naczyniowymi. Z przedstawionego rysunku (rys. 22) wynika jednoznacznie, że wszystkie procesy związane z powstawaniem wolnych rodników są ze sobą sprzężone.

Końcowe produkty glikacji białek (AGEs).

W warunkach patologicznych, kiedy białka podlegają ekspozycji na zwiększone stężenie cukrów redukujących (hiperglikemia) lub wolnych rodników (stres oksydacyjny), proces nieenzymatycznej glikacji przebiega szybciej (Książek, Wiśniewska, 2001).

Obecność końcowych produktów glikacji białek obserwuje się w różnych narządach (Styszyński i in., 2001):

- w nerkach, gdzie odkładanie się glikowanych białek w kłębuszkach nerkowych prowadzi do powstania ich złogów, z czasem do stwardnienia kłębuszków i osłabienia ich funkcji,
- w soczewce oka, gdzie glikacja krystaliny jest jednym z prawdopodobnych mechanizmów rozwoju zaćmy,
- w układzie nerwowym, gdzie gromadzenie się karboksymetylolizyny, w niektórych neuronach mózgu nasuwa podejrzenie, że AGEs mogą mieć swój udział w procesie starzenia się neuronów oraz przyczyniać się do rozwoju choroby Alzheimera,
- w nerwach obwodowych, gdzie glikacja białek mieliny odgrywa prawdopodobnie istotną rolę w neuropatii cukrzycowej oraz upośledzeniu funkcji nerwów u osób starszych,
- w tkance płuc, która traci właściwości sprężyste i płuca nie rozciągają się tak łatwo przy pobieraniu powietrza, wpływa to na pojemność oddechową płuc,
- w tkance chrzęstnej, w których zauważa się proporcjonalny do ilości AGEs spadek zawartości proteoglikanów. Wskazuje to na możliwość uczestnictwa AGEs w rozwoju choroby zwyrodnieniowej stawów,

- w kościach, w nich również podejrzewa się działalność AGEs, powodują one wzrost i różnicowanie się tkanki kostnej, co ma odgrywać istotną rolę w postępującej z wiekiem osteoporozie.

Glikacja albuminy upośledza jej funkcje transportowe, zmniejszając jej zdolność do transportu bilirubiny i długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Glikacja białka błony erytrocytów obniża jej właściwości sprężyste i zdolność erytrocytów do odkształcania w naczyniach włosowatych (Styszyński i in., 2001). Aktywność glikowanej katepsyny B ulega zahamowaniu, co ogranicza przekształcanie proinsuliny w insulinę. Kondensacja antytrombiny III z cukrami redukującymi prowadzi do przewagi procesów krzepnięcia nad procesami fibrynolizy (Słowik-Żyłka i in., 2001). Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, enzymu będącego elementem układu przeciwutleniaczy, pod wpływem glikacji jest zahamowana. Prowadzi to do rozwoju tzw. stresu oksydacyjnego w komórce. Kolagen modyfikowany w procesie glikacji powoduje sieciowanie tkanki i tworzenie wiązań krzyżowych; zwiększa to sztywność włókien kolagenowych, obniżając ich rozpuszczalność oraz podatność na trawienie enzymatyczne i utrudniając w ten sposób jego regenerację. Kwasy nukleinowe charakteryzujące się długim okresem półtrwania, również mogą ulegać kondensacji z grupami karbonyłowymi cukrów, co w konsekwencji prowadzi do zmian w materiale genetycznym.

Mnogość przedstawionych przykładów dowodzi wielorakich skutków biologicznych procesu nieenzymatycznej glikacji białek. Obserwuje się również, że wraz z wiekiem zawartość AGEs w tkankach i płynach ustrojowych wzrasta. Prawdopodobną przyczyną tego stanu jest zmniejszone ich usuwanie. Może to być spowodowane pogarszającą się z wiekiem wydolnością mechanizmów przebudowy tkanek i struktury macierzy pozakomórkowej, można przypuszczać więc, że rolę w usuwaniu końcowych produktów glikacji białek, mogą odgrywać nerki (Scolnik i in., 1991). Należy również podkreślić, że oznaczane w pracy markery stresu oksydacyjnego, powstające w stanach nadprodukcji wolnych rodników, stanach niedotlenienia i niedokrwienia organizmu oraz w warunkach hiperglikemii, mogą wiązać się z nasilonym ryzykiem chorób układu sercowo – naczyniowego.

- **AGEs w grupie pacjentów z przewlekłą chorobą nerek.**

W prezentowanej pracy badano stężenia AGEs u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek w stadium od III do V. We wszystkich podgrupach badanych, stężenia AGEs w surowicy były istotnie statystycznie wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej (tabela nr 7).

W grupie pacjentów z przewlekłą chorobą nerek w stadium od III do V, leczonych zachowawczo uzyskano o połowę niższe wartości AGEs, w stosunku do pacjentów hemodializowanych i dializowanych otrzewnowo. Stężenia AGEs wynosiły 706 ± 219 Fl/g białka. Stopień wydolności nerek w tej grupie pacjentów (GFR) był w zakresie od 45 do 6 [ml/(min./1.73 m²)]. Niższe wartości stężeń AGEs w stosunku do pacjentów hemodializowanych (1481 ± 1245 Fl/g białka) i dializowanych otrzewnowo (1407 ± 1631 Fl/g białka) może wskazywać na lepszy stopień wydolności nerek w grupie pacjentów z przewlekłą chorobą nerek leczonych zachowawczo, który może wynikać z krótszego czasu uszkodzenia kłębków nerkowych. Wiele danych wskazuje, że AGEs są czynnikiem patogenetycznym w uwarunkowanej czasem trwania patologii kłębków nerkowych (Misselviz i in., 2002).

W trakcie terapii zachowawczej w przewlekłej chorobie nerek, pacjenci stosują również ograniczenia białkowe w codziennej diecie, co może również wpływać na niższe stężenie AGEs, w tej grupie pacjentów, w stosunku do pacjentów hemodializowanych i dializowanych otrzewnowo.

Natomiast istotnie statystycznie wyższe stężenia AGEs u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek leczonych zachowawczo w stosunku do grupy kontrolnej są wynikiem upośledzonego ich wydalania przez nerki, ponadto mogą potwierdzać hipotezę, którą postawił Miyata, że u chorych z przewlekłą chorobą nerek, istnieje związek pomiędzy procesami oksydacyjnymi, a glikacją białek prowadzącą do tworzenia AGEs. Stres oksydacyjny u tych pacjentów może nasilać formowanie i gromadzenie tych toksycznych związków (Miyata i in., 2001).

W prezentowanej pracy sprawdzono zależność między stężeniem kreatyniny a stężeniem AGEs u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek leczonych zachowawczo, nie wykazano jednak korelacji pomiędzy tymi parametrami ($r = -0.02$, $p = 0.86$) (rys. 10).

Nie wykazano również korelacji pomiędzy współczynnikiem filtracji kłębuszkowej GFR a stężeniami AGEs ($r = -0.08$, $p = 0.39$) (rys. 11) w tej grupie pacjentów. Można więc przypuszczać, że nasilona akumulacja końcowych produktów glikacji białek mogła mieć związek z warunkami nadmiernego stresu oksydacyjnego, a nie tylko wynikać z upośledzonego procesu ich usuwania drogą nerek (Miyata i in., 1997).

U pacjentów z przewlekłą chorobą nerek obserwuje się również różnice znamienne statystycznie w stężeniach receptorów AGEs (RAGE) pomiędzy grupą osób zdrowych i pacjentów z przewlekłą chorobą nerek (Tanji i in., 2000; Brown, 2008). Mogą być one więc potencjalnymi markerami we wczesnej diagnozie oraz monitoringu postępującego rozwoju dysfunkcji nerek w przewlekłej chorobie nerek (Brown, 2008).

Najwyższe stężenia AGEs obserwowano w grupie pacjentów hemodializowanych (1481 ± 1245 Fl/g białka) i dializowanych otrzewnowo (1407 ± 1631 Fl/g białka); nie wykazano jednak różnic istotnych statystycznie pomiędzy obydwoma grupami ($p > 0.05$). Pomimo braku różnic w stężeniach AGEs między pacjentami hemodializowanymi a dializowanymi otrzewnowo, należy podkreślić, że ich wysokie stężenia w obu grupach, mogą z jednej strony wynikać z upośledzenia wydalania i degradacji AGEs w nerkach, a z drugiej strony z nadmiernej ich produkcji pod wpływem stresu oksydacyjnego.

Wzmożona produkcja wolnych rodników u tych chorych, może być wynikiem niedotlenienia tkanek, obecności toksyn mocznicowych, zaburzonej gospodarki pierwiastkami śladowymi (Martin-Mateo i in., 1999).

Według piśmiennictwa leczenie pacjentów za pomocą dializy otrzewnowej to stan szczególnie sprzyjający powstawaniu AGEs, ze względu na używanie płynów dializacyjnych zawierających glukozę w zakresie $83.2 - 235.8$ mmola/l. Glukoza reaguje z białkami znajdującymi się w otrzewnej, co prowadzi do zwiększonej produkcji i gromadzenia się AGEs.

Dodatkowo odkładanie się AGEs w ścianie naczyń i w obrębie tkanki łącznej ma związek z upośledzeniem przepuszczalności otrzewnej. Między innymi Nakayama (Nakayama i in., 1997) udowodnił związek między długością dializy otrzewnowej, a akumulacją AGEs w obrębie otrzewnej. U pacjentów rozpoczynających terapię oznaczano niewielkie ilości AGEs a po 3 i 7 latach stosowania dializy otrzewnowej obserwowano bardzo znaczny wzrost stężenia AGEs (Nakayama i in., 1997).

W badaniach Małgorzewicz i in. (Małgorzewicz i in., 2005), uzyskano również istotnie statystycznie wyższe stężenia AGEs u pacjentów dializowanych otrzewnowo w stosunku do grupy kontrolnej. W tej pracy porównywano stężenia AGEs u pacjentów dializowanych otrzewnowo z cukrzycą i bez cukrzycy (z cukrzycą AGEs: 1248 ± 339 Fl/g białka; bez cukrzycy AGEs: 1094 ± 323 Fl/g białka). Pomimo wyższych stężeń AGEs w grupie pacjentów dializowanych otrzewnowo z cukrzycą, nie było różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupami (Małgorzewicz i in., 2005).

Natomiast uzyskane wyniki mogą potwierdzać hipotezę Miyaty (Miyata i in., 1997), że u pacjentów dializowanych otrzewnowo czynnikiem powodującym zwiększoną produkcję AGEs może być stres oksydacyjny, hiperglikemia, jak również upośledzone wydalanie tych produktów przez nerki oraz podczas dializy.

Uważa się również, że u pacjentów hemodializowanych zabieg dializy nie powoduje efektywnego usuwania AGEs (Makita i in., 1991), a co więcej niektóre krążące AGEs w ogóle nie są usuwane drogą nerek, czy drogą dializy, jak na przykład 3-deoksyglukozon (Hasuike i in., 2002). Dlatego zwiększone stężenie AGEs, u chorych hemodializowanych, wynika z upośledzonego ich wydalania, jak również z nadmiernej produkcji w warunkach stresu oksydacyjnego i akumulacji.

Wydaje się więc, że AGEs można uważać za wskaźnik długotrwałego stresu oksydacyjnego, związki te uznawane są również za czynniki sprzyjające powstawaniu powikłań okresu dializoterapii np. sercowo – naczyniowych (Małgorzewicz, Łysiak-Szydłowska, 2005).

U chorych hemodializowanych obserwuje się również znaczne podwyższenie innych parametrów wskazujących na obecność stresu oksydacyjnego np: malonyldialdehydu, obniżenie parametrów bariery antyoksydacyjnej: dysmutazy

ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT) oraz zaburzenia w zawartości mikropierwiastków (selenu, cynku i miedzi) (Martin-Mateo i in., 1999).

Ostatnią analizowaną grupą pacjentów z przewlekłą chorobą nerek, u których oznaczano stężenia AGEs, to pacjenci po zabiegu transplantacji nerki. Stężenia AGEs w tej grupie badanych zarówno przed przeszczepieniem nerki (710 ± 398 Fl/g białka) jak i po (545 ± 137 Fl/g białka) były istotnie statystycznie wyższe niż w grupie kontrolnej. Niższe stężenia AGEs u pacjentów po przeszczepieniu, choć nieznamiennie statystycznie ($p=0.15$) w stosunku do stężeń przed przeszczepieniem nerki, może świadczyć o tendencji do usuwania AGEs przez przeszczepioną nerkę, chociaż w pracy nie badano wydalania AGEs z moczem u tych chorych. Jakkolwiek nie można wykluczyć, że prowadzona w tym okresie intensywne terapia immunosupresyjna miała dodatkowy wpływ na obniżenie stężenia mierzonego parametru.

- **AGEs u pacjentów z cukrzycą typu 2.**

Stężenia AGEs w grupie pacjentów z cukrzycą typu 2 były znamienne wyższe niż w grupie kontrolnej ($p= 0.008$), wynosiły 506 ± 191 Fl/g białka (tabela nr 8). Oznaczana równocześnie HbA1C, która odzwierciedla stężenia glukozy w ostatnich 2 – 3 miesiącach poprzedzających badanie, o średnich wartościach $7.9 \pm 2.18\%$ w badanej grupie, wskazuje na średnie stężenie glukozy w osoczu rzędu 205 mg/dl według danych z badania Diabetes Control and Complications Trial (Rohlfing i in., 2002). Takie wartości stężeń glukozy w osoczu wskazują na przewlekłe stany hiperglikemii w tej grupie pacjentów i mogą stanowić warunki sprzyjające powstawaniu AGEs (Lee, 1992).

W prezentowanej pracy nie udało się jednak wykazać korelacji pomiędzy stężeniem AGEs a glikowaną hemoglobina (HbA1C). Podobny brak korelacji uzyskano w pracy (Kilhovd i in., 1999), w której autorzy tłumaczą, że może on wynikać z różnych okresów półtrwania tych związków. W cytowanej pracy nie wykazano również korelacji pomiędzy receptorami AGEs (RAGE), którym

przypisuje się znaczącą rolę w usuwaniu końcowych produktów glikacji białek, a poziomem glikemii u pacjentów z cukrzycą (Kilhovd i in., 1999).

W grupie pacjentów z cukrzycą typu 2 wykazano za to znamienne korelację pomiędzy stężeniem kreatyniny w surowicy a AGEs ($r=0.62$, $p<0.0001$). Średnie stężenia kreatyniny w tej grupie badanej wyniosły 1.41 ± 0.88 mg/dl, i wskazują na początkowe upośledzenie filtracji kłębuszkowej nerek. Uzyskane wyniki mogą wskazywać, że u chorych na cukrzycę z upośledzoną funkcją nerek, można oczekiwać podwyższonych stężeń AGEs na skutek przewlekłych stanów hiperglikemicznych (HbA1C: $7.9 \pm 2.18\%$, co stanowi 205 mg/dl glukozy w osoczu (Rohlfing i in., 2002)), nadmiernego stresu oksydacyjnego, co w konsekwencji może prowadzić do istotnych powikłań w cukrzycy typu nefropatia. Podobną korelację uzyskano w pracy (Yan i in., 2003).

Depozycję AGEs obserwuje się w blaszkach miażdżycowych. Badania również wykazały, że istnieje związek między ciężkością choroby wieńcowej a stężeniem AGEs w surowicy (Kanauchi i in., 2001).

- **AGEs u pacjentów poddawanych zabiegom operacyjnym.**

Końcowe produkty glikacji białek oznaczano u pacjentów poddawanych zabiegom operacyjnym, u których wykonywano zabieg w pełnym znieczuleniu. Wartości stężeń AGEs były porównywalne z grupą kontrolną we wszystkich badanych punktach czasowych podczas całego zabiegu chirurgicznego ($p=0.65$) (tabela nr 11). Można przypuszczać więc, że AGEs jest raczej markerem długotrwałego stresu oksydacyjnego a warunki przeprowadzanych zabiegów operacyjnych, których średni czas trwania wynosił 108.8 min. nie powodowały znaczących wzrostów stężeń tego parametru.

Ponadto średnie stężenia AGEs oznaczone przed zabiegiem chirurgicznym (417 ± 180 Fl/mg białka, tabela nr 11) porównywalne z grupą kontrolną mogą wskazywać, że badana grupa pacjentów nie była narażona na istotne czynniki sprzyjające formowaniu się końcowych produktów glikacji białek, a heterogenność grupy badanej mogła dodatkowo wpływać na wyniki AGEs.

W grupie pacjentów poddawanych zabiegom operacyjnym porównywano również stężenia AGEs pomiędzy grupami skali ASA. Skala ta ma na celu standardowe określenie fizycznego stanu chorego przygotowywanego do zabiegu operacyjnego. Analizy statystyczne wykazały, że nie ma różnic istotnych statystycznie w stężeniach AGEs pomiędzy grupami ASA, tak więc można wnioskować, że fizyczny stan chorego określany w skali ASA w grupie badanej nie wiązał się ze stężeniami AGEs (tabela nr 13).

Uzyskane wyniki w grupie pacjentów poddawanych zabiegom operacyjnym, pozwalają przypuszczać, że warunki prowadzonego zabiegu chirurgicznego, jak również stopień ryzyka podczas zabiegu wynikający ze stanu pacjenta, nie powodowały wzrostu stężeń AGEs. Proces powstawania zaawansowanych produktów glikacji białek jest procesem długotrwałym, a warunki towarzyszące ich powstawaniu to długotrwały stres oksydacyjny, nadmierne działanie wolnych rodników oraz stany hiperglikemiczne.

Produkty peroksydacji białek (grupy karbonyłowe - GK) w odpowiedzi na stres oksydacyjny.

Udział aktywnych form tlenu obserwuje się w patomechanizmie ponad 100 chorób, od malarii przez AIDS do wstrząsu krwotocznego (Masotti i in., 1988; Papadopulos-Eleopulos, 1992; Halliwell, 1993;). Można wyróżnić choroby, w których stwierdza się (Del Maestro, 1986):

- wzrost generacji wolnych rodników: zachodzących wewnątrzkomórkowo, zewnątrzkomórkowo, i w obu tych przestrzeniach jednocześnie.
- obniżenie generacji wolnych rodników: zachodzące wewnątrzkomórkowo, zewnątrzkomórkowo.

Wzrost wewnątrzkomórkowej generacji wolnych rodników obserwujemy przy załamaniu wewnątrzkomórkowych mechanizmów ochronnych i nadmiernej produkcji aktywnych form tlenu. Należą do nich: zespoły hiperoksygenacyjne (Arduini i in., 1988; Hoshino i in., 1988; Sauqstad, 1992; Kornacka, 1993) np. zwłóknienie pozasoczkowe, zespół niedokrwienia (reperfuzji), dysplazja oskrzelowa (płucna u noworodków), nadmierne natlenowanie ustroju przy

stosowaniu respiratorów, hiperoksja hiperbaryczna, zespoły niedotlenienia (Floyd, 1990) np. zawał serca, udar mózgu, anemia hemolityczna indukowana lekami (Del Maestro, 1980; Berger i in., 1990; Aruoma i in., 1991), niedobór witaminy A lub E (Pelissier i in., 1989; Chow, 1991), środki chemiczne – leki np. bleomycyna, nitrofurantoina, lub karcynogeny (Krall i in., 1988; Sun, 1990; Jendryczko, 1993) a także starzenie się organizmu (Cutler, 1986; Jenkins, 1992).

Wzrost zewnątrzkomórkowej generacji aktywnych form tlenu obserwujemy w ostrych i przewlekłe stanach zapalnych, zachodzących w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, gdzie dochodzi do aktywacji leukocytów: makrofagów i monocytów, które uwalniają O_2^- do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Karnovsky i in., 1988). Wzrost poziomu wolnych rodników w przestrzeni zewnątrzkomórkowej stwierdzany jest w przebiegu ostrych infekcji oraz przewlekłych zapaleń tkanki łącznej, chorób reumatycznych, stanów zapalnych jelit i naczyń oraz chorób immunologicznych (Barnett, 1991; Halliwell i in., 1992).

Wzrost wewnątrz – i zewnątrzkomórkowej generacji aktywnych form tlenu zachodzi podczas napromieniowania ustroju promieniami ultrafioletowymi, w radioterapii, chorobie popromiennej. Napromieniowanie prowadzi do radiolizy molekuł wody i powstania rodnika hydroksylowego. Dodatkowo ekspozycja na chemiczne kancerogeny takie jak: ozon, NO_2 , oraz palenie tytoniu powodują wzrost wewnątrz – i zewnątrzkomórkowej generacji aktywnych form tlenu (Pryor, 1987).

Zewnątrzkomórkową generację aktywnych form tlenu obserwuje się w przebiegu zapaleń a obniżenie zdolności redukcji O_2 do O_2^- prowadzi do zwiększenia wrażliwości na różne infekcje. (Del Maestro, 1980; Robac i in., 1992). Przyjmuje się również znaczący udział aktywnych form tlenu w patomechanizmie powikłań cukrzycy (Jennings, 1988; Beals i in., 1993;). Zaobserwowano wzrost poziomu nadtlenuków lipidowych u pacjentów z naczyniowymi powikłaniami cukrzycy (Stringer i in., 1989) i uznano, że peroksydacja lipidów jest fundamentalnym czynnikiem tych powikłań (Sinclair i in., 1992).

W prezentowanej pracy oznaczano produkty peroksydacji białek, jako grupy karbonylowe u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek leczonych zachowawczo, pacjentów z cukrzycą typu 2, u pacjentów poddawanych zabiegom operacyjnym.

- **GK u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek leczonych zachowawczo.**

Stężenia produktów peroksydacji białek (GK), jako wskaźnik stresu oksydacyjnego mierzono u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek leczonych zachowawczo. Wartości GK wynosiły średnio 1.2 ± 0.6 nM/mg białka i przyjmowały wartości niższe niż w grupie kontrolnej, były to różnice istotne statystycznie ($p=0.003$). Nie wykazano również związku pomiędzy GK a innymi wskaźnikami stresu oksydacyjnego tj. końcowymi produktami glikacji białek i modyfikowaną oksydacyjnie albuminą (AGEs vs GK: $r=0.14$, $p=0.14$; IMA vs GK: $r=0.03$, $p=0.8$), pomimo ich istotnie wyższych wartości stężeń (tabela nr 7). Nie wykazano również korelacji między stężeniami produktów peroksydacji białek a stężeniem kreatyniny ($r=-0.03$, $p=0.7$).

Niższe istotnie statystycznie stężenia produktów peroksydacji białek w grupie pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek leczonych zachowawczo, mogą wynikać ze stosownych ograniczeń dietetycznych w zakresie spożywanego białka oraz hipoalbuminemii obecnej u niektórych pacjentów (Kopple, Masery, 2004). Nie można wykluczyć wpływu niedożywienia oraz prowadzonej terapii na wielkość stężeń GK, chociaż nie było to przedmiotem badań.

- **GK u pacjentów z cukrzycą typu 2**

W prezentowanej pracy w grupie pacjentów z cukrzycą typu 2 oznaczano stężenia produktów peroksydacji białek (GK). Wartości stężeń GK były w zakresie wartości referencyjnych (GK vs grupa kontrolna $p=0.22$). Wykazano również brak istotnych statystycznie korelacji między stężeniami AGEs i GK u pacjentów z cukrzycą typu 2 ($r=0.1$, $p=0.49$) (rys. 15). Pomimo podwyższonych stężeń AGEs w tej grupie pacjentów, które mogłyby wskazywać na warunki stresu oksydacyjnego i stany hiperglikemiczne, wartości stężeń produktów peroksydacji białek były porównywalne z wartościami w grupie kontrolnej, co

mogłoby sugerować względną niezależność procesów powstawania AGEs i grup karbonylowych.

Na uwagę zasługuje uzyskana korelacja między stężeniami produktów peroksydacji białek (GK) a stężeniami modyfikowanej oksydatywnie albuminy (IMA) ($r=0.38$, $p=0.007$). Można przypuszczać, że nasilenie niedotlenienia związanego z niedokrwieniem (wzrost IMA), może mieć wpływ na stężenie markerów stresu oksydacyjnego np. grup karbonylowych (GK) (Lushchak, 2007). W sytuacji niedotlenienia tworzenie grup karbonylowych ulega intensyfikacji.

Uważa się, że u pacjentów z cukrzycą, przewlekłe stany hiperglikemii są czynnikiem powodującym uszkodzenie śródbłonna naczyniowego oraz stymulującym zwiększoną produkcję wolnych rodników (Chappey i in., 1997). Ich obecność może wskazywać na zwiększoną możliwość powikłań typu mikro i makroangiopatii, a w konsekwencji na zwiększone ryzyko sercowo – naczyniowe (Chappey i in., 1997).

- **GK u pacjentów poddawanych zabiegom operacyjnym.**

Stężenia produktów peroksydacji białek oznaczano również u pacjentów poddawanych zabiegom operacyjnym. Obserwowano tendencję wzrostową wartości tego parametru w poszczególnych punktach czasowych (rys. 19). Nie uzyskano różnic istotnych statystycznie w stężeniach GK przed zabiegiem chirurgicznym, po intubacji i w 30 min. zabiegu w stosunku do grupy kontrolnej (tabela nr. 11), natomiast istotnie wyższe wartości stężeń GK wykazano po wybudzeniu pacjentów - po zakończonym zabiegu operacyjnym, w stosunku do grupy kontrolnej ($p<0.05$). Uzyskane znamienne wyższe wartości GK mogą wskazywać na warunki zwiększonego stresu oksydacyjnego, który mógł występować podczas wykonywanego zabiegu operacyjnego, lub na stany niedokrwienia (niedotlenienia), o których świadczyć mogą istotnie wyższe stężenia modyfikowanej oksydatywnie albuminy (IMA) (tabela nr. 11).

U pacjentów poddawanych zabiegom operacyjnym porównywano również stężenia GK pomiędzy grupami skali ASA, która ma na celu standardowe określenie fizycznego stanu chorego przygotowywanego do zabiegu

operacyjnego. Zastosowane analizy nie wykazały wpływu skali ASA na wartości stężeń produktów peroksydacji białek. Tak więc można przypuszczać, iż stan fizyczny chorego poddawanego zabiegowi operacyjnemu i klasyfikacja pacjentów według skali ASA nie ma związku ze stężeniami GK.

Modyfikowana oksydatywnie albumin (IMA).

Rolę wczesnego markera ostrego niedotlenienia mięśnia sercowego może spełniać modyfikowana oksydatywnie albumina a dokładniej, jak podają autorzy frakcja „albuminy zmodyfikowanej w ognisku niedokrwienia” (IMA) (Bar-Or i in., 2001). Powstawanie IMA związane jest z ze stresem oksydacyjnym, podczas którego generowany jest nadmiar wolnych rodników, przyczyniających się do uszkodzenia tkanek w miejscu odczynu zapalnego. IMA jest frakcją albuminy, która w wyniku działania reaktywnych form tlenu w miejscu niedotlenienia utraciła N-końcową resztę lizyny, co upośledza jej zdolność do wiązania i transportowania metali przejściowych tj. jonów kobaltu (+2), czy niklu (+2) (Bar-Or i in., 2001).

Oznaczanie stężeń IMA może wskazywać na obecność obszarów niedokrwienia i deficytu tlenowego w mięśniu sercowym, które powstają w wyniku postępującej niedrożności naczynia wieńcowego w pierwszej fazie zawału (Bhagavan i in. 2003). Oznaczanie modyfikowanej oksydatywnie albuminy daje również możliwości oceny wielkości „szkód reperfuzyjnych”, występujących jako efekt zwiększenia przepływu krwi przez pierwotnie niedotlenioną tkankę w wyniku udrożnienia naczyń wieńcowych (Naskalski, 2000; Naskalski 2006). Oznaczanie stężenia IMA w niedokrwionym fragmencie mięśnia sercowego stwarza nadzieje na lepszą ocenę uszkodzenia mięśnia sercowego zarówno u pacjentów z zawałem serca, jak i u chorych z nawracającym i przewlekłym niedotlenieniem mięśnia sercowego w przebiegu niestabilnej dławicy piersiowej (Christensson i in., 2001). IMA jest stosunkowo nowym wskaźnikiem niedokrwienia i pomimo różnych możliwości, jakie niesie ze sobą oznaczanie stężeń IMA, na które wskazuje cytowane powyżej piśmiennictwo, ostatecznie autorzy podają, że oznaczanie stężeń IMA powinno być oceniane, raczej jako wskaźnik prognostyczny dla zagrażającego niedokrwienia, niż jako test potwierdzający ostry epizod wieńcowy. IMA jest również zbyt mało swoistym markerem niedotlenienia

mięśnia sercowego. Podwyższone wartości stężeń IMA, możemy obserwować u wszystkich chorych, u których doszło do epizodu niedokrwienia w mięśniu sercowym, w mięśniach szkieletowych lub innych narządach (Zapico-Muniz i in., 2004). Podejrzewa się również wzrost stężeń IMA w niedokrwionym udarze mózgu, u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek i u niektórych chorych z nowotworami (Borderie i in., 2004).

- **IMA w grupie kontrolnej.**

W prezentowanej pracy oznaczano wartości IMA w grupie 30 zdrowych osób, średnie wartości wynosiły 76 ± 14 U/ml. (tabela nr 6), podobne wartości stężeń IMA w grupie referencyjnej zdrowych ludzi, uzyskali Gidenne i in. (Gidenne i in., 2004), którzy badali przydatność testu ACB (Albumin Cobald Binding) do oznaczania oksydatywnie modyfikowanej albuminy. Autorzy cytowanej pracy podają, że stężenia IMA przyjmują wartości od 57.87 – 92.00 U/ml, zaobserwowali również różnice istotne statystycznie między średnim stężeniem IMA u kobiet (77.7 U/ml) i mężczyzn (75.83 U/ml). Pomimo braku rozróżnienia stężeń IMA w zależności od płci, w prezentowanej pracy, uzyskane średnie wartości stężeń, w grupie kontrolnej, są podobne i oscylują wokół średniej wartości - 75 U/ml. Również w pracy Wu i in. (Wu i in., 2001) oraz Gidenne i in. (Gidenne i in., 2004) uzyskano na większej populacji podobne wyniki u osób zdrowych rzędu 60 U/ml.

W niniejszej pracy oznaczano stężenia modyfikowanej oksydatywnie albuminy (IMA) u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek w tym: leczonych zachowawczo i po zabiegu transplantacji nerki, u pacjentów z cukrzycą typu 2, z chorobą niedokrwioną serca oraz u pacjentów poddawanych zbiegom chirurgicznym.

- **IMA u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek.**

U pacjentów z przewlekłą chorobą nerek, leczonych zachowawczo, stwierdzono wzrost stężeń IMA o 30 % w porównaniu do grupy kontrolnej (tabela nr 7), różnice te były istotne statystycznie wyższe ($p < 0.05$) podobnie jak wykazał to Borderie i in. (Borderie i in., 2004). Natomiast nie udało się wykazać korelacji

między stężeniem kreatyniny a stężeniem IMA ($r=-0.05$, $p=0.6$). W grupie pacjentów leczonych zachowawczo, nie wykazano również istotnych statystycznie korelacji między innymi oznaczanymi markerami stresu oksydacyjnego a stężeniami IMA (AGEs vs IMA: $r=-0.04$, $p=0.64$; GK vs IMA: $r=0.03$, $p=0.8$). Na uwagę zasługują jednak istotnie wyższe wartości stężeń IMA, w tej grupie, w stosunku do grupy kontrolnej ($p<0.05$). Podwyższone stężenia IMA mogą sugerować obecność subklinicznego niedokrwienia w tej grupie pacjentów, która stanowi grupę ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych.

Istotnie wyższe wartości stężeń IMA, w stosunku do grupy kontrolnej, uzyskano również w grupie pacjentów po zabiegu transplantacji nerek (tabela nr 7).

Nie zaobserwowano jednak różnic w wartościach stężeń IMA przed zabiegiem przeszczepienia nerki i po przeszczepieniu, były one w obu przypadkach prawie identyczne (98 ± 14 vs 99 ± 13 U/ml). Wyższe wartości w stężeniach IMA mogą jednak wskazywać na obecność subklinicznego niedokrwienia, na które narażona jest ta grupa pacjentów.

- **IMA u pacjentów z cukrzycą typu 2.**

U pacjentów z cukrzycą typu 2 uzyskane wartości stężeń IMA były istotnie statystycznie wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej ($p=0.004$) (tabela nr 8).

Podwyższone wartości stężeń IMA w tej grupie pacjentów, mogą być wyrazem stanu niedokrwienia mięśni szkieletowych (Zapico-Muniz i in., 2004) na skutek możliwych zmian miażdżycowych w tej grupie pacjentów. Uzyskane wyniki mogą też wskazywać na istniejące zaburzenia krążenia wieńcowego we wcześniej zmienionym łożysku, na skutek agregacji płytek i powstawania zakrzepów ograniczających drożność tętnic wieńcowych. Pacjenci z cukrzycą typu 2 należą do grupy obciążonej zwiększonym ryzykiem choroby wieńcowej oraz miażdżycy tętnic obwodowych i mózgowych, a postępujące powikłania sercowo-naczyniowe typu mikro i makroangiopatii związane są mechanizmami niedokrwieniowymi. Stanowią również grupę narażoną na powtarzające się niedotlenienie i nawracające epizody niedokrwienia związane z tłącym się procesem zapalnym zarówno w obszarze tętnic wieńcowych, jak i we fragmentach mięśni (Pearson i in., 2003).

Należy również podkreślić, że u pacjentów z cukrzycą typu 2 zaobserwowano zależność pomiędzy markerem stanu niedokrwienia a markerem stresu oksydacyjnego (IMA vs GK $r=0.38$, $p=0.007$) (rys. 16). Uzyskana korelacja może wskazywać na współistnienie stanu niedotlenienia oraz nadmiernego stresu oksydacyjnego.

W grupie pacjentów z cukrzycą typu 2, sprawdzono korelację między stężeniami IMA a stężeniami kreatyniny w osoczu; nie uzyskano jednak znamiennej zależności między tymi parametrami ($r=0.15$, $p=0.30$).

- **IMA u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca.**

Powszechnie stosowanymi markerami kardiologicznymi do diagnostyki zawału mięśnia sercowego są troponiny. Zwiększenie stężenia troponin wywołane niedokrwieniem decyduje o rozpoznaniu zawału i ma ważne znaczenie w rokowaniu. Stężenie troponin wzrasta w przebiegu nasilonego niedokrwienia, gdy dochodzi już do nieodwracalnych, martwiczych zmian w mięśniu sercowym. Do tych zmian dochodzi zazwyczaj po upływie kilku godzin od początku ostrego incydentu niedokrwienia (Opolski i in., 2003). Poszukuje się nowych markerów wskazujących na wczesne niedokrwienie mięśnia sercowego różnicujących pacjentów z niedokrwieniem od pacjentów bez niedokrwienia oraz pacjentów z niedokrwieniem bez zawału od pacjentów, u których procesy niedokrwienne doprowadziły do martwicy. Wczesne rozpoznanie niedokrwienia mięśnia sercowego przed nastaniem zmian martwiczych umożliwiłoby wczesne podjęcie działań zapobiegających rozwój martwicy na skutek niedokrwienia. Uważano, że takim markerem mógłby być IMA (Morrow i in., 2003).

W prezentowanej pracy oznaczano stężenia IMA u pacjentów z bólem w klatce piersiowej bez zmian w badaniu EKG. Mierzono stężenia IMA w momencie pojawienia się bólu w klatce i dobę po incydencie, w obu przypadkach wartości stężeń IMA były istotnie statystycznie wyższe niż w grupie kontrolnej $p<0.05$, bez istotnych statystycznie różnic między pobraniami (tabela nr 10). Uzyskane istotnie wyższe stężenia IMA mogły wskazywać na utrzymujący się stan niedokrwienia (niedotlenienia) mięśnia sercowego. Niestety nie oznaczono w tej

grupie badanej dodatkowo troponin, które wskazywałyby na brak nieodwracalnych, martwiczych zmian w mięśniu sercowym, a brak zmian w obrazie badania EKG jest niewystarczającym i zbyt mało czułym testem wykluczającym martwicę serca. Dlatego też istotnie wyższe stężenia IMA w tej grupie mogą potwierdzać jedynie istnienie incydentów niedotlenienia.

Podobne badania przeprowadzono w pracy Bhagavana i in. (Bhagavan i in., 2003), gdzie mierzono stężenie IMA u pacjentów bez niedokrwienia mięśnia sercowego oraz u pacjentów z niedokrwieniem. Różnica w stężeniach IMA w grupie pacjentów z niedokrwieniem i bez niedokrwienia były wyraźnie i wysoce znamienne statystycznie. Według Morrow i in. IMA jest markerem niedokrwienia mięśnia sercowego o dobrej czułości i swoistości (Morrow i in., 2003). Natomiast słabo różnicuje niedokrwienie bez martwicy od niedokrwienia przebiegającego z martwicą (Bhagavan i in., 2003).

Na uwagę zasługuje również badanie przeprowadzone przez Sinha i in. (Sinha i in., 2004), którzy oznaczali IMA, troponinę i wykonywali badanie elektrokardiograficzne u pacjentów z ostrym bólem w klatce piersiowej przy przyjęciu do szpitala. Z badania wynika, że czułość wykrywania niedokrwienia przez IMA wynosiła 82% w stosunku z 45 % czułością EKG i 20% troponiny T w momencie przyjęcia do szpitala. Autorzy również uważają, że oznaczanie IMA jest szczególnie wskazane dla pacjentów przyjmowanych do szpitala z bólem w klatce piersiowej lub objawami sugerującymi sercowe pochodzenie bólu, z małym lub umiarkowanym ryzykiem ostrego zespołu wieńcowego, z normalnym lub niediagnostycznym badaniem EKG oraz normalnym stężeniem troponin w pobraniu przy przyjęciu do szpitala (Sinha i in., 2004).

Cechą modyfikowanej oksydatywnie albuminy (IMA) jest między innymi wczesne pojawienie się po incydencie niedokrwienia (Morrow i in., 2003). W niniejszej pracy badano dynamikę zmian stężenia IMA w trakcie rewaskularyzacji naczyń wieńcowych (przezskórnej śródnaczyniowej angioplastyki wieńcowej - PTCA). Najwyższe wartości stężenia IMA uzyskano w 1 godzinie po zbiegu wzrost o 16 % od wartości stężeń wyjściowych, po 24 godzinach od ustąpienia niedokrwienia wartości IMA wróciły do wartości sprzed zabiegu (rys. 17). Sinha i in. wykazali również wzrost IMA po 30 minutach od zakończenia PTCA i utrzymywanie się jeszcze przez 30 minut, a następnie powrót do wartości

wyjściowych już po 12 godzinach (Sinha i in., 2003). Podobne wyniki w badaniach dynamiki zmian stężeń IMA uzyskali Hjortshøj i in. w swojej najnowszej pracy z 2009 roku, którzy szczegółowo opisują dynamikę pojawiania się IMA u pacjentów w ostrych stanach wieńcowych. Potwierdzają oni, iż stężenie IMA u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym z przetrwałym uniesieniem odcinka ST, u których wykonywano angioplastykę, ma najwyższy pik w 40 minucie od wykonania angioplastyki, zaczyna się stabilizować po 2.5 godzinach i po dobie wraca do wartości wyjściowych (Hjortshøj i in., 2009).

IMA, jak wynika to z przedstawionych badań własnych jak i cytowanych prac, nie spełnia kryteriów markera różnicującego niedokrwienie z i bez martwicy mięśnia sercowego.

- **IMA u pacjentów poddawanych zabiegom operacyjnym.**

W prezentowanej pracy oznaczano stężenia IMA u pacjentów poddawanych zabiegom operacyjnym, u których wykonywano zabieg w pełnym znieczuleniu. Uzyskane znamienne wyższe wartości stężeń IMA we wszystkich pobraniach w stosunku do grup kontrolnej (tabela nr 11) mogą świadczyć o stanach niedokrwienia mięśni szkieletowych, jak i innych narządów (Zapico-Muniz i in., 2004). Najwyższe wartości stężeń IMA uzyskano przy intubacji pacjenta, jak i po wybudzeniu, które średnio następowało w 108. 8 minucie od rozpoczęcia zabiegu. Te szczególnie wyższe wartości stężeń IMA w wymienionych punktach czasowych mogą sugerować, iż dodatkowe sytuacje np. bezdech lub miejscowy ucisk na narządy układu oddechowego, może wzmocnić proces niedokrwienia na drodze miejscowego niedotlenienia. Najwyższe wartości stężeń IMA uzyskane po wybudzeniu pacjenta wydają się być odpowiedzią na krótkotrwały stres oksydacyjny podczas zabiegu; w tym punkcie czasowym uzyskano również istotnie statystycznie wyższe stężenia GK (tabela nr 11).

Stratyfikacja stężeń IMA w różnych grupach ryzyka określanych przez skalę ASA, pokazała różnice istotne statystycznie między wartościami stężeń IMA przed zabiegiem a kolejnymi punktami czasowymi we wszystkich grupach skali ASA ($p < 0.05$) (tabela nr 12). Dane te sugerują, że w czasie zabiegu może dochodzić do stanów niedokrwienia (niedotlenienia) oraz, że zabieg operacyjny a więc jakakolwiek ingerencja w organizm, może wywołać stan niedokrwienia.

Zaobserwowano również, że wartości stężeń IMA zależą od stopnia skali ASA; stężenia IMA były najwyższe w grupie pacjentów zakwalifikowanych do ASA III, a więc u pacjentów z ciężką chorobą ogólnoustrojową, ograniczającą znacznie wydolność organizmu, w stosunku do grup z ASA II i ASA I ($p=0.009$). Można więc powiedzieć, że pacjenci zakwalifikowani jako ASA III, są szczególnie narażeni na stan niedokrwienia i niedotlenienia. Uzyskane wyniki potwierdzają również funkcjonalność i skuteczność klasyfikacji pacjentów według skali ASA, która uwzględnia wiele czynników wpływających na ryzyko przeprowadzanego zabiegu. Należy zwrócić również uwagę, że wśród pacjentów, u których wykonywano zabieg operacyjny byli pacjenci poddani zabiegom chirurgii naczyniowej. Ta grupa wydaje się najbardziej narażona na incydenty niedokrwienia podczas zabiegu, ponieważ oprócz samego zabiegu, choroba dodatkowo może ograniczać wydolność pacjenta i wpływać na podwyższone wartości stężeń IMA. Uwzględnienie skali ASA przy badaniu dynamiki zmian IMA w trakcie zabiegu operacyjnego wyraźnie wskazuje na nasilenie procesów niedotlenienia u pacjentów z ASA III (tabela nr 12, rys. 20 i 21).

Niewątpliwie lepszy obraz dynamiki zmian w stężeniach IMA uzyskuje się w grupach homogennych, tak jak to było w przypadku pacjentów z planową przezskórną rewaskularyzacją mięśnia sercowego (rys. 17). Potwierdzają to również badania Hjortshøja i in., którzy badali kinetykę modyfikowanej albuminy pacjentów z ostrym niedokrwieniem serca (Hjortshøj i in., 2009). Najważniejszy wniosek jaki podają autorzy badania, to fakt że szczytowy wzrost stężeń IMA następuje już w 40 minucie od incydentu niedokrwienia i do normalizacji może dochodzić już po 2.5 godzinach od incydentu a stabilizacji po 24 godzinach. Autorzy stwierdzają również, że IMA jako wczesny marker niedokrwienia nie koreluje z pozostałymi markerami niedokrwienia serca (Hjortshøj i in., 2009).

Na podstawie przeprowadzonych badań, można powiedzieć zgodnie z autorami wielu publikacji, że IMA nie jest swoistym markerem niedotlenienia mięśnia sercowego, można obserwować jego podwyższone wartości zarówno u pacjentów, u których występują incydenty niedokrwienia mięśnia sercowego, jak i mięśni szkieletowych oraz innych narządów (Bhagavan i in., 2003; Sinha i in., 2003; Zapico-Muniz i in., 2004).

W badanych grupach pacjentów tj: z przewlekłą chorobą nerek leczonych zachowawczo ($r=-0.04$, $p=0.64$), pacjentów po zabiegu transplantacji nerki (przed przeszczepieniem nerki ($r=0.24$, $p=0.39$), po przeszczepieniu nerki ($r=0.14$, $p=0.63$)), z cukrzycą typu 2 ($r=0.09$, $p=0.53$) (rys. 14), pacjentów poddawanych zabiegom operacyjnym ($p>0.05$), nie wykazano istotnych statystycznie korelacji pomiędzy stężeniami AGEs a IMA. Brak korelacji mógł wynikać z faktu, że końcowe produkty glikacji białek należy traktować, jako marker długotrwałego stresu oksydacyjnego a modyfikowaną oksydatywnie albuminę, jako marker krótkotrwałych stanów niedotlenienia, a więc mają one inne okresy półtrwania.

Podsumowanie

Badania przeprowadzono w grupie 412 pacjentów narażonych na czynniki zwiększonego ryzyka sercowo-naczyniowego, oznaczono końcowe produkty glikacji białek, modyfikowaną oksydatywnie albuminę oraz produkty peroksydacji białek.

Brak istotnych korelacji między badanymi parametrami, może wynikać ze znaczącej heterogenności wewnątrz poszczególnych grup (płeć, wiek, współistniejące choroby, czas trwania choroby, stosowane leczenie).

Wyniki badania wskazują na podwyższone stężenia badanych parametrów oraz ich korelację z zaawansowaniem choroby.

Wykazano przydatność opracowanych metod laboratoryjnych w monitorowaniu nasilonego stresu oksydacyjnego w różnych stanach klinicznych.

Ponadto oznaczone parametry mogą służyć, jako markery zwiększonego ryzyka chorób sercowo-naczyniowych.

WNIOSKI

1. Opracowane metody oznaczania końcowych produktów glikacji białek i modyfikowanej oksydatywnie albuminy, mogą być wykorzystywane w praktyce klinicznej do oznaczania nasilenia długo i krótkotrwałego stresu oksydacyjnego.
2. Wzrost stężeń badanych markerów (AGEs, IMA, GK), oznaczanych opracowanymi metodami, obserwuje się w grupach pacjentów ze zwiększonym ryzykiem sercowo - naczyniowym, narażonych na długotrwały stres oksydacyjny i hiperglikemię.
3. Modyfikowana oksydatywnie albumina może być przydatnym wskaźnikiem niedokrwienia u pacjentów z cukrzycą typu 2, z przewlekłą chorobą nerek, czy też z chorobą niedokrwienną serca.
4. Krótkotrwały stres oksydacyjny w postaci zabiegu operacyjnego wpływał na wzrost stężeń modyfikowanej oksydatywnie albuminy oraz produktów peroksydacji białek, nie wpływał na stężenia końcowych produktów glikacji białek.
5. Wydaje się, że nasilenie stresu oksydacyjnego (wzrost IMA i GK) u pacjentów poddawanych zabiegom operacyjnym wynika z niedokrwienia mięśni szkieletowych i narządów wewnętrznych i zależy w dużym stopniu od podstawowego stanu zdrowia pacjenta np. współistniejących chorób.

STRESZCZENIE

Zjawiska patologiczne takie jak: hiperglikemia, niedotlenienie, niedokrwienie, stan zapalny, zaburzają prawidłowy przebieg procesów oksydacyjno-redukcyjnych, prowadząc do nadprodukcji wolnych rodników i generacji stresu oksydacyjnego.

Hiperglikemia nasila powstawanie końcowych produktów glikacji białek (AGEs), jak również procesów wolnorodnikowych, przyczyniając się do akceleracji czynników ryzyka sercowo - naczyniowego.

Stan niedotlenienia, jak również nasilony stres oksydacyjny są przyczyną upośledzenia funkcji zmiatania wolnych rodników przez albuminę. Dlatego zmodyfikowana oksydatywnie albumina (IMA), może stanowić swoisty wskaźnik niedotlenienia, wykazujący między innymi na niedokrwienne uszkodzenie mięśnia sercowego, mięśni szkieletowych czy innych narządów.

Celem pracy było:

- opracowanie analityczne metod oznaczania końcowych produktów glikacji białek i modyfikowanej oksydatywnie albuminy;
- pomiar stężenia końcowych produktów glikacji białek, stężenia modyfikowanej oksydatywnie albuminy oraz grup karbonylowych (produktów peroksydacji białek), w wybranych grupach pacjentów ze zwiększonym ryzykiem sercowo – naczyniowym;
- ocena wpływu zabiegu operacyjnego na stężenie markerów stresu oksydacyjnego: grup karbonylowych białek, modyfikowanej oksydatywnie albuminy i końcowych produktów glikacji białek.

Metodę oznaczania końcowych produktów glikacji białek (AGEs) opracowano na podstawie pracy Müncha i in. (Münch i in., 1997). Metodę oznaczania modyfikowanej oksydatywnie albuminy (IMA) opracowano na podstawie pracy Bhagavana i in. (Bhagavan i in., 2003). Produkty peroksydacji białek (GK) oznaczono według metody Garibaldiego (Garibaldi, Aragno, 1994).

W badaniu wzięło udział 5 grup pacjentów. Łącznie przebadano 412 pacjentów w tym 158 kobiet i 254 mężczyzn. Byli to: I - grupa kontrolna; II - pacjenci z

przewlekłą chorobą nerek w tym: z przewlekłą chorobą nerek leczeni zachowawczo, pacjenci hemodializowani, dializowani otrzewnowo, oraz po zabiegu transplantacji nerki; III - pacjenci z cukrzycą typu 2; IV - pacjenci z chorobą niedokrwienną serca; V - pacjenci poddawani zabiegom operacyjnym.

W grupach badanych oznaczano 3 wskaźniki: końcowe produkty glikacji białek (AGEs), modyfikowaną oksydatywnie albuminę (IMA), oraz grupy karbonylowe (GK).

Znamiennie statystycznie wysokie stężenia AGEs uzyskano u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek (najwyższe u pacjentów dializowanych otrzewnowo i hemodializowanych) oraz u pacjentów z cukrzycą typu 2. Wykazano znamienne korelację pomiędzy stężeniem kreatyniny w surowicy a AGEs ($r=0.62$, $p<0.0001$), u pacjentów z cukrzycą typu 2. Istotnie statystycznie wyższe stężenia IMA uzyskano w grupie pacjentów z chorobą niedokrwienną serca; u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek leczonych zachowawczo; u pacjentów z cukrzycą typu 2, u pacjentów poddawanych zabiegom operacyjnym w pełnym znieczuleniu. Wykazano korelację między IMA a GK u pacjentów z cukrzycą typu 2 ($r=0.38$, $p=0.007$).

Opracowane metody oznaczania końcowych produktów glikacji białek i modyfikowanej oksydatywnie albuminy, mogą być wykorzystywane w praktyce klinicznej do oznaczania nasilenia długo i krótkotrwałego stresu oksydacyjnego. Wzrost stężeń badanych markerów (AGEs, IMA, GK), oznaczanych opracowanymi metodami, obserwuje się w grupach pacjentów ze zwiększonym ryzykiem sercowo - naczyniowym, narażonych na długotrwały stres oksydacyjny i hiperglikemię. Modyfikowana oksydatywnie albumina może być przydatnym wskaźnikiem niedokrwienia u pacjentów z cukrzycą typu 2, z przewlekłą chorobą nerek, czy też z chorobą niedokrwienną serca. Krótkotrwały stres oksydacyjny w postaci zabiegu operacyjnego wpływał na wzrost stężeń modyfikowanej oksydatywnie albuminy oraz produktów peroksydacji białek, nie wpływał na stężenia końcowych produktów glikacji białek. Wydaje się, że nasilenie stresu oksydacyjnego (wzrost IMA i GK) u pacjentów poddawanych zabiegom operacyjnym wynika z niedokrwienia mięśni szkieletowych i narządów wewnętrznych i zależy w dużym stopniu od podstawowego stanu zdrowia pacjenta np. współistniejących chorób.

ABSTRACT

Pathological phenomena such as hyperglycemia, hypoxia, ischemia or inflammatory state disturb the oxidative – reductive processes, leading to the overproduction of free radicals and generation of oxidative stress.

Hyperglycemia result in the formation of glycation end products (AGEs), causing the intensification of free radicals processes and the acceleration of diabetes mellitus and renal failure complications.

Ischemia state, as well as oxidative stress also leads to the dysfunction of capturing free radicals by albumin. That is why the ischemia modified albumin (IMA) may be a specific marker of hypoxia, indicating among others myocardial ischemia and ischemic episodes in skeletal muscles and other tissues.

The aims of this study included:

- the elaboration of an analytical method of marking advanced glycation end products and ischemia modified albumin;
- concentration measurement of advanced glycation end products, ischemia modified albumin and carbonyl groups in selected patients groups with higher cardiovascular risk;
- evaluation of the influence of operative procedure on markers of oxidative stress: carbonyl groups, ischemia modified albumin and advanced glycation end products.

The method of AGEs marking was elaborated on the basis of the study by Múncha et al. (Múnch et al., 1997). The method of IMA marking has been elaborated on the basis of the study by Bhagavan et al. (Bhagavan et al., 2003). The CG have been marked using the method of Garibaldi (Garibaldi, Aragno, 1994).

The study was carried out on 5 groups; altogether 412 patients: 158 female and 254 male. These were: I – control group; II – patients with chronic kidney disease including patients with chronic kidney disease on prophylactic treatment, patients on hemodialysis, patients on peritoneal dialysis and transplanted kidney patients; III – patients with diabetes type 2; IV – patients with ischemic heart disease; V – patients submitted to operative procedure.

In the study groups, 3 markers have been indicated: advanced glycation end products (AGEs), ischemia modified albumin (IMA), carbonyl groups (CG).

Significantly higher levels of AGEs have been noted in the cases of patients with chronic kidney disease (highest in the case of patients on peritoneal dialysis and hemodialysis) as well as in the case of patients with diabetes type 2. Significant correlation has been found between the concentration of creatinine in serum and AGEs ($r=0.62$, $p<0.0001$), in the case of patients with diabetes type 2. Significantly higher levels of IMA were found in the group with ischemic heart disease, patients with chronic kidney disease on prophylactic treatment, patients with diabetes type 2 and in patients submitted to operative procedure under anesthesia. Correlation has been found between IMA and GK in the case of patients with diabetes type 2 ($r=0.38$, $p=0.007$).

The elaboration of analytical method of marking the AGEs and IMA may be used in clinical practice to mark the intensity of long and short -term oxidative stress. Increased concentration of indicated markers (AGEs, IMA, CG), marked with elaborated methods, was observed in patient groups with increased cardiovascular risks, exposed to long-term oxidative stress and hyperglycemia. Ischemia modified albumin may be used as a useful marker of ischemia in patients with diabetes type 2, patients with chronic kidney disease, patients with ischemic heart disease. Short-term oxidative stress in the form of operative procedure did have influence on increased concentration of IMA and CG, did not have influence on the level of AGEs. It seems that the occurrence of oxidative stress (increased IMA and CG) in the case of patients undergoing operative procedure results from the ischemic episodes in skeletal muscles and internal organs and depends greatly on the basic health condition of the patient, e.g. coexisting diseases.

PIŚMIENNICTWO

1. Adler A. Association between insulin resistance at diagnosis of diabetes and macrovascular complication – The UKPDS. *Diabetologia*, 1999; 42: A0697.
2. Ahmed M., Thorpe S., Baynes J.: Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J. Biol. Chem.*, 1986; 261: 4889- 4894.
3. Alberti K.G.M.M., Zimmet P.Z., for the WHO Consultation: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabetic Medicine*, 1998; 15: 539-553.
4. Arduini A., Mezzetti A., Porreca E., i in.: Effect of ischemia and reperfusion on antioxidant enzymes and mitochondrial inner membrane proteins in perfused rat heart. *Biochem. Biophys. Acta*, 1988; 970: 113-121.
5. Aruoma O., Kaur A., Halliwell B.: Oxygen free radicals and human diseases. *J. Roy. Soc. Health*, 1991; 111: 172-177.
6. Aw T.Y., Wierzbicka G., Jones D.P.: Oral glutathione increases tissue in vivo. *Chem. Biol. Interact.*, 1991; 80: 89-97.
7. Babior B. M.: The respiratory burst of phagocytes. *J. Clin. Invest.*, 1984; 73: 599-601.
8. Bankson D.D., Kestin M., Rifai N.: Role of free radicals in cancer and atherosclerosis. *Clin. Lab. Med.*, 1993; 13: 463-480.
9. Barnett A.H.: Pathogenesis of diabetic microangiopathy: an overview. *Am. J. Med.*, 1991; 90: 67-73.
10. Bar-Or D., Curtis G., Rao N. i in.: Characterization of the Co(2+) and Ni(2+) binding amino-acid residues of the N-terminus of human albumin: an insight into the mechanism of a new assay for myocardial ischemia”. *Eur. J. Biochem.*, 2001; 268: 42-47.
11. Bar-Or D., Lau E., Winkler J.V.: A novel assay for cobalt-albumin binding and potential as a marker for myocardial ischemia – a preliminary report. *J. Emerg. Med.*, 2000; 19: 311-315.
12. Bartosz G.: *Druga twarz tlenu*. PWN, Warszawa, 1995.

13. Bast A., Goris R.J.A.: Oxidative stress. *Biochemistry and human disease. Pharm. Weekbl. (Sci)*, 1989; 11 (6): 199-206.
14. Batteli M.G., Lorenzoni E.: Purification and properties of a new glutathione – dependent thiol: disulfide oxidoreductase from rat liver. *Biochem. J.*, 1982; 207: 133-138.
15. Baynes J.W., Thorpe S.R.: Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, 1999; 48: 1-9.
16. Bayraktutan U.: Free radicals, diabetes and endothelial dysfunction. *Diabetes Obes. Metab.*, 2002; 4: 224-238.
17. Beals C.C., Bullock J., Jauregui E.R., i in.: Microvascular clearance of macromolecules in skeletal muscle of spontaneously diabetic rats. *Microvasc. Res.*, 1993; 45: 11-19.
18. Berger H.M., Lindeman J.H.N., van Zoeren-Grobben D., i in.: Iron overload, free radical damage, and rhesus haemolytic disease. *Lancet*, 1990; 335: 933-936.
19. Bhagavan N.V., Lai E.M., Rios P.A., i in.: Evaluation of human serum albumin cobalt binding assay for the assessment of myocardial ischemia and myocardial infarction. *Clin. Chem.*, 2003; 49: 581-585.
20. Blake D.R., Allen R.E., Lunec J.: Free radicals in biological systems – a review orientated to inflammatory processes. *Brit. Med. Bull.*, 1987; 43: 371-385.
21. Borderie D.I., Allanore Y., Meune C., i in.: High ischemia modified albumin concentration reflects oxidative stress but not myocardial involvement. *Clin. Chem.*, 2004; 50(5): 2191-1193.
22. Brown L. F.: Serum RAGE – a potential marker for monitoring chronic kidney disease. *Clinical Laboratory International*, 2008; 32: 10-14.
23. Burda J., Chavko M.: mechanism of protein synthesis inhibition in CNS during postischemic reperfusion. *Physiol. Res.*, 1991; 40: 335- 402.
24. Cambria R.A., Anderson R.J., Dikdan G., i in.: The influence of arachidonic acid metabolites on leukocyte activation and skeletal muscle injury after ischemia after ischemia and reperfusion. *J. Vascul. Surg.*, 1991; 14: 549-556.

25. Ceriello A., Gugliano D., Quatraro A., i in.: metabolic control may influence the increased superoxide generation in diabetic serum. *Diabetic Med.*, 1991; 8: 540-554.
26. Chahine R., Mateescu M.A., Roger S., i in.: Protective effects of ceruloplasmin against electrolysis – induced oxygen free radicals in rat heart. *Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, 1991; 69: 1459-1464.
27. Chappey O., Dosquet C., Wautier M.P, i in.: Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *Eur. J. Clin. Invest.*, 1997; 27: 97-108.
28. Chatham J.C., Gilbert H.F., radda G.K.: The metabolic consequences of hydroperoxide perfusion on the isolated rat heart. *Eur. J. Biochem.*, 1989; 184: 657-662.
29. Chow C.K.: Vitamin E and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 1991; 11: 215-232.
30. Christensson R.H., Duh S.H., Sanhai W.R., i in.: Characteristics of an albumin cobalt binding test for assessment of acute coronary syndrome patients. A multicenter study. *Clin. Chem.*, 2001; 47: 464-470.
31. Cochrane C. G.: Mechanizm of oxidant injury of cells. *Mol. Aspects Med.*, 1991; 12: 137-147.
32. Colli S., Tremoli E.: Multiple effect of dipyridamole on neutrophils mechanisms. *J. Lab. Clin. Med.*, 1991; 118: 136-145.
33. Cosentino F., Eto M., De paolis P., i inni: High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation.*, 2003; 107: 1017-1023.
34. Cosentino F., Hishikawa K., Katusic Z.S. i inni: High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation.*, 1997; 96: 25-28.
35. Cross C.E., Halliwell B., Borish E. T., i in.: Oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.*, 1987; 107: 526-555.
36. Cutler R.G.: Aging and oxygen radicals. *Physiology of oxygen radicals.* Am. Physiol. Soc. Bethesda, 1986; 251-284.
37. Czech A., Bernas M., Tatoń J.: Czynniki ryzyka choroby niedokrwiennej serca. Odrębności u chorych na cukrzycę. *Kard. Pol.*, 2001; 55: 343.

38. Darleyusmar V.M., Stone D., Smith D., i in.: Mitochondria, oxygen and reperfusion damage. *Ann. Med.*, 1991; 23: 583-588.
39. Davies K.J.A.: Proteolytic systems may function as secondary antioxidant defenses: A hypothesis. *J. Free Radic. Biol. Med.*, 1986; 2: 155-173.
40. Dean R.T., Hunt J.V., Grant A.J., i in.: Free radical damage to proteins the influence of the relative localization of radical generation, antioxidants, and target proteins. *Free Radic. Biol. Med.*, 1991; 11: 161-168.
41. Del Maestro R.F., Mc Donald W.: Oxidative enzymes in tissue homogenates. *CRC Handbook of methods for oxygen radical research*, 1986; 291-296.
42. Del Maestro R.F.: An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta. Physiol. Scand.*, 1980; 492: 153-168.
43. Dunn J., Ahmed M., Murtishaw M., i in.: Reaction of ascorbate with lysine and protein under autoxidizing conditions: formation of CML by reaction between lysine and products of autoxidation of ascorbate. *Biochemistry*, 1990; 29: 10964-10970.
44. Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H.: Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radic. Biol. Med.*, 1991; 11: 81-128.
45. Fleming J.K., Gadsden R.H., Kabbani I.: Definitive characterization of uric acid as an interferent in peroxidase indicator reactions and proposed mechanism of action. *Clin. Biochem.*, 1988; 21: 27-32.
46. Floyd R.A.: Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.*, 1990; 4: 2587-2597.
47. Freeman B.A., Crapo J.D.: Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, 1982; 47: 412-426.
48. Fridovich I.: Superoxide dismutase: defence against endogenous superoxide radical. *CIBA Found. Symp.*, 1979; 77-93.
49. Garibaldi S., Aragno I.: Relationship between protein carbonyls, retinol and tocopherols level in human plasma. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1994; 34, 4: 729-736.
50. Gidenne S., Ceppia F., Fontan E., i in.: Analytical performance of the albumin cobalt binding test ACBR on the Cobas MIRA Plus analyzer. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2004; 42: 455-461.

51. Giugliano D., Ceriello A., Paolisso G.: Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*, 1996; 19: 257-267.
52. Greek K., Brand M., Murhy M.P.: Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*, 2004; 53, suppl. 1: S110-S118.
53. Greenwald R.A.: Oxy radicals and connective tissue. *J. Rheumatol.*, 1981; 8: 185-187.
54. Grisham M. B., Mc Cord J. M.: Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites. w: physiology of oxygen radicals red. Taylor A. E., Matalon S., Ward P., 1986; 1-18, *Am. Physiol. Soc. Bethesda*.
55. Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Cross C.E.: Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J. Lab. Clin. Med.*, 1992; 119: 598-620.
56. Halliwell B.: Oxygen radicals: a commonsense look at their nature and medical importance. *Med. Biol.*, 1984; 62:71-77.
57. Halliwell B.: Reactive oxygen species in living systems-source biochemistry, and role in human disease. *Am. J. Med.*, 1991; 91: 14-22.
58. Halliwell B.: The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis*, 1993; 23: 118-126.
59. Hasuike Y., Nakanishi T., Otaki Y., i in.: Plasma 3-deoxyglukosone elevation in chronic renal failure is associated with increased aldose reductase in erythrocytes. *Am. J. Kid. Dis.*, 2002; 40(3): 464-471.
60. Hijortshøj S., Dethlefsen C., Kristensen S.R., Ravkilde J.: Kinetics of ischaemia modified albumin during ongoing severe myocardial ischaemia. *Clin. Chem. Acta*, 2009; 403: 114-120.
61. Hoshino T., Maley W.R., Bulkley G.B., i in.: Ablation of free radical-mediated reperfusion injury for the salvage of kidneys taken from non-heart-beating donors: a quantitative evaluation of the proportion of injury due to reperfusion following period of warm, cold, and combined warm and cold ischemia. *Transplantation*, 1988; 45: 284-289.
62. Hurst J., Slater T.: Effects of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Chem. Biol. Interactions*, 1978; 61: 109-124.
63. Hyslop P.A., Hinshaw D.B., Halsey W.A., i in.: Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP

- phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, 1988; 263: 1665-1675.
64. Inoguchi T., Sonta T., Tsubouchi H., i in.: Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2003; supl. 3: S227-S232.
65. Ischemia modified Albumin (IMA)- the first blood test for cardiac ischemia. <http://www.ischemia.com>, 2004.
66. Janero D.R.: Therapeutic potential of Vitamin E in the pathogenesis of spontaneous atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med.*, 1991; 11: 129-144.
67. Jendryczko A., Drózd M.: Selenoenzymy jako czynniki ochronne przed stresem tlenowym. *Wiad. Lek.*, 1993; XLVI: 62-65.
68. Jenkins R.R.: Introduction: oxidant stress, aging and exercise. *Med. Sci. Sports. Exerc.*, 1992; 25: 210-112.
69. Jennings P.E., Barnett A.H.: New approaches to the pathogenesis and treatment of diabetic microangiopathy. *Diabetic Med.*, 1988; 5: 111-117.
70. Kaiser N., Sasson S., Feener E.P., i in.: Differential regulation of glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Diabetes*, 1992; 42: 80-89.
71. Kanauchi M, Hashimoto T., Tsujimoto N.: Advanced glycation and products in nondiabetic patients with coronary artery disease. *Diabetes Care*, 2001; 9(24): 1620-1630.
72. Karnovsky M.L., Badwey J.A., Lochner J., i in.: Trigger phenomena for the release of oxygen radicals by phagocytic leukocytes. *Oxy – radicals in molecular biology and pathology*. red. P. A. Ceruffi, J. Fridorich, Mc Cord J.M., 1988; 61-81, Alan R. Liss, Inc. Nowy Jork.
73. Kawano H, Fukuzawa K., Kogure K., i in.: Initiation of lipid peroxidation In rat liver mitochondria by chelated iron-oxygen complexes. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 1991; 11: 21-30.
74. Kilhovd BK., Berg TG., Birkeland KI., i in.: Serum levels of advanced glycation end products are increased in patients with type 2 diabetes and coronary heart disease. *Diabetes Care*, 1999; 43: 1271-1278.
75. Klebanoff S.J.: Oxygen metabolism and toxic properties of phagocytes. *Ann. Intern. Med.*, 1980, 93: 480-489.

76. Knuutila S.: Role of free radicals in genetic damage (mutation). *Med. Biol.*, 1984; 62:110-114.
77. Kolowca J.: Rola wolnych rodników tlenowych w niedokrwienno-reperfuzyjnym uszkodzeniu mięśnia sercowego. *Pol. Tyg. Lek.*, 1993; XLVIII (14-15): 294-302.
78. Kopple J.D., Massry S.G.: *Nutritional management of renal disease*, 2004; Philadelphia, USA: 480-521.
79. Kornacka M.: Rola wolnych rodników tlenowych w okresie noworodkowym. *Kliniczna Perinatologia i Ginekologia*, 1993; 6: 113-221.
80. Kozek E.: Choroba niedokrwienna serca u chorych z cukrzycą. *Terapia*, 2002; 2: 36.
81. Krall J., Bagley A.C., Mullenbach G.T., i in.: Superoxide mediates the toxicity of paraquat for cultured mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 1988; 263: 1910-1914.
82. Kropiewnicka E.H., Pączek L.: Rola końcowych produktów glikozylacji białek w powstawaniu i rozwoju miażdżycy w cukrzycy insulinoniezależnej. *Przeg Lek.*, 2000; 57: 5.
83. Książek K., Wiśniewska J.: Udział glukozy i reaktywnych form tlenu w powstawaniu naczyniowych powikłań cukrzycy. *Przeg. Lek.*, 2001; 58: 10.
84. Lee AT., Cerami A.: Role of glycation in aging. *Ann. Acad. Sci.*, 1992; 10: 63-70.
85. Lee H. S., Shoeman D. W., Csallany A. S.: Urinary response to in vivo lipid peroxidation induced by vitamin E deficiency. *Lipids*, 1992; 27: 124-128.
86. Loredana G, Bucciarelli, MD i in.: RAGE i stabilizacja zmiany miażdżycowej. *Circulation*, 2003; 2: 52.
87. Lushchak VI: Free radical oxidation of proteins and its relationship with functional state of organisms. *Biochemistry (Mosc)*, 2007; 72(8): 809-827
88. Maillard LC. *C R Acad. Sci.*, 1912; 154: 66-68.
89. Makita Z, Vlassara H, Cerami A i in.: Immunochemical detection of advanced glycolysation end products in vivo. *J. Biol. Chem.*, 1992; 267: 5133-5138.

90. Makita Z., Radoff S., Rayfield E.J. i in.: Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *New. Engl. J. Med.*, 1991; 352(12): 836-842.
91. Mal A., Nadi A., Chatterjee I.B.: Hemoglobin – A scavenger of superoxide radical. *J. Biosciences*, 1991; 16: 43-53.
92. Małgorzewicz M., Śliwińska A., Dębska-Ślizień A., i in.: Nutritional status, oxidative stress and cardiovascular risk in hemodialysis patients. *Clinical Nutrition*, 2005; 24(4): 650.
93. Małgorzewicz S., Łysiak-Szydłowska W.: Zaawansowane produkty glikacji białek. *Advanced Glycation End-Products. Medycyna Metaboliczna*, 2005; tom IX, nr 3: 62-68.
94. Małgorzewicz S., Śliwińska A., Lichodziejwska-Niemierko M. i in.: Advanced glycation end products and markers of oxidative stress in peritoneal dialysis patients. *Ann. Acad. Med. Gedan.*, 2005; 35(10): 67-72.
95. Mangino M. J., Murphy M. K., Graban G.G., i in.: Protective effects of glycine during hypothermic renal ischemia – reperfusion injury. *J. Biol. Chem.*, 1983; 258: 3107-3113.
96. Murrison I., Braquet P., Garay R. P.: Na⁺ and K⁺ transport damage induced by oxygen free radicals in human red cell membranes. *J. Biol. Chem.*, 1983; 258: 3107-3113.
97. Murrison I., Braquet P., Garay R. P.: The effect of lipid peroxidation on transport function in human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Acta*, 1983; 42: 58-62.
98. Martin-Mateo M.C., Sanchez-Portugal M., Iglesias S., i in.: Oxidative stress in chronic renal failure. *Ren. Fail.*, 2009; 21(92): 155-167.
99. Maslen C., Stevens T.R.J., Hall N.D.: The generation of lipid peroxides by stimulated human neutrophils. Detection using phenol red oxidation. *J. Immunol. Meth.*, 1987; 98: 71-76.
100. Masotti I., Casar E., Galeotti T.: Lipid peroxidation in tumor cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 1988; 4: 377-386.
101. Matsubara L.S., Machado P.E.A.: Age- related changes of glutathione content glutathione reductase and glutathione peroxidase activity of human erythrocytes. *Brazil. J. Med. Biol. Res.*, 1991; 24: 449-454.

102. Mc Cord J.M.: Oxygen – derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.*, 1985; 312: 159-163.
103. Misselwitz J., Franke S., Kauf E., i in.: Advance glycation end products in children with chronic renal failure and type 1 diabetes. *Pediatr. Nephrol.*, 2002; 17: 316-321.
104. Miura K., Ishii T., Sugita Y., i in.: Cysteine uptake and glutathione level in endothelial cells exposed to oxidative stress. *Amer. J. Physiol.*, 1992; 262: 50-58.
105. Miyata S, Saito A, Kurokawa K i in.: Advanced glycation and lipoxidation end produkt: reactive carbonyl compounds-related uraemic toxicity. *Nephrol Dial Trasplant*, 2001; 16: 8.
106. Miyata S., Monnier V.: Immunohistochemical detection of advanced glycolysation end products in diabetic tissues using monoclonal antibody to pyrraline. *J. Clin. Invest.*, 1992; 89: 1102-1112.
107. Miyata T., Wada Y., Cai Z., in.: Implication of an increased oxidative stress in the formation of advanced glycation end products in patients with and stage renal failure. *Kidney Int.*, 1997; 51: 1170-1181.
108. Morrow D.A., de Lemos J. A., Sabatine M.S., i in.: The search for a marker of cardiac ischemia. *Clin. Chem.*, 2003; 49: 537-538.
109. Münch G., Keis R, Weßels A., i in.: Determination of AGEs in serum by Fluorescence Spectroscopy and Competitive ELISA. *Chem. Clin. Biochem.*, 1997; 35: 669-677.
110. Nagai R., Ikeda K., Kawasaki Y.: Conversion of Amadori product of Millard reaction to N-(carboxymethyl)lysine in alkaline condition. *FEBS Lett.*, 1998; 425: 355-360.
111. Nakayam M., Kawaguchi Y., Yamada K., i in.: Immunocistochemical detection of advanced glycosylation end products in the peritoneum and its possible pathophysiological role CAPD. *Kidney Int.*, 1997; 51:187-194.
112. Nakayama H, Taneda S, Kuwajima S i in.: Production and characterization of antibodies to advanced glycation products on proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989; 162: 2.
113. Nakayama T., Kimura T., Kodama M., i in.: Generation of hydrogen peroxide and superoxide anion radical from active metabolites

- of naphtyl aminem and aminoazo dyes: its possible role in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 1983; 4: 765-769.
114. Naskalski J. W.: Oksydatywnie zmodyfikowana albumina (IMA) jako wskaźnik niedotlenienia mięśnia sercowego. *In Vitro Explorer*, 2006; 1(5): 18-23.
 115. Naskalski J.W., Bartosz G.: Oxidative modifications of protein structures. W: *Advances of Clinical Biochemistry*. Academic Press Heartcourt Pub. Comp. San Diego-London-Sydney, 2000; 35: 134-195.
 116. Naskalski J.W.: Postępy w diagnostyce laboratoryjnej w 2004 roku. *Medycyna Praktyczna*, 2005; 3: 42-50.
 117. Nejad H.H., Bottje W.G.: Glutathione depletion and rabbit renal medulla 6- keto PGF1 alpha and TXB2- levels in vivo and following homogenate incubation in vitro. *Intern. Biochem.*, 1992; 54: 561-564.
 118. Niki E.: Action of ascorbic acid as scavenger of active and stable oxygen radicals. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 1991; 54: 1119-1124.
 119. Nishikawa T., Edelstein D., Du X.L., i in.: Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, 2000; 404: 787-790.
 120. Nobuyuki T., Kiyoshi T.: Generation of superoxide anion radical from atmospheric organic matter. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1988; 40: 678-682.
 121. Odetti P., Fogarty J., Sell D., i in.: Millard reaction-mediated damage to extracellular matrix and other tissue proteins in diabetes and uremic subjects. *Diabetes*, 1992; 41: 153-159.
 122. Okuda M., Lee H.C., Chance B., i in.: Glutathione and ischemia – reperfusion injury in the perfused rat liver. *Free Radic. Biol. Med.*, 1992; 12: 271-279.
 123. Opolski G., Filipiak K., Poloński L.: *Ostre zespoły wieńcowe*. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław, 2002.
 124. Otin M., Nagaraj R., Monnier V.: Chromatographic evidence for pyrraline formation during protein glycation *in vitro* and *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1995; 1247: 74- 80.
 125. Packer L.: Vitamin E, physical exercise and tissue damage in animals. *Med. Biol.*, 1984; 62: 105-109.

126. Paller M.S., Sikora J.J.: Renal work, glutathione and susceptibility to free radical-mediated postischemic injury. *Kidney Int.*, 1988; 33: 843-849.
127. Papadopoulos-Eleopoulos E., Turner V.F., Papadimitriou J.M.: Oxidative stress, HIV and AIDS. *Res. Immunol.*, 1992; 143: 145-148.
128. Pearson T.A., i in.: Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the center for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*, 2003; 107: 499-511.
129. Pelissier M.A., Boisset M., Albrecht R.: The effects of vitamin A nutritional status on microsomal lipid peroxidation and alpha-tocopherol level in rat liver. *Experientia*, 1989; 45: 342-343.
130. Pfafferoth C., Meiselman H.J., Hochstein P.: The effect of malonyldialdehyde on erythrocyte deformability. *Blood*, 1982; 52: 12-15.
131. Pryor W.A.: The involvement of free radicals in chemical carcinogenesis. *Anticarcinogenesis and radiation protection*. Red. Cerruti P.A., Nygaard O.F., Simic M.G., 1987; 1-9, Nowy Jork.
132. Ramasarma T.: H₂O₂ has a role in cellular regulation. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 1990; 27: 269-274.
133. Regena JR., Fu MX., Ahmed MU.: Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to protein during lipid peroxidation reactions. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 1996; 11: 48.
134. Robac T., Robac E.: *Biologia i klinika przewlekłej choroby ziarniakowej*. *Przegląd lek.*, 1992; 49: 168-171.
135. Rohlfing C.L., Wiedmeyer H. M., Little R.R., i in.: Defining the relationship between plasma glucose and HbA1c: analysis of glucose profiles and HbA1c in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care*, 2002; 25: 275-278.
136. Root R.K., Metcalf J.A.: Hydrogen peroxide release from human granulocytes during phagocytosis. *J. Clin. Invest.*, 1977; 60: 1266-1279.
137. Sai K., Umemura T., Takagi A., i in.: The protective role of glutathione, cysteine and Vitamin C against oxidative DNA damage

- induced In rat kidney by potassium bromate. *Japan J. Cancer Res.*, 1992; 83: 45-51.
138. Salahudeen A.K., Clark E.C., Nath K.A.: Hydrogen peroxide induced renal injury – a protective role for pyruvate in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.*, 1991; 88: 1886-1893.
139. Saran M., Bors W.: Oxygen radicals acting as chemical messengers: A hypothesis. *Free rad. Res. Comms.*, 1989; 7: 213-220.
140. Sauqstad O.D.: Neonatal oxygen disease. *Recent Advances in Pediatrics*, 1992; 173-187. red. David T.J., Edynburg, Churchill Livingstone.
141. Scolnik EY., Yang Z., Makita Z. i in.: Human and rat mesangial cell receptors for glucose-modified proteins: Potential role in kidney tissue remodeling and diabetic nephropathy. *J. Exp. Med.*, 1991; 174: 931.
142. Sebakowa K, Heidland A, Pączek L.: Neuropatia cukrzycowa – aktualny stan wiedzy. *Nefrol. Dial. Pol.*, 1999; 2: 74.
143. Sebecova K., Krajcovicova-Kudlackova M., Schinzel R., i in.: Plasma levels of advanced glycation and products in healthy, long-term vegetarians subjects on a western mixed diet. *Eur. J. Nutr.*, 2000; 44: 129.
144. Sinclair A. J. i in.: Disturbed handling of ascorbic acid in diabetic patients with and without microangiopathy during high dose ascorbate supplementation. *Diabetologia*, 1991; 34 (3): 171-175.
145. Sinclair A.I., Lunec J., Girling A.J.: Modulators of free radical activity in diabetes mellitus: role of ascorbic acids. *Free Radicals and Ageing* red. Emerit J., Chance B., 1992; 342-352, Bazytea, Birkhauser Verlag.
146. Sinha M.K., Gaze D.C., Tippinis J.R., i in.: Ischemia modified albumin is a sensitive marker of myocardial ischemia after percutaneous coronary intervention. *Circulation*, 2003; 107: 2403-2405.
147. Sinha M.K., Roy D., Gaze D.C., i in.: Role of ischemia modified albumin, a new marker of myocardial ischemia, in the early diagnosis of acute coronary syndromes. *E.M.J.*, 2004; 21: 29-34.
148. Slater T.F: Free – radical mechanism in tissue injury. *Biochem. J.*, 1984; 222: 1-15.

149. Słowik-Żyłka D., Safranow K., Ciechanowski K.: Późne produkty glikacji białek (AGE) – powstanie, znaczenie, patogenetyczne, oznaczanie. *Diabetologia Polska*, 2001; 8: 218-221.
150. Solaria S.C., Babbs C.F., Voorhees W.D.: Methylene blue as an inhibitor of superoxide generation by xathine oxidase – a potential new drug for the attenuation of ischemia/reperfusion injury. *Biochem. Pharmacol.*, 1991; 42: 499-506.
151. Stringer M.D., Gorog P.G., Freeman A., i in.: Lipid peroxides and atherosclerosis. *Br. Med. J.*, 1989; 298: 281-284.
152. Styszyński A, Korybalska K, Wieczorowska-Tobis: Nieenzymatyczna glikozylacja białek – potencjalna rola w patogenezie chorób i starzeniu. *Gerontologia Polska*, 2001; 9: 8.
153. Sun Y.: Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis. *Free Radic. Biol. Med.*, 1990; 8: 583-599.
154. Takahashi M., Hoshino H., Kushida K., i in.: Direct qualification of pentosidine in urine and serum by HPLC with column switching. *Clin. Chem.*, 1996; 42: 1439-1444.
155. Talior I., Tennenbaum T., Kuroki T., i in.: PKC-delta-dependent activation of oxidative stress in adipocytes of obese and insulin-resistant mice: role for NADPH oxidase. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2005; 288: E405-E411.
156. Tanji N. i in.: Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Neph.*, 2000; 11: 1656-1666.
157. Taylor A.E., Townsley M.J.: Assessment of oxygen radical tissue damage. *Physiology of Oxygen Radicals*, 1986; 19-38.
158. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 1997; 20: 1183-1197.
159. Thompson K.H. i in.: Micronutrients and antioxidants in the progression of diabetes. *Nutr. Res.*, 1995; 15 (9): 1377-1410.
160. Torres A.M., Ochoa J.E., Elias M.M: Role of lipid peroxidation on renal dysfunction associated with glutathione depletion – effects of Vitamin E. *Toxicology*, 1991; 70: 163-172.

161. Turyna B., Guzdek A.: Nieenzymatyczna glikozylacja białek. *Post. Bioch.*, 1985; 31: 555-567.
162. Varani J., Ginsburg I., Gibbs D.F., i in.: Hydrogen peroxide-induced cell and tissue injury: protective effects of Mn²⁺. *Inflammation*, 1991; 15: 291-301.
163. Waniek A., Wysocki J., Chorąży m.: Rola wolnych rodników w patologii człowieka. *Pol. Tyg. Lek.*, 1990; XLV: 1950199.
164. Wardman P., Candeias L.P.: Fenton chemistry: an introduction. *Rediat. Res.*, 1996; 145: 523-531.
165. Wautier J.L., Wautier M.P., Schmidt A.M., i in.: Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 9: 7742-7746.
166. Wawrusiewicz-Kurylonek N., Górńska M.: Hiperglikemia stresu. Artykuł poglądowy. *Przegląd Kardiometaboliczny*, 2007; 2 (2): 98-194.
167. Willson R.L.: Hydroxyl radicals and biological damage in vitro: what relevance in vivo? *CIBA Found. Symp.*, 1979; 19-42.
168. Witz G.: Active oxygen species as factors in multistage carcinogenesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1991; 198: 675-682.
169. Wohaieb S.A., Godin D.: Alternations in free radical tissue defense mechanisms in streptozotocin induced diabetes in rat. *Diabetes*, 1987; 36: 10014-1018.
170. Wu A.H.B., Morris D.L., Fletcher D.R., i in.: Analysis of the Albumin Cobalt Binding Test (ACBTM) as an adjunct to cardiac troponin I the early detection of acute myocardial infarction. *Cardiovasc. Toxicol.*, 2001; 1: 147-152.
171. Yamamoto Y., Niki E., Kamiya Y., i in.: Free radical chain oxidation and hemolysis of erythrocytes by molecular oxygen and their inhibition by Witamin E. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 1986; 34: 475-479.
172. Yan SR., Ramasamy R., Naka Y., i in.: Glycation, Inflammation, and RAGE a scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circ. Res.*, 2003; 93: 1159-1169.

173. Zapico-Muniz E., Santalo-Bel M., Merce-Muntanola J., i in.: Ischemia-modified albumin during skeletal muscle ischemia. *Clin. Chem.*, 2004; 50: 1063-1065.
174. Zoratti M., Szabo I., de Marchi U.: Mitochondrial permeability transations: how many doors to the house? *Biochim. Biophys. Acta.*, 2005; 1706: 40-52.

ANEKS

AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU
NIEZALEŻNA KOMISJA BIOETYCZNA
DO SPRAW BADAŃ NAUKOWYCH
przy Akademii Medycznej w Gdańsku
50-210 Gdańsk, ul. M. Skłodowskiej-Curie 3 A
t. 58 349-10-11

Gdańsk, 2004-03-15

NKEBN/15/2004

Pani
Prof. dr hab. med. Wiesława Łysiak-Szydłowska
Kierownik Zakładu Żywienia Klinicznego
i Diagnostyki Laboratoryjnej
Instytut Chorób Wewnętrznych
Akademia Medyczna w Gdańsku

W odpowiedzi na zgłoszenie badań z dnia 5.01.2004 r. na temat: „Hiperglikemia i warunki stresu oksydacyjnego a końcowe produkty glikacji białek w różnych stanach klinicznych” (*planowana praca na stopień doktora nauk medycznych mgr Aleksandry Słowińskiej*) - Niezależna Komisja Bioetyczna do Spraw Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku rozpatrzyła ww. zgłoszenie na posiedzeniu w dniu 29 stycznia 2004 r. i ponownie w dniu 11 marca 2004 r. z udziałem wnioskodawcy - oraz po wysłuchaniu wyjaśnień na wątpliwości Komisji - wyraża zgodę na prowadzenie badań w zakresie przedstawionym w projekcie pracy stwierdzając, że są to badania poznawcze, nie stanowiące istotnego zagrożenia dla zdrowia pacjentów.

PRZEWODNICZĄCY
Niezależnej Komisji Bioetycznej
do Spraw Badań Naukowych
przy Akademii Medycznej w Gdańsku
prof. dr hab. med. Stefan Raszeja

Gdańsk, 2005-02-08

NKEBN/15-109/2005

Pani
Prof. dr hab. med. Wiesława Łysiak-Szydłowska
Kierownik Zakładu Żywienia Klinicznego
i Diagnostyki Laboratoryjnej
Instytut Chorób Wewnętrznych
Akademia Medyczna w Gdańsku

W odpowiedzi na pismo z dnia 2.02.2005 r. zgłaszające wprowadzenie poprawek do realizowanego badania na temat: „**Hiperglikemia i warunki stresu oksydacyjnego a końcowe produkty glikacji białek w różnych stanach klinicznych**” (praca na stopień doktora nauk medycznych mgr Aleksandry Słowińskiej) - Niezależna Komisja Bioetyczna do Spraw Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku na posiedzeniu w dniu 3 lutego 2005 r. zapoznała się z ww. wnioskiem i akceptuje wprowadzone zmiany, polegające na rozszerzeniu zakresu prowadzonych badań o grupę pacjentów poddawanych pełnemu znieczuleniu, gdyż poprawki te są dokonane w celu usprawnienia przebiegu badania i dadzą pełniejszy wynik zagadnień poruszonych w prowadzonej pracy doktorskiej oraz podtrzymuje wydaną decyzję na ww. program badawczy NKEBN/15/2004 z dnia 15.03.2004 r.

PRZEWODNICZĄCY

Niezależnej Komisji Bioetycznej
do Spraw Badań Naukowych
przy Akademii Medycznej w Gdańsku

prof. dr hab. med. Stefan Raszeja