

Wojciech Skrobot

**WPLYW ZMIAN ZWYRODNIENIOWYCH STAWU
BIODROWEGO NA POTENCJAŁ OKSYDACYJNY
MIĘŚNIA SZKIELETOWEGO CZŁOWIEKA**

Katedra i Zakład Rehabilitacji, Samodzielna Pracownia Kinezyterapii
i Diagnostyki Funkcjonalnej Akademii Medycznej w Gdańsku.

praca doktorska

Promotor:
Prof. dr hab. med. Jan Stepiński

Gdańsk 2006

Pracę dedykuję pamięci Pana Profesora Jerzego Popinigisa,
dzięki któremu rozpocząłem badania naukowe.

Serdecznie dziękuję promotorowi Panu Profesorowi
Janowi Stępińskiemu, za okazaną życzliwość, ogromną pomoc
i cierpliwość przy realizacji tej pracy.

... dziękuję Panu dr Wiesławowi Ziółkowskiemu za okazane
mi wsparcie.

SPIS SKRÓTÓW	5
WSTĘP	6
1. CHOROBA ZWYRODNIENIOWA	6
2. PATOMECHANIZM CHOROBY ZWYRODNIENIOWEJ	10
3. ZMIANY MORFOLOGICZNE MIĘŚNIA SZKIELETOWEGO WYWOŁANE UNIERUCHOMIENIEM	12
4. ZMIANY METABOLICZNE ZACHODZĄCE W MIĘŚNIU SZKIELETOWYM WYWOŁANE UNIERUCHOMIENIEM	15
4.1. Glikoliza i przemiany tlenowe.	15
4.2. Stres oksydacyjny.	19
5. REAKTYWNE FORMY TLENU	23
5.1. Metabolizm reaktywnych form tlenu.	23
5.2. Rola ROS w zdrowiu i chorobie.	28
CEL PRACY	33
MATERIAŁ	34
METODY	36
1. Przygotowanie ekstraktu z mięśnia.	36
2. Oznaczenie ilości białka.	37
3. Oznaczanie aktywności enzymatycznych.	38
3.1 Oznaczanie aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) [E.C.1.1.1.27]	38
3.2 Oznaczanie aktywności dehydrogenazy jabłczanowej (MDH) [EC.1.1.1.37].	39
3.3. Oznaczanie aktywności oksydazy cytochromu c (COX) [EC 1.9.31].	40
3.4. Oznaczanie aktywności katalazy (CAT) [EC 1.11.1.6].	41
3.5. Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) [EC 1.15.1.1].	42
4. Oznaczanie produktów peroksydacji białek i lipidów:	44
4.1. Oznaczanie stężenia grup sufhydrylowych (grup SH).	44
4.2. Oznaczanie stężenia dialdehydu malonowego (MDA).	44
5. Metody statystyczne.	45
WYNIKI	46
1. Aktywności enzymów generujących NAD(P)H.	46
2. Aktywności enzymów metabolizmu wolnych rodników tlenowych.	49
3. Wpływ reaktywnych form tlenu na białka i lipidy w mięśniach unieruchomionych.	52
NAJWAŻNIEJSZE OBSERWACJE	55
DYSKUSJA	56
WNIOSKI	64
STRESZCZENIE	65
PIŚMIENNICTWO	67
APENDIX	76
ZGODA KOMISJI ETYKI	85

SPIS SKRÓTÓW

BHT	- butylohydroksytoluen
BSA	- albumina surowicy krwi wołu
CAT	- katalaza
COX	- oksydaza cytochromowa
CuZnSOD	- dysmutaza ponadtlenkowa cytoplazmatyczna
DTNB	- kwas 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoesowy)
EDTA	- kwas etylenodiaminotetraoctowy
EDTANa ₃	- kwas etylenodiaminotetraoctowy-sól sodowa
LDH	- dehydrogenaza mleczanowa
M-LDH	- dehydrogenaza mleczanowa-podj. mięśniowa
H-LDH	- dehydrogenaza mleczanowa-podj. sercowa
MDA	- dialdehyd malonowy
MDH	- dehydrogenaza jabłczanowa
c-MDH	- dehydrogenaza jabłczanowa-cytoplazmatyczna
m-MDH	- dehydrogenaza jabłczanowa-mitochondrialna
MHC I	- ciężki łańcuch miozyny I (włókien wolnych)
MHC II	- ciężki łańcuch miozyny II (włókien szybkich)
NADH	- dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy-forma zredukowana
NAD(P)H	- fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego-forma zredukowana
NO	- tlenek azotu
OA	- osteoarthritis
OAA	- kwas szczawiooctowy
ROS	- reaktywne formy tlenu
SDS	- siarczan dodecyłu
SH	- grupy sulfhydrylowe
SOD	- dysmutaza ponadtlenkowa
CuZnSOD	- dysmutaza ponadtlenkowa cytoplazmatyczna
MnSOD	- dysmutaza ponadtlenkowa mitochondrialna
TBARS	- substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym
Tris-HCL	- chlorowodorek tris hydroksymetyloaminometanu
XOD	- oksydaza ksantynowa

WSTĘP

Od kilku dziesięcioleci w krajach wysoko rozwiniętych obserwuje się wyraźny wzrost średniej długości życia, co przy zmniejszającym się przyroście naturalnym oznacza wzrastające procentowo starzenie się społeczeństwa. Jedną z najważniejszych umiejętności dla osób starszych jest zachowanie samodzielności, czego oczywistym przejawem jest niezależne poruszanie się. Niestety, w starszym wieku dochodzi do ograniczenia tej zdolności, a często tego przyczyną są zmiany zwyrodnieniowe w stawach kończyn dolnych.

1. CHOROBA ZWYRODNIENIOWA

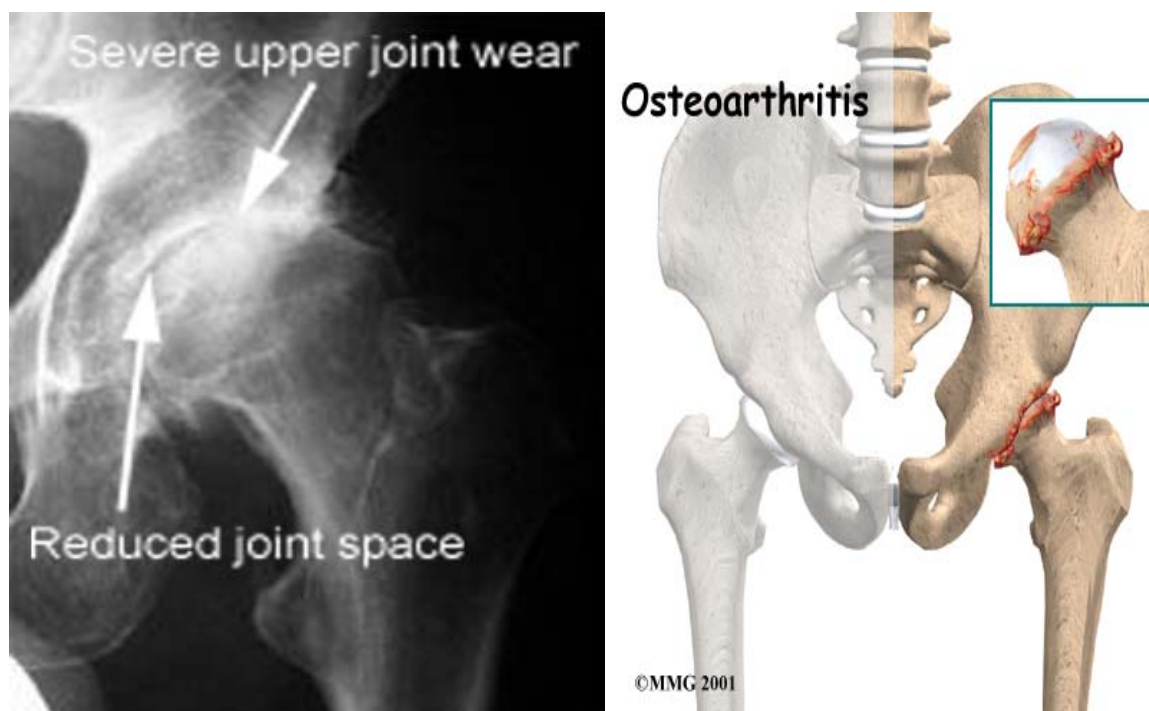
Istnieje wiele różnych definicji choroby zwyrodnieniowej stawu - osteoarthritis (OA) i ulegają one ciągłym zmianom wynikającym z rozwoju nauki, który przyczynia się do coraz bardziej szczegółowego badania jej genezy i związanych z nią patologii. Przez wiele lat dominował pogląd, iż jest to choroba rozwijająca się z wiekiem, związana z przeciążeniami, a przede wszystkim dotycząca zużywania się chrząstki stawowej „wear and tear” (Dieppe 1999; Dega 1983; Tanaka *et al.* 1998). Obecnie chorobę zwyrodnieniową definiuje się jako kompleks chorobowy dotyczący kości i chrząstki stawów, powstały pod wpływem czynników mechanicznych, metabolicznych i genetycznych (Dieppe 1999; Senior 2000; Newman and Wallis 2002), a zmiany mogą dotyczyć jednego, lub wielu stawów jednocześnie (Felson 1990; Wierusz-Kozłowska and Markuszewski 2003).

Osteoarthritis występuje najczęściej pomiędzy 30 a 65 rokiem życia i w tym okresie ilość zachorowań wzrasta 2 – 10 krotnie i dalej zwiększa się z wiekiem (Oliveria *et al.* 1995). Powszechność występowania zmian zwyrodnieniowych przed 50 rokiem życia jest większa u mężczyzn niż u kobiet. Natomiast po 50 roku życia częściej dotyczy kobiet, szczególnie z umiejscowieniem w stawach rąk, stóp, kolan. Zmiany dotyczące bioder w tym

okresie częściej występują u mężczyzn (van Saase *et al.* 1989). Należy jednak zwrócić uwagę na stany ostre w stawie biodrowym u osób po 40 roku życia występujące półtorakrotnie częściej u kobiet (5,6%) niż u mężczyzn (3,7%) (D'Ambrosia 2005). W USA ponad 60 mln Amerykanów choruje na OA, a 3,1% całej populacji w wieku między 55 – 74 rokiem życia jest w ostrym lub średnim stadium choroby dotyczącej stawu biodrowego (O'Sullivan and Schmitz 2001).

Rycina 1. Zmiany zwyrodnieniowe stawu biodrowego.

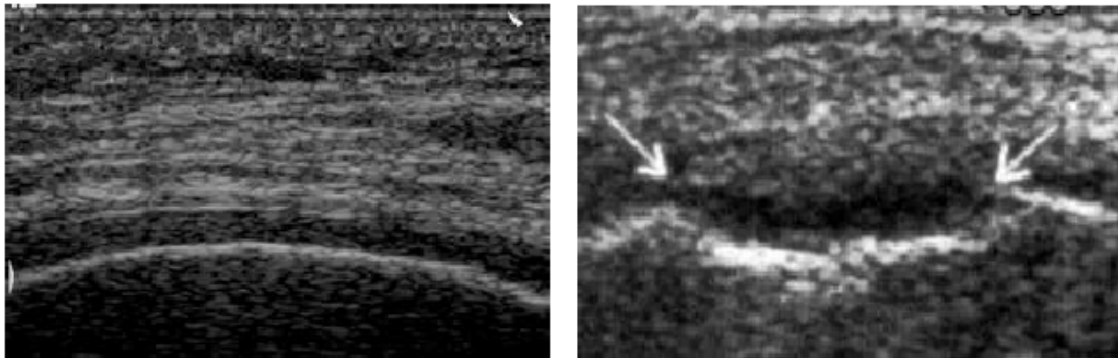
(Źródło: www.hipandkneesurgery.com.sg)



Jednym z pierwszych objawów choroby jest pojawiający się ból, przede wszystkim podczas obciążania stawu, którego ten proces dotyczy. Stopniowo dochodzi do ograniczania ruchomości stawu biodrowego i ograniczenia możliwości chodzenia, osłabienia kończyny, uczucia zmęczenia, a w dalszej kolejności okresowych dolegliwości bólowych (Senger 1984). Ból występuje nie tylko podczas poruszania się, ale również w czasie spoczynku, w nocy. Choroba trwa zwykle wiele lat, a objawy narastają stopniowo z różną szybkością, może dotyczyć jednego lub obu stawów biodrowych. Rozpoznanie choroby opiera się na dokładnie zebranym wywiadzie od chorego, badaniu

klinicznym chorego i zdjęciach radiologicznych stawów, ultrasonografii (USG) (Ryc.1, 2).

Rycina 2. Obraz chrząstki na kłykcium przyśrodkowym kości udowej. (A). Chrząstka prawidłowa; (B). Ubytek chrząstki – kostny (Czyrny 2001)



Nie udało się dotychczas określić pojedynczego czynnika odpowiedzialnego za predyspozycje do osteoarthritis. Czynniki sprzyjającymi występowaniu tej choroby są m.in.: wiek oraz przebyte urazy w okresie przed uzyskaniem dojrzałości, które mogą być później przyczyną przebudowy tkanki kostnej oraz zmian w mechanice i odżywianiu stawów (O'Sullivan and Schmitz 2001). Trudno jest też określić czy przyczyną tych zmian jest konkretna choroba, czy też kilka różnych przyczyn składających się na końcowy obraz OA. Szereg obserwacji wskazuje, że choroba zwyrodnieniowa dotycząca stawu biodrowego i kolanowego może być wywołana różnymi często bardzo odmiennymi czynnikami (Felson *et al.* 2000). Niektórzy badacze zastanawiają się też czy choroby zwyrodnieniowej nie klasyfikować jako oddzielnej jednostki chorobowej w której czynnik genetyczny odgrywa większą rolę predestynującą niż czynnik lokalny np. mechaniczny (Spector *et al.* 1996).

Zmiany zwyrodnieniowe mogą mieć charakter **pierwotny** (arthrosis deformans idiopathica) oraz **wtórny** (arthrosis deformans secundaria). Jeżeli chory w przeszłości nie przechodził żadnej choroby stawu biodrowego, ani nie

doznał urazu biodra, a mimo to rozwinęły się zmiany zwyrodnieniowe to można mówić o koksartrozie **pierwotnej** samoistnej (Mitchell and Cruess 1977). Przyczyny jej powstania nie są dokładnie poznane. Istniejące hipotezy dotyczące etiologii koksartrozy pierwotnej podkreślają znaczenie zmian składu chemicznego i właściwości fizycznych płynu stawowego (Wierusz-Kozłowska and Markuszewski 2003). Efektem są zaburzenia ukrwienia stawu, upośledzenie odżywiania chrząstki stawowej i zwiększenie tarcia powierzchni stawowych. W konsekwencji, tych często powtarzających się urazów może dochodzić do złamań beleczek kostnych w warstwie podchrzęstnej głowy kości udowej i panewki stawu biodrowego.

Wtórne zmiany zwyrodnieniowe mogą być wywołane m.in.: wrodzoną dysplazją biodra z decentralizacją głowy kości udowej, zaburzeniami okresu wzrostowo - rozwojowego biodra (choroba Perthesa - młodzieńczego złuszczenia głowy kości udowej), zmianami urazowymi, zapaleniem stawu biodrowego, urazowym zwichnięciem stawu biodrowego, złamaniem głowy lub szyjki kości udowej, złamaniem panewki stawu biodrowego, jałową idiopatyczną (o nieznanym przyczynie) martwicą głowy kości udowej dorosłych oraz innymi chorobami i urazami biodra. Natomiast dynamika postępu choroby zwyrodnieniowej stawu biodrowego pozwala na wyróżnienie jej postaci hipertroficzej i atroficznej (Solomon 1976).

Wiele bardzo znaczących czynników może mieć wpływ na występowanie tej choroby. Zaobserwowano zróżnicowanie występowania OA w różnych grupach etnicznych, np. częstsze występowanie zmian zwyrodnieniowych stawów kolanowych u kobiet Amerykanek pochodzenia afrykańskiego niż u mężczyzn (Felson *et al.* 2000). Wykazano również, że 35% częściej mężczyźni – Amerykanie pochodzenia afrykańskiego wykazują zmiany w stawach biodrowych w porównaniu z mężczyznami rasy białej (Jordan *et al.* 1997). Z kolei większa częstość występowania OA u kobiet w okresie postmenopauzalnym sugeruje znaczącą rolę estrogenów (Nevitt *et al.* 1996).

Zwraca się uwagę na zależność między wskaźnikiem gęstości kości (BMD bone mineral density) – a występowaniem zmian zwyrodnieniowych w stawach biodrowych i kolanowych. Wyższy poziom BMD był zgodny z występowaniem zmian zwyrodnieniowych (Nevitt *et al.* 1995; Hannan *et al.* 1993). Coraz większe znaczenie przypisuje się badaniom, które odnoszą się do genetycznego podłoża występowania osteoarthritis (Scott 2002).

Potwierdzeniem ich znaczenia są wcześniejsze badania określające, iż co najmniej w 50% przypadków OA dotyczących rąk i stawów biodrowych ma podłoże genetyczne (Spector *et al.* 1996). Wykazano też, że czynnikami patogennymi są m.in. uszkodzenia powierzchni stawowych, przemieszczenia wewnątrzstawowe, uszkodzenia więzadeł czy innych struktur stawowych (Buckwalter and Lane 1997; Buckwalter and Mankin 1997; Honkonen 1995), obciążenia wynikające z wykonywanego zawodu (Felson *et al.* 1991; Coggon *et al.* 1998; Hadler *et al.* 1978), uprawianie sportu, w szczególności sportu zawodowego (Buckwalter and Lane 1997; Kujala *et al.* 1994; Kujala *et al.* 1995).

2. PATOMECHANIZM CHOROBY ZWYRODNIENIOWEJ

Patomechanizm zmian w chorobie zwyrodnieniowej stawów prowadzi kolejno do zmiękczenia, włóknienia, owrzodzenia i w konsekwencji zniszczenia chrząstki stawowej. Skutkiem jest stwardnienie kości pod chrząstką oraz powstanie osteofitów i torbieli w warstwie podchrzęstnej (Hamerman 1989). Początkowe zmiany dotyczące chrząstki stawowej związane są ze zwiększeniem w niej zawartości wody będące przypuszczalnie efektem wzrostu syntezy proteoglikanów (O'Sullivan and Schmitz 2001). W późniejszym okresie choroby następuje zmniejszenie się ilości proteoglikanów i zawartości wody w chrząstce stawowej, a chrząstka traci swoje zdolności tolerowania sił ściskających - odkształcających (Stryer 1999) oraz swoją elastyczność. W efekcie prowadzi to do przeniesienia sił kompresji na kość leżącą pod chrząstką. Odpowiedzią kości

jest zwiększenie syntezy kolagenu chrząstki przy jednoczesnym zmniejszeniu udziału typu II na rzecz typu I szerzej występującego w skórze i tkance włóknistej. Wszystkie te procesy prowadzą do zwężenia szpary stawu (Threlkeld and Currier 1988), a pierwszymi widocznymi oznakami tych zmian jest wycieranie (łuszczenie) powierzchniowych włókien kolagenowych. W miejscach większych obciążeń dochodzi do wycierania się włókien położonych w głębszych warstwach, aż do warstwy podchrzęstnej, która może ulec stwardnieniu i sztywnieniu w większym stopniu niż normalna kość. W rezultacie dochodzi do zwiększenia tarcia, zmniejszenia amortyzacji wstrząsów oraz zwiększenia wpływu obciążenia. Na brzegach powierzchni stawowych pojawiają się osteofity. Ich geneza nie jest ciągle wyjaśniona. Przypuszcza się, że istotną rolę w ich powstawaniu odgrywa (van Beuningen *et al.* 1994; Homer *et al.* 1998) m.in. czynnik genetyczny – gen receptora 1,25-dihydroksywitaminy D₃ (Uitterlinden *et al.* 1997) oraz cytokiny – interleukiny 1 (IL – 1) i transferującego czynnika wzrostu beta (TGF - β). Proces ten zapoczątkowany jest powstaniem krwiaka w miejscu uszkodzenia w wyniku napływu krwi z naczyń okolicy uszkodzonej tkanki chrzęstnej (Buckwalter and Brown 2004). Powstały skrzep zawierający elementy włókien kolagenowych rozszerza się wypełniając wszystkie uszkodzone miejsca na powierzchni stawowej. Znajdujące się wewnątrz skrzepliny płytki krwi uwalniają naczynioaktywne mediatory oraz cytokiny z rodziny transformujących czynników wzrostu β (TGF - β), rodziny insulino podobnych czynników wzrostu (IGF) i rodziny czynników wzrostu fibroblastów (FGF), które odpowiedzialne są za proliferację i różnicowanie chondrocytów.

Charakterystycznymi objawami klinicznymi choroby zwyrodnieniowej jest ból, ograniczenie ruchomości w stawie z typowym obrazem rtg - zwężeniem szpary stawowej, stwardnieniem warstwy podchrzęstnej i występującymi osteofitami na krawędziach stawu (Kellgren and Lawrence 1957; Kellgren *et al.* 1963). Poważną konsekwencją zwyrodnienia stawu biodrowego jest ograniczenie

możliwości chodzenia, co stanowi najpowszechniejszą przyczynę kalectwa wśród osób powyżej 65 roku życia. Oczywistym skutkiem ograniczenia ruchomości stawu jest zmniejszona aktywność ruchowa układu mięśniowego, doprowadzająca do zmian w ich metabolizmie i strukturze.

3. ZMIANY MORFOLOGICZNE MIĘŚNIA SZKIELETOWEGO WYWOŁANE UNIERUCHOMIENIEM

Stan w którym dochodzi do długotrwałej zmniejszonej aktywności ruchowej określamy mianem hipokinezji. Może być ona wywołana występowaniem określonych chorób np. chorobą Parkinsona, lub może być wynikiem zmian dotyczących głównie aparatu ruchu – np. zmian zwyrodnieniowych stawu biodrowego. Choroby te mogą prowadzić do: **bradykinezji**, charakteryzującej się zmniejszeniem ogólnej aktywności ruchowej oraz **hipodynamii**, w której dochodzi do obniżenia oporów powstających podczas wykonywania ruchów.

Bardzo mało jest obserwacji opisujących metabolizm mięśnia szkieletowego człowieka podczas „naturalnej hipokinezji”, a te które są dotyczą różnych, głównie eksperymentalnych modeli unieruchomienia. Większość naszych obserwacji pochodzi z badań modelu „bed rest” – leżenia w łóżku, „space flight” - stanów nieważkości podczas lotów kosmicznych, oraz z obserwacji różnorodnych unieruchomień za pomocą opatrunku gipsowego. Istotnym uzupełnieniem naszej wiedzy są wyniki badań przeprowadzanych na „modelach zwierzęcych” i przedstawiających różne formy unieruchomienia dotyczących głównie kończyn.

Jedną z pierwszych konsekwencji hipokinezji mięśni szkieletowych jest ich **atrofia** objawiająca się m.in. zmniejszaniem masy, przekroju poprzecznego mięśnia, osłabieniem siły oraz transformacją włókien mięśniowych. Przykładowo, po 84 dniowym leżeniu w łóżku rozmiar mięśnia obszernego boczego (vastus lateralis) maleje o 17%, natomiast przekrój pojedynczego

włókna mięśniowego MHC I i IIa ulega zmniejszeniu odpowiednio o 15 i 8%, a ich siła odpowiednio o 60 i 25% (Trappe *et al.* 2004). W warunkach tych dochodzi również do zmian kompozycji występowania poszczególnych hybryd włókien mięśniowych. Zwiększył się udział włókien typu IIa oraz pojawiły się włókna typu IIx, przesunięciu ulega stosunek procentowy zawartości włókien mięśniowych z włókien I typu na rzecz typu IIa. Podobna transformacja włókien typu I do IIx była obserwowana w mięśniu obszernym bocznym (*vastus lateralis*) u pacjentów po uszkodzeniu rdzenia kręgowego (Talmadge *et al.* 2002). W innych badaniach wykazano, że średni przekrój mięśnia płaszczkowatego (*soleus*) po 4 miesiącach leżenia w łóżku uległ zmniejszeniu o 36%, zaś siła skurczu tężcowego uległa zmniejszeniu o 76%, co w przeliczeniu na przekrój poprzeczny daje rzeczywisty spadek o 42% (Yamashita-Goto *et al.* 2001). Podobne wyniki uzyskali też inni autorzy (D'Antona *et al.* 2003), przy czym różnice wydają się być związane z rodzajem unieruchomienia oraz sposobem porównania populacji osób starszych z młodymi. Wraz z wiekiem podobnie jak w unieruchomieniach maleje siła mięśniowa, jakkolwiek przyczyna zjawiska nie leży tylko w mniejszej ich masie. Nasuwa się ogólny wniosek, że włókna mięśniowe typu pierwszego z dominującym w nich metabolizmem tlenowym charakteryzują się większą atrofią niż włókna szybkie (Appell 1990). Nieco odmienny efekt obserwuje się w hipokinezji powstającej w warunkach pełnej nieważkości. Badania te pokazały, że u astronautów włókna typu I nie są bardziej wrażliwe na wystąpienie atrofii od włókien typu II (Fitts *et al.* 2000), a wręcz przeciwnie, była ona bardziej zaakcentowana we włóknach typu II aniżeli typu I (Edgerton *et al.* 1995).

Obserwacje kliniczne znajdują swoje odzwierciedlenie w doświadczeniach przeprowadzanych na zwierzętach. Zastosowanie opatrunku gipsowego prowadzi do większego ubytku masy ciała w porównaniu do wyników uzyskanych przez zastosowanie unieruchomienia zewnętrznego (śruby - external fixation) (Reznick *et al.* 1995). Odmienny efekt obserwuje się

w odniesieniu do masy mięśnia, której spadek był większy w unieruchomieniu zewnętrznym niż w przypadku opatrunku gipsowego. Obniżenie masy mięśnia wystąpiło również po długotrwałym 70 dniowym podwieszeniu (Kourtidou-Papadeli *et al.* 2004) i było ono dwukrotnie większe dla mięśnia płaszczkowatego (soleus) przy braku istotnych zmian mięśnia prostownika długiego palców (extensor digitorum longus, EDL). Spadek masy ciała jest również obserwowany po 4 tygodniowym podwieszeniu kończyny, w podobnym stopniu u zwierząt starych i młodych (Deschenes *et al.* 2001). Występująca atrofia w mięśniu płaszczkowatym (soleus) była bardziej zaznaczona u osobników starych (48%) i dotyczyła w podobnym zakresie wszystkich rodzajów włókien tzn. I; IIA; IIX/B, natomiast u młodych wynosiła (29%) i dotyczyła tylko włókien typu I. Podobnie w prostowniku długim palców (extensor digitorum longus) objawy atrofii były wyraźnie większe u szczurów starych (25%) i dotyczyły głównie włókien IIX/B. Jednocześnie w mięśniu płaszczkowatym zmniejszył się udział procentowy włókien I typu na rzecz włókien typu IIA oraz zarysowała się przewaga włókien typu IIX/B tylko u zwierząt starych. W mięśniu EDL nie było istotnych zmian w rozkładzie włókien mięśniowych ani u młodych ani u starych zwierząt w stosunku do kontroli. W innych badaniach w których na 7 dni podwieszono kończyny, lub je odnerwiono po 7 dniach doszło do atrofii w mięśniu płaszczkowatym odpowiednio o 35% i 29% (Hornberger *et al.* 2001). Pośród postulowanych przyczyn atrofii, zwraca się uwagę na spadek syntezy białek mięśniowych z towarzyszącą ich degradacją (Loughna *et al.* 1986). Efekt taki obserwuje się w mięśniu płaszczkowatym u myszy, u których po 1 i 2 tygodniu po podwieszeniu wykazano spadek mokrej masy mięśnia odpowiednio o 30% i 53% oraz całkowitego poziomu białka o 40% i 60% (Mitchell and Pavlath 2001). Jednocześnie przekrój poprzeczny włókna mięśniowego typu I zmniejszył się o 51%. Warto podkreślić fakt, że nie obserwowano zmian procentowego rozkładu włókien mięśniowych.

4. ZMIANY METABOLICZNE ZACHODZĄCE W MIĘŚNIU SZKIELETOWYM WYWOŁANE UNIERUCHOMIENIEM

4.1. Glikoliza i przemiany tlenowe.

Przyczyny tych wszystkich obserwowanych zmian w funkcjonowaniu mięśnia wydają się tkwić w zaburzeniach ich metabolizmu. W doświadczeniach przeprowadzonych na zwierzętach, wraz ze wzrostem procentowym udziału włókien typu II wzrasta aktywność enzymów glikolitycznych oraz dochodzi do zmian w przemianach oksydacyjnych (Fell *et al.* 1985; Miu *et al.* 1990). W kilka miesięcy po uszkodzeniu rdzenia kręgowego w porażonych mięśniach dochodzi do zwiększenia aktywności całkowitej LDH, z przesunięciem izozymogramu w kierunku LDH-5 oraz do wzrostu aktywności dehydrogenazy glicerolo-3-fosforanowej (G3PDH) (Otis *et al.* 2004). W innych doświadczeniach, po trzech tygodniach podwieszenia kończyny dochodzi do zwiększenia aktywności mięśniowego izoenzymu M-LDH, oraz innych enzymów przemian beztlenowych – hexokinazy oraz kinazy pirogronianowej (Bigard *et al.* 1998). Wyniki te pokrywają się z wcześniejszymi obserwacjami, w których podwieszenie kończyny porównano z unieruchomieniem w łusce gipsowej (Fitts *et al.* 1989). We włóknach wolnych (ST) aktywności enzymów glikolitycznych dehydrogenazy mleczanowej (LDH) i fosfofruktokinazy (PFK) wzrastają wyraźnie odpowiednio po pierwszym i czwartym tygodniu. Wzrost ten jednak nie osiągnął aktywności obserwowanych we włóknach kontrolnych oksydacyjno-glikolitycznych (FOG). Podobne zmiany obserwowane są w kolejnych dwóch pracach opisujących doświadczenia przeprowadzane na szczurach, gdzie po okresie jednego tygodnia odciążenia kończyny u osobników młodych doszło do zwiększenia aktywności dehydrogenazy mleczanowej o 22% (Groskreutz and Thompson 2002), a po okresie 2 tygodni aktywność tego enzymu u zwierząt dorosłych wzrosła o 33,3% (Ojala *et al.* 2001).

Jednak nie we wszystkich doświadczeniach obserwowano wzrost aktywności glikolitycznej mięśni. W okresie jednotygodniowego podwieszenia dochodzi do zmniejszenia aktywności całkowitej LDH w przeliczeniu na cały mięsień płaszczkowaty (soleus), podeszwowy (plantaris) oraz prostownik palców długi (EDL) (Ohira *et al.* 2002). Podobne obserwacje uzyskano po trzech tygodniach podwieszenia u młodych szczurów, u których aktywność LDH maleje w mięśniu płaszczkowatym i w głowie przyśrodkowej mięśnia brzuchatego łydki (medial gastrocnemius) (Simard *et al.* 1985b). Wyjątkiem jest enzym heksokinaza (HEX), którego aktywność się zwiększa. W części doniesień nie obserwuje się jednak żadnych zmian aktywności LDH w mięśniu płaszczkowatym (soleus) i prostowniku długim palców (extensor digitorum longus) (Desplanches *et al.* 1987), ani też różnic w poziomie kwasu mlekowego po okresie 1 tygodnia podwieszenia (Fell *et al.* 1985).

Oczywiście w ocenach tych badań należy zwrócić uwagę, na ważny dodatkowy czynnik modulujący aktywności enzymatyczne jakim jest wiek. Aktywność LDH w pojedynczym włóknie mięśniowym typu IIb u starych szczurów była mniejsza 24% w porównaniu ze zwierzętami młodymi (Groskreutz and Thompson 2002). Natomiast po siedmiodniowym podwieszeniu u tych zwierząt nie zaobserwowano zmian w aktywności LDH w stosunku do kontroli. Również mniejsza aktywność LDH w przeliczeniu na pojedyncze włókno mięśniowe wykazywana jest u osobników starych, jakkolwiek po jednym tygodniu podwieszenia aktywność enzymatyczna wzrosła aż o 50% (Simard *et al.* 1985b). W sumie wydaje się, że zmiany aktywności LDH w unieruchomieniach u zwierząt starych są o podobnej ekspresji jak u osobników młodych (Ojala *et al.* 2001).

Równocześnie ze zmianami dotyczącymi enzymów glikolitycznych, dochodzi do ograniczeń metabolizmu tlenowego. Po tygodniowym podwieszeniu u szczurów dochodzi do zmniejszenia aktywności mitochondrialnego enzymu dehydrogenazy β -hydroksyacyloCoA w mięśniach

płaszczkowatym, podeszwowym i prostowniku długim palców w przeliczeniu na cały mięsień i miligram białka (Ohira *et al.* 2002). Wyniki te potwierdzają wcześniejsze rezultaty tygodniowego podwieszenia u tego samego gatunku, gdzie doszło do obniżenia o 17% i 23% aktywności syntazy cytrynianowej w mięśni płaszczkowatym i brzuchatym łydki (gastrocnemius) (Fell *et al.* 1985). Widoczny spadek w aktywności enzymów metabolizmu tlenowego dehydrogenazy jabłczanowej i dehydrogenazy β -hydroksyacyloCoA obserwuje się też po 3 tygodniowym podwieszeniu zarówno w mięśni płaszczkowatym jak i brzuchatym łydki (Simard *et al.* 1985b). Natomiast przebywanie w warunkach nieważkości przez dwa tygodnie powoduje w mięśni płaszczkowatym (soleus) oraz w mięśni obszernym bocznym (vastus lateralis) małe zmniejszenie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej (SDH) we włóknach drugiego typu (Belozerova *et al.* 2003; Shenkman *et al.* 2003). W jeszcze innych badaniach, po okresie 6 dni przebywania szczurów w warunkach zmniejszonegociążenia stwierdzono zmniejszenie aktywności oksydazy cytochromowej w mięśni trójgłowym ramienia (triceps brachii) o 41%, podczas gdy aktywność dehydrogenazy jabłczanowej nie zmieniła się (Connor and Hood 1998). Nie stwierdzono natomiast istotnych zmian w aktywności enzymu dehydrogenazy β -hydroksyacyloCoA we włóknach IIB po siedmiu dniach odciążenia (Groskreutz and Thompson 2002).

Oczywiście, tak jak w przypadku enzymów glikolitycznych, można znaleźć doniesienia wskazujące na brak hamowania, lub wręcz wzrost aktywności enzymów metabolizmu tlenowego. Po 6 miesiącach po przecięciu rdzenia kręgowego u kotów, aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w mięśni płaszczkowatym i brzuchatym łydki nie ulegają zmianom (Hoffmann *et al.* 1990). W innych badaniach obserwuje się wzrost aktywności dehydrogenazy bursztynianowej i syntazy cytrynianowej w mięśni płaszczkowatym szczura i brak widocznych zmian w metabolizmie tlenowym (Otis *et al.* 2004). Podobne wyniki we włóknach wolnych w mięśni

płaszczkowatym (soleus) uzyskano po czterotygodniowym podwieszeniu u szczurów (Fitts *et al.* 1989). Dwukrotnie wzrosła aktywność enzymu syntazy cytrynianowej i nie zmieniła się aktywność dehydrogenazy β -hydroksyacyloCoA. We włóknach szybkich w mięśni brzuchatym łydki (gastrocnemius) nie zanotowano istotnych zmian w aktywnościach obu enzymów.

Podobnie jak w przypadku enzymów glikolitycznych, wiek może wpływać na aktywność enzymów metabolizmu tlenowego. Po trzech tygodniach podwieszenia w mięśni płaszczkowatym (soleus) dochodzi do zmniejszenia aktywności dehydrogenazy β -hydroksyacyloCoA w większym stopniu u szczurów starych (podobnie w mięśni brzuchatym łydki). Natomiast aktywność dehydrogenazy jabłczanowej ulega większemu zahamowaniu u zwierząt młodych (Simard *et al.* 1985b). Aktywność po okresie tygodniowego podwieszenia (Groskreutz and Thompson 2002) we włóknach IIB mięśnia brzuchatego łydki dehydrogenazy β -hydroksyacyloCoA nie różniła się między starymi, a młodymi szczurami i nie obserwowano różnic w obu grupach, w porównaniu do kontroli.

Badania na ludziach to głównie obserwacje skutków oddziaływania zmniejszonego ciężenia podczas lotów kosmicznych lub symulowanie odciążenia podczas leżenia w łóżku. Po 11 dniach przebywania w warunkach nieważkości aktywność enzymu szlaku glikolitycznego, dehydrogenazy glicerolo- α -fosforanowej (GPDH) wzrosła o 80% we włóknach typu I w mięśni obszernym bocznym (vastus lateralis) (Edgerton *et al.* 1995). Również do wzrostu aktywności tego enzymu dochodzi w okresie 24 tygodni po uszkodzeniu rdzenia kręgowego w wycinkach pobranych z tego samego mięśnia we wszystkich rodzajach włókien mięśniowych (Castro *et al.* 2000). Natomiast warunki nieważkości i leżenia w łóżku nie wydają się mieć znaczącego wpływu na aktywności fosforylasy glikogenowej w mięśni płaszczkowatym (soleus) i brzuchatym łydki (gastrocnemius) (Trappe *et al.* 2001). Podobny brak

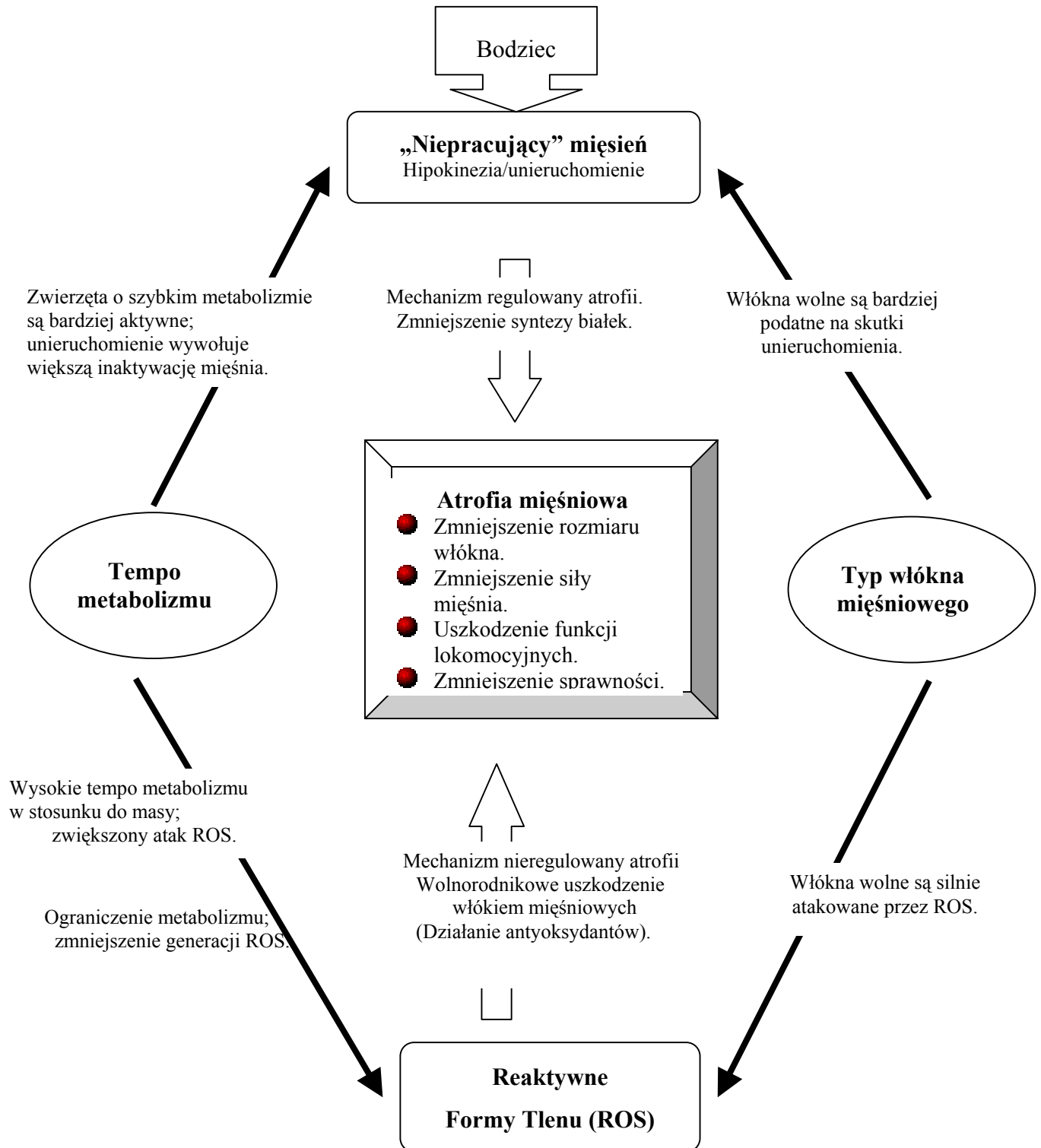
istotnych zmian w aktywności heksokinazy, fosfofruktokinazy i dehydrogenazy mleczanowej obserwuje się w mięśniach ludzi leżących miesiąc i więcej dni w łóżku (Hikida *et al.* 1989; Ferretti *et al.* 1997; Desplanches *et al.* 1998).

W badaniach na ludziach nie zaobserwowano też gwałtownych zmian aktywności enzymów metabolizmu tlenowego. Przebywanie w warunkach nieważkości przez 11 dni nie zmienia aktywności dehydrogenazy bursztynianowej (Edgerton *et al.* 1995). Natomiast po uszkodzeniu rdzenia kręgowego aktywność tego enzymu wzrasta (Castro *et al.* 2000). Po długim okresie leżenia w łóżku, aktywność syntazy cytrynianowej podobnie jak dehydrogenazy β -hydroksyacyloCoA nie ulega zmianie lub maleje (Hikida *et al.* 1989). W innych pracach poświęconych porównaniu przebywania w warunkach nieważkości, a leżeniem w łóżku nie wykazano istotnych zmian w poziomach enzymów syntazy cytrynianowej i dehydrogenazy β -hydroksyacyloCoA w mięśniu naramiennym (deltoideus) (Desplanches *et al.* 1998; Trappe *et al.* 2001).

4.2. Stres oksydacyjny.

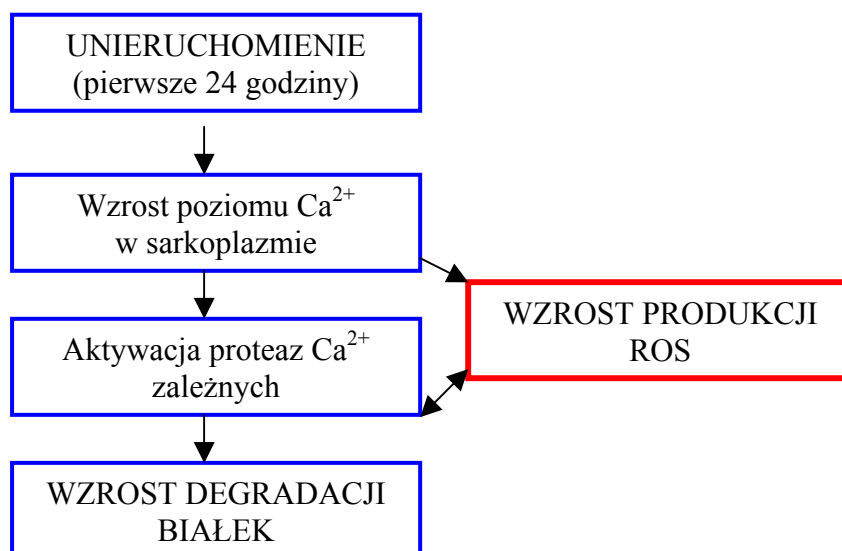
Obserwowane zmiany w metabolizmie, przy zmniejszonej aktywności ruchowej, w niewielkim tylko stopniu tłumaczą objawy atrofii i spadku masy mięśnia, zmniejszenia przekroju włókna mięśniowego oraz transformacji włókien mięśniowych. Przyczyny tego zjawiska mogą być w głównej mierze związane ze zmianami w metabolizmie białek, w ich zmniejszonej syntezie i zwiększonym katabolizmie (Loughna *et al.* 1986; Goldberg 1969; Homberger *et al.* 2001; Steffen and Musacchia 1984). Wydaje się też, że źródło tych zmian tkwi w zespole zjawisk określanym mianem stresu oksydacyjnego (Ryc.3.).

Rycina 3. Postulowane mechanizmy atrofii mięśni w unieruchomieniach
(wg Hudson and Franklin 2002).



Dwa kluczowe zjawiska dla stresu oksydacyjnego zdają się być najważniejsze, zwiększenie stężenia jonów wapniowych (Ca^{2+}) w sarkoplazmie (Zarzhevsky *et al.* 2001) oraz produkcja nadmiernych ilości aktywnych form tlenu (Lawler *et al.* 1997; Valko *et al.* 2006). Unieruchomienie bardzo szybko doprowadza do zwiększonego napływu jonów Ca^{2+} do komórki. Powodują one aktywację zależnych od Ca proteaz, połączoną ze wzrostem stresu oksydacyjnego (Kondo *et al.* 1993b). Efektem działania tych enzymów jest degradacja białek, co bezpośrednio lub pośrednio prowadzi do aktywacji procesu generującego ROS (Ryc.4).

Rycina 4. Wpływ unieruchomienia na wczesne etapy zaburzeń metabolizmu w mięśniach (wg Zarzhevsky *et al.* 2001).



Jednym ze wskaźników nadprodukcji reaktywnych form tlenu, spowodowanej unieruchomieniem są m.in. zmiany w aktywnościach enzymów antyoksydacyjnych. Badania przeprowadzone na szczurach (Lawler *et al.* 2003) wykazały, że po 28 dniowym okresie podwieszenia wzrasta aktywność dysmutazy nadtlenkowej (SOD) w mięśniu płaszczkowatym (soleus). Jest to związane jedynie ze wzrostem izoenzymu cytoplazmatycznego (CuZnSOD) o ponad 70%. Jednocześnie dochodzi również do obniżenia aktywności katalazy o ponad 54% i peroksydazy glutationu. Z kolei w doświadczeniach Kondo (Kondo *et al.* 1993b) w mięśniu płaszczkowatym po 12 dniach na modelu szczura po unieruchomieniu obserwuje się wzrost aktywności izoenzymu

CuZnSOD i spadek aktywności izoenzymu mitochondrialnego MnSOD pod koniec tych badań. Jednocześnie wzrosła aktywność reduktazy glutationu, glutationowej S-transferazy oraz katalazy, podczas gdy aktywność peroksydazy glutationu nie uległa zmianie. Ci sami autorzy (Kondo *et al.* 1992) wykazali, że siedmiodniowe unieruchomienie kończyny szczura prowadzi do wzrostu aktywności oksydazy ksantynowej, przy braku istotnych zmian wskaźników stresu oksydacyjnego takich jak poziom TBARS (thiobarbituric acid-reactive substance – substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym), czy też stężenie utlenionego glutationu. W innych badaniach (Sen *et al.* 1992) przeprowadzonych na psach gończych, w wyniku 11 tygodniowego unieruchomienia kończyny opatrunkiem gipsowym stwierdzono spadek poziomu całkowitego glutationu i brak zmian w aktywności enzymów go metabolizujących, jak peroksydaza glutationu, reduktaza glutationu, czy też transferaza glutationu.

W obserwacjach tych należy jednak uwzględnić wpływ wieku. W badaniach przeprowadzonych na starych szczurach, po 4 tygodniowym okresie unieruchomienia wykazano znaczący wzrost wskaźników uszkodzenia w mięśniach brzuchatym łydki (gastrocnemius), podeszwowym (plantaris), płaszczkowatym (soleus) i prostym uda (rectus femoris) ocenianych poprzez oznaczenie stężenia grup karbonylowych i MDA (Carmeli E *et al.* 2001).

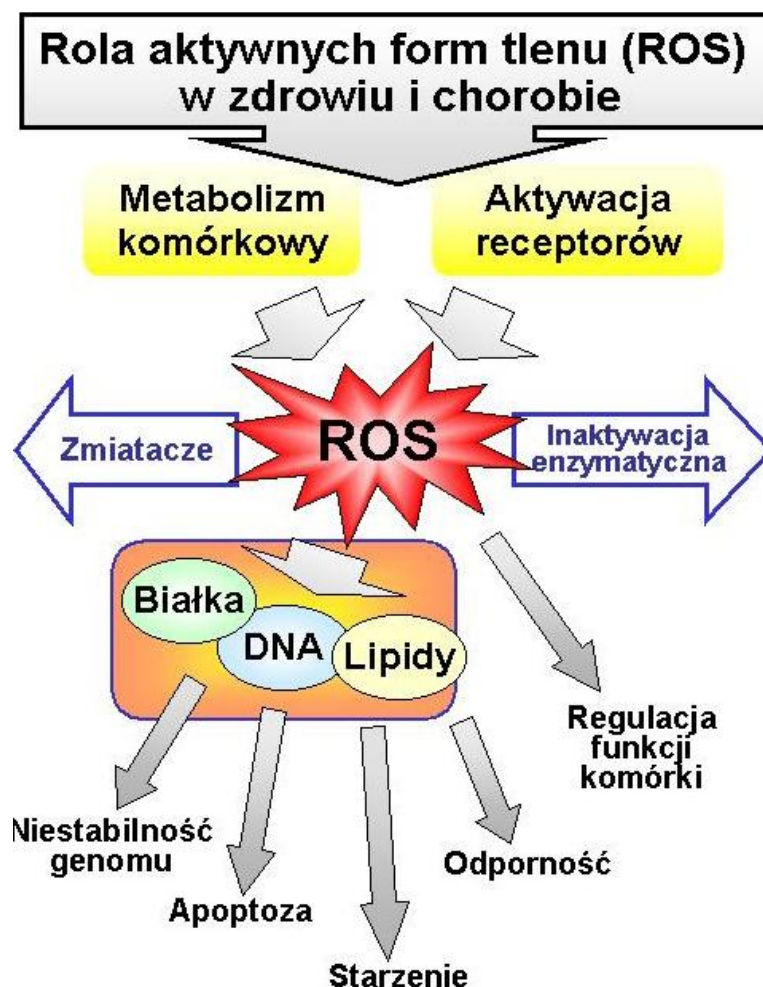
Badań dotyczących generowania reaktywnych form tlenu podczas unieruchomienia, przeprowadzanych z udziałem ludzi jest niewiele i głównie były wykonywane u osób biorących udział w lotach kosmicznych, czy też podczas eksperymentów typu bed rest - leżenia w łóżku. Głównym źródłem wiedzy o „metabolizmie” reaktywnych form tlenu w mięśniu szkieletowym u człowieka w czasie unieruchomienia są badania krwi. Leżenie w łóżku m.in. oddziałuje na funkcję leukocytów i wytwarzanie reaktywnych form tlenu podczas fagocytozy (Pawlak *et al.* 1998b; Pawlak *et al.* 1998a).

5. REAKTYWNE FORMY TLENU

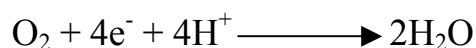
5.1. Metabolizm reaktywnych form tlenu.

Odkrycia wolnych rodników w materiale biologicznym dokonano na początku lat pięćdziesiątych ubiegłego stulecia (Droge 2002). W niedługim czasie po ukazaniu się tych doniesień Harman (Harman 1956) opisuje, że mogą one być produktami niektórych reakcji enzymatycznych przebiegających w żywym organizmie. Wskazuje on również na znaczącą ich rolę w uszkodzaniu komórek, wywoływaniu chorób organicznych, czy też w procesach starzenia się organizmu. Tak „szkodliwe” działanie ROS, wydaje się jednak tylko ubocznym efektem procesów, które organizm wykorzystuje głównie do obrony środowiska wewnętrznego przed wszelkimi patogenami (Ryc.5).

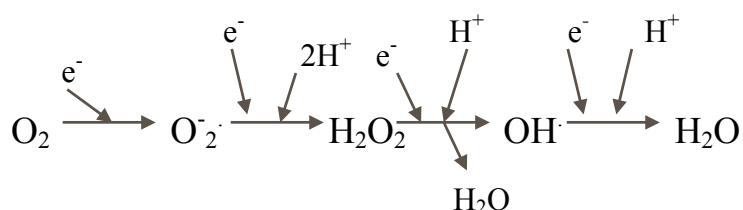
Rycina 5. Rola aktywnych form tlenu w organizmie.



Wolnymi rodnikami nazywamy atomy (cząsteczki) zdolne do samodzielnego istnienia, mające jeden lub więcej niesparowanych elektronów. Konsekwencją takiego stanu jest ich duża reaktywność, tzn. częste wchodzenie w reakcje z innymi cząsteczkami w celu oddania lub przyłączenia elektronu (Bartosz 1995). Głównym ich źródłem w warunkach istniejących w organizmach żywych jest tlen. W stanie spoczynku jest on birodnikiem, tzn. posiada dwa niesparowane elektrony i aby doszło do całkowitej redukcji tlenu potrzeba czterech elektronów i czterech protonów co prowadzi do postania dwóch cząsteczek wody.



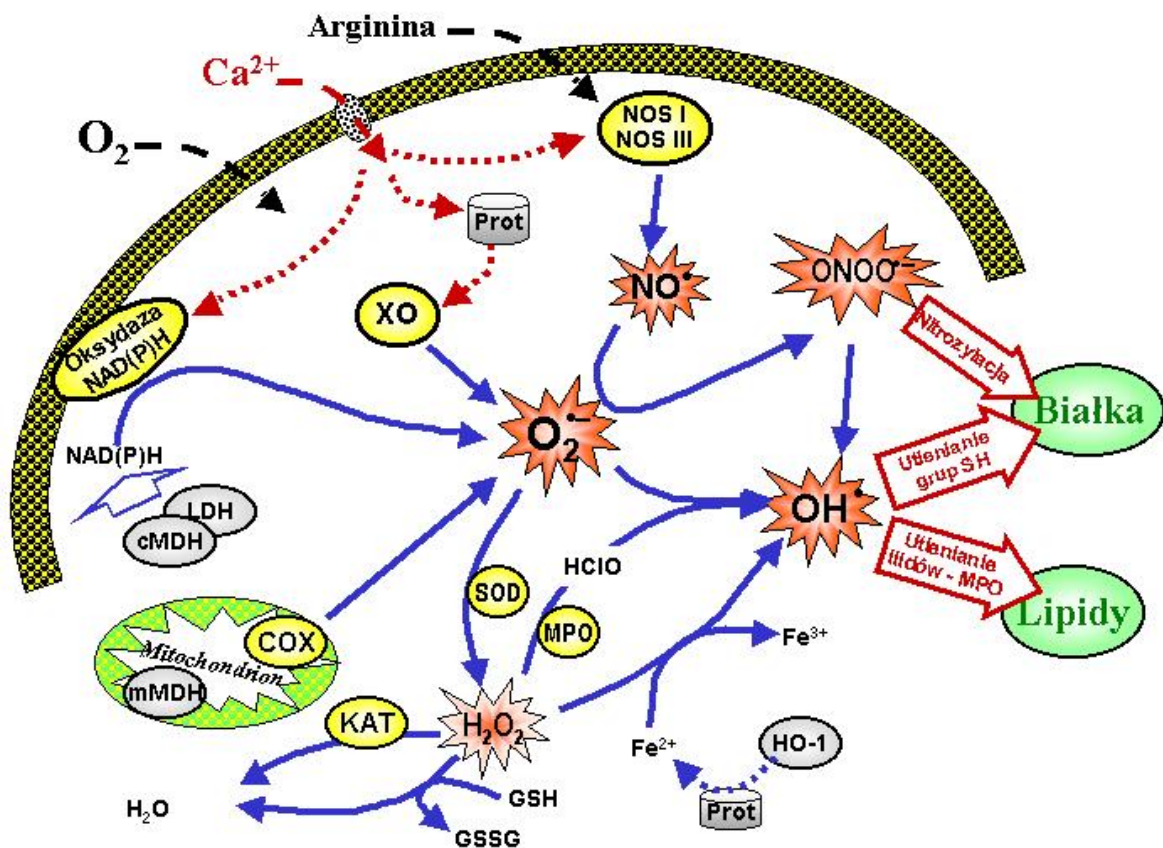
Ze względu na to, iż bardzo trudno cząsteczce tlenu znaleźć inną o podobnej konfiguracji, może ona reagować z różnymi związkami jednoelektronowo:



Podczas tego procesu powstają metabolity, które wraz ze związkami o podobnych właściwościach określono mianem reaktywnych form tlenu (ROS reactive oxygen species). Ich reaktywność jest znacznie większa od tlenu cząsteczkowego i związki te mogą reagować z większością składowych naszego organizmu, często prowadząc do zaburzeń funkcji komórek, tkanek i narządów.

Rycina 6. „Metabolizm” ROS w komórce.

LDH	Dehydrogenaza mleczanowa	NO·	Tlenek azotu
MDH	Dehydrogenaza jabłczanowa	NOS I	Syntaza tlenku azotu I
cMDH	Cytoplazmatyczna MDH	NOS III	Syntaza tlenku azotu III
mMDH	Mitochondrialna MDH	OH·	Rodnik hydroksylowy
COX	Oksydaza cytochromowa	MPO	Mieloperoksydaza
KAT	Katalaza	HClO	Kwas podchlorawy
SOD	Dysmutaza ponadtlenkowa	Prot	Proteosom
HO-1	Oksygenaza hemowa	XO	Oksydaza ksantynowa
O_2^-	Anion ponadtlenkowy		



Wydaje się, że głównym źródłem anionu ponadtlenkowego [O_2^-] w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, przede wszystkim w ścianie naczyń krwionośnych jest enzym **oksydaza NAD(P)H** (Ryc.6). Enzym ten wydaje się być również źródłem [O_2^-] w mięśniu szkieletowym choć nie jest to do końca wyjaśnione (Powers *et al.* 2005; Javesghani *et al.* 2002). Ten enzymatyczny kompleks przenosi przez błonę komórkową elektrony z wewnątrzkomórkowego

NAD(P)H na tlen znajdujący się na zewnątrz komórki (DeCoursey 2003). Podczas jednoelektronowej redukcji tlenu, dochodzi do powstania anionu nadadtlenkowego. Znaczącym źródłem NAD(P)H mogą być takie enzymy jak: dehydrogenaza jabłczanowa (MDH), czy też dehydrogenaza mleczanowa (LDH).

Kolejnym bardzo ważnym źródłem anionu nadadtlenkowego jest **oksydaza ksantynowa**, szczególnie w warunkach zwiększonego katabolizmu puryn np. w niedokrwieniu lub niedotlenieniu tkanek (Yokoyama *et al.* 1990). Enzym ten katalizuje reakcję utleniania ksantyny do kwasu moczowego i jest zależna od stężenia tlenu oraz pH roztworu. Może zachodzić albo jednoelektronowo – prowadząc do powstawania anionu nadadtlenkowego, albo dwuelektronowo w wyniku której powstaje nadtlenek wodoru (Bartosz 1995). Anion nadadtlenkowy [O_2^-] może również powstawać na łańcuchu oddechowym, gdzie 1-2% tlenu ulega jednoelektronowej redukcji z powodu „przecieku” pewnej części elektronów (Boveris and Chance 1973; Chance and Williams 1956; Cadenas and Davies 2000). Miejscem w którym dochodzi do jednoelektronowej redukcji jest flawoproteina - dehydrogenaza NADH oraz ubichinon (Nohl 1994). Ostatnim ogniwem łańcucha oddechowego jest kompleks IV – oksydaza cytochromowa (COX). Spełnia ona rolę decydującego regulatora oddychania mitochondrialnego. Katalizuje ona całkowitą redukcję tlenu (przez przyjęcie przez niego czterech elektronów) do wody. Zahamowanie jej aktywności np. przez wzrost stężenia tlenku azotu (Heck *et al.* 2005) może doprowadzić do upośledzenia funkcji łańcucha oddechowego, a w konsekwencji przyczynić się do zwiększonej produkcji anionorodnika nadadtlenkowego.

Dodatkowym, bardzo ważnym w stanach patologii źródłem ROS są syntazy tlenku azotu oraz dwuwartościowe żelazo. Produktem **syntazy tlenku azotu** jest tlenek azotu (NO^\cdot), który jest też reaktywnym rodnikiem, a który może reagować z anionem nadadtlenkowym tworząc jeszcze bardziej reaktywne formy (Bartosz 1995; Gryglewski *et al.* 1986). Reakcja ta prowadzi do

powstania mającego bardzo silne właściwości utleniające nadtlenuazotynu i pośrednio do powstania rodnika wodorotlenowego (OH \cdot). Jego działanie wydaje się być też znaczące w mechanizmie nitrozylacji białek. W sumie nadtlenuazotyn jest niezwykle reaktywnym związkiem, który m.in. hamuje aktywność oksydazy cytochromowej i innych składników łańcucha oddechowego (Sharpe and Cooper 1998), jest też silnym inhibitorem akonitazy (Castro *et al.* 1998), jednego z enzymów cyklu Krebsa.

Obecność jonów żelaza dwuwartościowego (Fe $^{2+}$) warunkuje natomiast tworzenie w reakcji Fentona i w reakcji Habera–Weissa bardzo reaktywnej formy tlenu jaką jest rodnik hydroksylowy. W warunkach fizjologicznych żelazo jest połączone z białkiem – ferrytyną i jest nieaktywne. Może też być wbudowane w strukturę niektórych białek enzymatycznych, głównie tych posiadających pierścień hemowy. Kiedy dochodzi do wzrostu stężenia lub oddysocjowania żelaza mamy do czynienia z uwolnieniem tzw. formy reaktywnej żelaza i tworzeniem wolnych rodników tlenowych (Powers *et al.* 2005).

Podstawową drogą przemiany anionu nadadtlenkowego jest związana z obecnością cytoplazmatycznej (**CuZnSOD**) oraz mitochondrialnej dysmutazy nadadtlenkowej (**MnSOD**). W wyniku działania tego enzymu powstaje nadtlenek wodoru H $_2$ O $_2$, który może być metabolizowany w kilku kierunkach. Może reagować z anionem nadadtlenkowym w obecności jonów żelaza (reakcja Fentona) lub innych metali przejściowych tworząc rodnik hydroksylowy (Liochev and Fridovich 1994). Może też być źródłem halidów – reaktywnych form tlenu powstających w reakcji z chlorem. Większość jednak nadtlenu wodoru jest metabolizowana drogą enzymatyczną w wyniku której powstaje woda, w reakcjach katalizowanych przez dwa enzymy - katalazę oraz peroksydazę glutationu.

5.2. Rola ROS w zdrowiu i chorobie.

„Dobroczyne” działanie ROS ujawnia się w szeregu procesów (Tab.1). Anion nadadtlenkowy wpływa poprzez powstający z niego rodnik hydroksylowy na aktywność cyklazy guanylanowej oraz powstawanie cGMP (Mittal and Murad 1977). Również anion nadadtlenkowy [O_2^-] czy też niskie (mikromolowe) stężenia H_2O_2 zwiększają produkcję czynników aktywnych komórek T – interleukin, szczególnie IL-2 (Roth and Droge 1987). Nadtlenek wodoru indukuje ekspresję hemowej oxygenazy (HO – 1), modulując w ten sposób syntezę erytropoetyny (Keyse and Tyrrell 1989). Niezwykle reaktywną formą tlenu jest też tlenek azotu [$NO\cdot$]. Jest on jednym z najsilniejszych czynników wazorelaksacyjnych o działaniu auto- i parakrynnym. NO bierze udział w regulacji napięcia mięśni gładkich naczyń krwionośnych oraz hamuje zlepianie się płytek krwi (Ignarro and Kadowitz 1985; Radomski *et al.* 1987). Aktywne formy tlenu są wykorzystywane również w obronie immunologicznej organizmu przez komórki fagocytujące (granulocyty, monocyty, makrofagi). Komórki te reagują na obecność mikroustrojów i innych patogenów w celu ich likwidacji, w procesie określanym jako wybuch tlenowy. Sam mechanizm bakteriobójczy tego zjawiska nie jest jeszcze do końca wyjaśniony. Polega on na wytworzeniu i uwolnieniu na zewnątrz komórki dużej ilości anionu nadadtlenkowego oraz nadttlenku wodoru (Finkel 2003). Makrofagi mogą produkować również ogromne ilości tlenku azotu (Miller and Britigan 1997; Miller and Britigan 1997; Hickman-Davis *et al.* 2001), który po połączeniu z anionem nadadtlenkowym przechodzi w jeszcze aktywniejszy nadttlenoazotyn (Gryglewski *et al.* 1986). Kolejnym związkiem wykorzystywanym do obrony przeciwbakteryjnej jest kwas podchlorawy, powstający w reakcji katalizowanej przez **mieloperoksydazę** (Klebanoff 2005). Może on działać na błonę komórkową bakterii i reagować z ich enzymami m.in. powiązаныmi z syntezą ATP (Bartosz 2004).

Tabela 1. Fizjologiczne funkcje ROS w organizmie (Droge 2002).

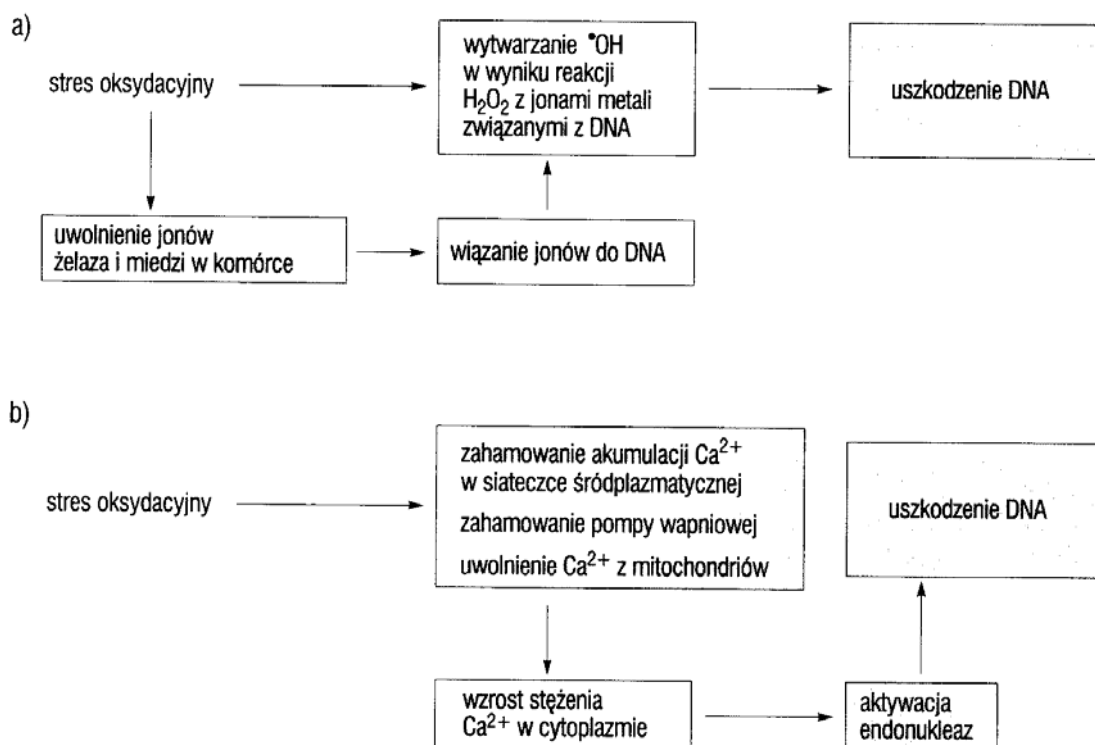
ROS	Rola w procesach fizjologicznych
Tlenek azotu [NO [·]].	Relaksacja mięśni gładkich naczyń oraz inne funkcje zależne od cGMP.
Anionorodnik ponadtlenkowy [O ₂ ⁻].	Kontrola produkcji erytropoetyny. Relaksacja mięśni gładkich naczyń. Funkcje immunologiczne. Odpowiedź na stres oksydacyjny. Utrzymywanie równowagi między procesami oksydacji i redukcji.

Ubočnym, niekorzystnym efektem działania reaktywnych form tlenu są uszkodzenia wielu struktur komórkowych. W błonach białkowo – lipidowych w wyniku utleniania ich nienasyconych kwasów tłuszczowych powstają nadtlarki tych związków, a łatwość ulegania peroksydacji zależna jest od ilości podwójnych wiązań w cząsteczce kwasu tłuszczowego (Bartosz 1995). Do produktów rozpadu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych zaliczamy aldehydy i hydroksyaldehydy takie jak: 4 – hydroksyalkenale, 2 – alkenale oraz dialdehyd malonowy (MDA), który bardzo często służy jako wskaźnik określający stopień peroksydacji lipidów. Konsekwencją tego procesu jest modyfikacja właściwości fizycznych błon komórkowych, obniżona zostaje hydrofobowość lipidowego wnętrza błon i ulega zmianie organizacja dwuwarstwy struktury lipidowej. W wyniku tych zmian dochodzi do zwiększenia przepuszczalności błon dla jonów H⁺, co prowadzi do zahamowania aktywności enzymów błonowych i białek transportujących np. (Ca²⁺ - Mg²⁺)ATPazy (Filipek *et al.* 1993). W rezultacie może dojść do utraty integralności zarówno błon wewnątrz komórkowych jak i błony plazmatycznej (Halliwell and Gutteridge 1990).

Nadprodukcja ROS prowadzi również do uszkodzenia białek poprzez modyfikację reszt aminokwasowych, modyfikację grup prostetycznych, agregację lub fragmentację cząsteczek białkowych (Bartosz 1995). Czynnikiem uszkadzającym jest przede wszystkim rodnik wodorotlenowy, ale w przypadku niektórych modyfikacji np. utleniania grup SH, może też być nim anion ponadtlenkowy oraz nadtlenek wodoru. Jedną z przypuszczalnych przyczyn jest utlenianie grup tiolowych glutationu, a w konsekwencji zmniejszenie stężenia zredukowanego glutationu (GSH), co ogranicza możliwości naprawiania przez glutation utlenianych grup SH. Białkami szczególnie wrażliwymi na działanie ROS są proteoglikany i metaloproteiny. W proteoglikanach uszkodzeniu ulegają glikozydowe grupy prostetyczne. Często warunkują one biologiczną funkcję tych białek. Uszkodzenie metaloprotein pociąga za sobą uwalnianie jonów metali takich jak Fe^{2+} , Cu^{2+} i innych, ze wszystkimi tego konsekwencjami metabolicznymi.

Ze wzrostem poziomu reaktywnych form tlenu rośnie prawdopodobieństwo uszkodzenia kwasów nukleinowych (Ryc.7) Może być ono związane z tworzeniem się rodnika hydroksylowego w wyniku reakcji Fentona, gdyż z DNA powiązane są jony metali mogące redukować nadtlenek wodoru do rodnika hydroksylowego. Inną hipotezą tłumaczącą mechanizm uszkodzenia kwasów nukleinowych jest wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia (Ca^{2+}), mogącego aktywować nukleazy trawiące DNA (Sastry and Rao 2000; Cassarino and Bennett, Jr. 1999). Prowadzi to do uszkodzenia zasad nukleinowych, reszt cukrowych, rozerwania wiązań fosfodiesterowych łączących nukleotydy (pęknięcia nici). Uszkodzony DNA indukuje powstawanie przeciwko sobie przeciwciał co ma miejsce w przypadku niektórych chorób jak np. w toczeniu rumieniowatym.

Rycina 7. Konceptje tłumaczące uszkodzenie DNA w komórkach w następstwie stresu oksydacyjnego (Bartosz 2004)



Należy też pamiętać, że wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} jest jednocześnie ważnym czynnikiem indukującym wzmożoną generację ROS (Ryc.6.). Efekt ten wydaje się być związany z aktywacją proteozomu co prowadzi do aktywacji m.in. oksydazy ksantynowej, a poprzez degradację oksygenazy hemowej (OH-1) dochodzi do uwolnienia jonów żelaza dwuwartościowego. Należy również pamiętać że jony Ca^{2+} bezpośrednio aktywują dwie formy syntaz tlenku azotu NOS I (bNOS) i NOS III (eNOS).

W warunkach fizjologii i częściowo patologii równowagą dla syntezy ROS jest ich aktywne usuwanie, głównie drogą enzymatyczną. Składają się na nie tzw. enzymy antyoksydacyjne takie jak: cytozolowa i mitochondrialna dysmutaza ponadtlenkowa oraz katalaza i peroksydaza glutationu (Ryc.6). Inną formą obrony przed skutkami destrukcyjnego działania ROS jest naprawianie rozerwanej nici DNA przez ligazy. Glikozylazy zaś dokonują tzw. naprawy ekscyzyjnej, przez wycięcie i odszczepienie uszkodzonych zasad. Trochę

inaczej przedstawia się „opracowywanie” uszkodzonych białek, w przypadku których jednoznacznie rozumianego systemu naprawczego nie ma. „Naprawianie” będzie polegało m.in. na redukcji utlenionych grup SH. Główną rolę w tym procesie ogrywa glutation oraz tioredoksyna. Jeszcze inną formą zmniejszania skutków działania ROS jest indukcja proteozomu i aktywacja proteolizy, która rozkłada uszkodzone białka do poszczególnych aminokwasów.

CEL PRACY

Podstawowym celem pracy było zbadanie czy ograniczenie ruchomości w stawie biodrowym zmienia metabolizm tlenowy mięśnia szkieletowego - gluteus medius?

Szczegółowe cele badania miały odpowiedzieć na pytania:

1. Czy w wyniku ograniczonej ruchomości stawu biodrowego dochodzi do produkcji reaktywnych form tlenu?
2. Czy generacja reaktywnych form tlenu powoduje uszkodzenie struktur wewnątrz komórkowych?
3. Czy istnieje zależność pomiędzy stopniem unieruchomienia, a aktywnością metabolizmu aktywnych form tlenu.

MATERIAŁ

Badania przeprowadzono za pisemną zgodą Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku.

Charakterystyka pacjentów.

Badaniem objęto 67 osób (37 kobiet, 30 mężczyzn) o średniej wieku $66,7 \pm 1,2$ lat (36- 92) leczonych w Klinice Ortopedii AMG w latach 2001-2003. Średni wiek kobiet wynosił $68,6 \pm 1,6$ lat, mężczyzn $64,1 \pm 1,8$.

Pacjentów podzielono na 4 grupy wg skali D'Aubigne i Postela (D'Aubigne and Postel 1954):

- **Grupa kontrolna** - 13 pacjentów (8 kobiet; 3 mężczyzn). Do grupy tej zakwalifikowano osoby po złamaniach szyjki głowy kości udowej oraz osoby z piątym stopniem unieruchomienia. Średni wiek w grupie wynosił $69,3 \pm 3,3$ lat. **Piąty stopień** wg powyższej skali zakłada, że ból jest niewielki bądź okresowy, chory o normalnej aktywności, zgięcie w stawie biodrowym w granicach 80-90 stopni. Odwiedzenie nie mniejsze niż 15 stopni. Zachowana jest możliwość chodzenia bez kul, jednakże z niewielkim utykaniem.
- **Czwarty (4) stopień unieruchomienia (mierny)** - 26 pacjentów (11 kobiet; 15 mężczyzn). Grupę tę stanowią pacjenci z niewielkim bólem podczas chodzenia, ustępującym po spoczynku. Ruch zgięcia w stawie biodrowym wynosi 60-80 stopni, chory zaś może dosięgnąć ręką swojej stopy. Podczas długotrwałego chodzenia musi używać laski, jednak na krótkich dystansach może utykając chodzić bez laski. Średni wiek w grupie wynosił $61,4 \pm 2,0$ lat.
- **Trzeci (3) stopień unieruchomienia (średni)** - 17 pacjentów (10 kobiet; 7 mężczyzn). Do grupy tej zaliczono pacjentów, u których ból jest tolerowany przy ograniczeniu aktywności fizycznej. Zgięcie

w stawie biodrowym zawierało się w granicach 40-60 stopni. Mogli oni chodzić przy pomocy jednej kuli przez okres krótszy niż jedną godzinę, zaś chodzenie bez użycia kul jest bardzo utrudnione. Średni wiek w grupie wynosił $70,5 \pm 1,4$ lat.

- **Drugi (2) stopień unieruchomienia (całkowity)** 13 pacjentów (8 kobiet; 5 mężczyzn). Kwalifikacją do drugiego stopienia był ból o charakterze ciągłym, nie pozwalający na aktywność. Zgięcie w stawie biodrowym jest mniejsze od 40 stopni, chodzenie jest możliwe tylko przy pomocy kul. Średni wiek w grupie $69,1 \pm 2,8$ lat.

Wszyscy badani byli poddani zabiegowi operacyjnemu alloplastyki stawu biodrowego do którego byli klasyfikowani na podstawie badania klinicznego, badań laboratoryjnych oraz obrazu radiologicznego stawu.

METODY

1. Przygotowanie ekstraktu z mięśnia.

Od osób poddanych badaniu pobierano wycinki mięśnia pośladkowego średniego (gluteus medius) o masie 15-50 mg. Pobraną tkankę umieszczano w lodzie i zamrażano w temperaturze -30°C , następnie przenoszono do temperatury -70°C i przechowywano do czasu wykonywania oznaczeń.

Przed przystąpieniem do badań, tkankę wolno rozmrażano w temperaturze pokojowej, oczyszczono z tłuszczu, błon i ścięgien, ważono i homogenizowano z 24 objętościami środowiska o składzie: 50 mM bufor potasowo-fosforanowy pH 7,4, 0.1 mM BHT, 5 mM Na_3EDTA , 154 mM KCL, 0,05% BSA. Homogenizację przeprowadzono w temperaturze 4°C przy pomocy homogenizatora mechanicznego firmy Biospec Products. INC.

Otrzymany homogenat wirowano przy 600 x g przez 10 minut w temperaturze 4°C . Supernatant z nad osadu przechowywano w temperaturze -70°C .

Materiał ten był wykorzystywany do oznaczeń aktywności enzymatycznych:

- dehydrogenazy mleczanowej (LDH), dehydrogenazy jabłczanowej (MDH), katalazy (CAT), dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) oraz oksydazy cytochromowej (COX);
- produktów peroksydacji lipidów i białek: stężenia grup sulfhydrylowych (grup SH) oraz stężenia dialdehydu malonowego (MDA);
- zawartości białka całkowitego.

Uzyskane wyniki przeliczano na gram mokrej masy tkanki.

2. Oznaczenie ilości białka.

Białko oznaczano, metodą Lowrego, a ilość białka odczytywano z krzywej wzorcowej z użyciem roztworów standardowych albuminy wołowej (BSA) (Lowry *et al.* 1951).

Stężenie białka wyrażono w miligramach na gram mokrej masy mięśnia.

Tabela 2. Wpływ stopnia unieruchomienia stawu biodrowego na poziom białka całkowitego w biopsjach mięśnia biodrowego.

Stopień unieruchomienia	BIAŁKO
	mg/g mokrej tkanki
Kontrola (złamania)	37,9 ± 1,3 (n=11)
IV° (mierny)	35,4 ± 1,0 (n=25)
III° (średni)	39,9 ± 2,4 (n=17)
II° (całkowity)	36,4 ± 1,1 (n=14)

Uzyskane wyniki wskazują na brak znaczących różnic w zawartości białka w próbach w przeliczeniu na mokrą masę mięśnia. Na tej podstawie przyjęto, że wszystkie prezentowane w pracy wyniki przeliczono na mokrą masę mięśnia.

3. Oznaczanie aktywności enzymatycznych.

Wszystkie aktywności enzymatyczne oznaczano na spektrofotometrze Cecil Super Aquarius CE 9200 z czteropozycyjnym trzymaczem kuwet, z ciągłą rejestracją zmian absorbancji, w kuwetach o $d = 1\text{ cm}$ i w objętości końcowej $1000\mu\text{l}$. Oznaczeń aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH), dehydrogenazy jabłczanowej (MDH) oraz katalazy dokonywano w temperaturze 25°C , oksydazy cytochromowej (COX) w 37°C , a dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w 30°C .

Stężenia wszystkich odczynników używanych do oznaczania aktywności enzymatycznych podane są jako stężenia końcowe w próbach.

Przyjęto że molowy współczynnik absorbancji dla NADH przy 340 nm wynosi $6.22\text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Schatz 1967), dla cytochromu c przy 550 nm , $29,5\text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (van Gelder and Slater 1962), oraz dla katalazy $0,0394\text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ przy długości fali 240 nm . (Aebi H. 1984).

3.1 Oznaczanie aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) [E.C.1.1.1.27]

Aktywność oznaczano zmodyfikowaną metodą (Leger and Taylor 1982).



Do kuwety dodawano kolejno środowisko zawierające: 50 mM bufor potasowo-fosforanowy pH 7,4, 1 mM EDTA Na_3 , $100\ \mu\text{M}$ NADH oraz $10\text{-}25\ \mu\text{l}$ supernatantu. Pomiar rozpoczynano dodaniem $0,3\text{ mM}$ (LDH $_{0,3}$) lub $2,1\text{ mM}$ pirogronianu sodu (LDH $_{2,1}$). Aktywność LDH wyznaczano z liniowego odcinka spadku absorbancji pomiędzy 15 sekundą a drugą minutą i 15 sekundą przy długości fali 340 nm .

$$\text{Aktywność LDH} = \frac{\Delta A}{6,22 \times \text{m.tk}} \quad \mu\text{mole NADH na minutę na gram mokrej masy mięśnia}$$

gdzie ΔA – średni spadek absorbancji w ciągu jednej minuty.

m.tk – mokra masa mięśnia w gramach w przeliczeniu na objętość dodawanego supernatantu.

Przybliżoną aktywność całkowitej LDH oraz aktywność izoenzymów mięśniowej (M-LDH) oraz sercowej (H-LDH) wyliczano z równań.

$$\mathbf{M-LDH} = \text{LDH}_{2,1} - 0,80 \text{ H-LDH}$$

$$\mathbf{H-LDH} = \text{LDH}_{0,3} - 0,77 \text{ M-LDH}$$

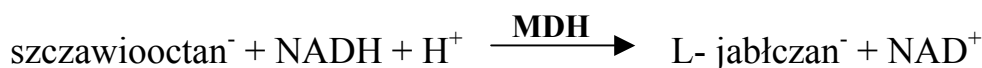
Całkowitą aktywność **LDH** wyliczano jako sumę aktywności jej izoenzymów M i H

$$\mathbf{Całkowita LDH} = \text{M-LDH} + \text{H-LDH}$$

Aktywności LDH wyrażono w mikromolach NADH na minutę na gram mokrej masy mięśnia (U/g m.tk).

3.2 Oznaczanie aktywności dehydrogenazy jabłczanowej (MDH) [EC.1.1.1.37].

Aktywność dehydrogenazy jabłczanowej oznaczano metodą wg (Schantz 1986).



Do kuwety dodawano środowisko zawierające: 50mM bufor Tris-HCL pH 7,6, 5mM Na₃EDTA, 225 μM NADH oraz 10 μl supernatantu.

Pomiar rozpoczynano dodaniem 200 μM szczawiooctanu sodowego.

Aktywność całkowitą tMDH wyznaczano z liniowego odcinka spadku absorbancji pomiędzy 15 sekundą a drugą minutą i 15 sekundą przy długości fali 340 nm.

$$\text{Aktywność tMDH} = \frac{\Delta A}{6,22 \times \text{m.tk}} \quad \mu\text{mole NADH na minutę na gram mokrej masy mięśnia}$$

gdzie ΔA – średni spadek absorbancji w ciągu jednej minuty.

m.tk – mokra masa mięśnia w gramach w przeliczeniu na objętość dodawanego supernatantu.

Aktywność dehydrogenazy jabłczanowej (MDH) wyrażono w mikromolach NADH na min na gram mokrej masy mięśnia (U/g m.tk).

Oznaczenia aktywności **izoenzymu mitochondrialnego** (mMDH) dokonano po inaktywacji izoenzymu cytoplazmatycznego. Do jednej objętości supernatantu dodawano taką samą objętość 96% etanolu i inkubowano w temperaturze pokojowej przez trzy i pół minuty. Pomiar rozpoczynano dodaniem zinaaktywnego supernatantu i oznaczono w sposób opisany dla tMDH.

Aktywność cytozolowej MDH (cMDH) wyliczano z różnicy pomiarów całkowitej aktywności MDH z aktywnością izoenzymu mitochondrialnego.

$$\text{cMDH} = \text{tMDH} - \text{mMDH}.$$

3.3. Oznaczanie aktywności oksydazy cytochromu c (COX) [EC 1.9.31].

Aktywność oksydazy cytochromowej oznaczano metodą wg (Wharton and Tzagoloff 1967).



Do kuwety dodawano kolejno środowisko zawierające: 10 mM bufor potasowo-fosforanowy pH 7,0 oraz 20 μl zredukowanego cytochromu c. Pomiar rozpoczynano dodaniem 10 μl supernatantu rozcieńczonego z 9 objętościami buforu potasowo-fosforanowego.

Przygotowanie roztworu zredukowanego cytochromu c.

81,5 mg cytochromu c, rozpuszczono w 5 ml 10 mM buforu potasowo-fosforanowego, po dodaniu 2,5 mg kwasu askorbinowego inkubowano przez pięć minut w temperaturze pokojowej – do całkowitego zredukowania

cytochromu c. Całość dializowano trzykrotnie zmieniając ten sam bufor przez 24 godziny w temperaturze 4⁰ C. Po dializie roztwór cytochromu c przeniesiono do pojemnika i uzupełniono do objętości końcowej 6,25 ml. Przechowywano w temperaturze -70⁰.

Aktywność oksydazy cytochromowej (COX) wyznaczano z liniowego odcinka spadku absorbancji pomiędzy 15 sekundą a drugą minutą i 15 sekundą przy długości fali 550 nm.

$$\text{Aktywność COX} = \frac{\Delta A}{29,5 \times \text{m.tk}} \quad \begin{array}{l} \mu\text{mole zredukowanego cytochromu c} \\ \text{na minutę na gram mokrej masy mięśnia} \end{array}$$

Gdzie ΔA – średni spadek absorbancji w ciągu jednej minuty.

m.tk – mokra masa mięśnia w gramach w przeliczeniu na objętość dodawanego supernatantu.

Aktywność oksydazy cytochromu c (COX) wyrażono w μmolach zredukowanego cytochromu c na minutę na gram mokrej masy mięśnia (U/g. m. tk.).

3.4. Oznaczanie aktywności katalazy (CAT) [EC 1.11.1.6].

Aktywność tego enzymu oznaczano metodą (Aebi H. 1984) w kuwetach kwarcowych.



Do kuwety dodawano środowisko zawierające: 50mM buforu potasowo-fosforanowego pH 7,4, 1mM EDTA i 0,05% Triton X-100.

Pomiar rozpoczynano dodaniem 25 μl supernatantu i 10 mM H₂O₂.

Aktywność CAT wyznaczano z liniowego odcinka spadku absorbancji pomiędzy 15 sekundą a drugą minutą i 15 sekundą przy długości fali 240nm.

$$\text{Aktywność CAT} = \frac{\Delta A}{0,0394 \times \text{m.tk}} \quad \begin{array}{l} \mu\text{mole H}_2\text{O}_2 \text{ na minutę na gram} \\ \text{mokrej masy mięśnia} \end{array}$$

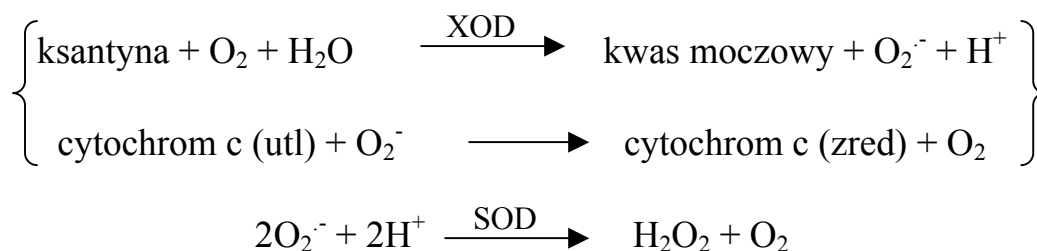
gdzie ΔA – średni spadek absorbancji w ciągu jednej minuty.

m.tk – mokra masa mięśnia w gramach w przeliczeniu na objętość dodawanego supernatantu.

Aktywność katalazy (CAT) wyrażono w mikromolach H_2O_2 na minutę na gram mokrej masy mięśnia.

3.5. Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) [EC 1.15.1.1].

Aktywność tego enzymu oznaczano metodą (Flohe and Otting 1984).



W metodzie tej źródłem anionu ponadtlenkowego jest reakcja oksydazy ksantynowej, a reakcją wskaźnikową redukcja cytochromu c, którego absorbancję można odczytać przy długości fali 550nm. Dodanie dysmutazy, która w swojej reakcji również wykorzystuje anion ponadtlenkowy, ogranicza szybkość redukcji cytochromu c. Wielkość tego zmniejszenia jest proporcjonalne do aktywności dodanej dysmutazy. Warunkiem wykonania oznaczenia jest ustalenie warunków reakcji wskaźnikowej. W pracy jest ona określona na jaką ilość dodanej oksydazy ksantynowej, która pociąga za sobą zmianę absorbancji o $0,026 \pm 0,002$ przy długości fali 550nm.

Oznaczenia wykonywano w kuwetach do których dodawano środowisko zawierające: 950 μl buforu do oznaczania SOD o składzie: 50 μM ksantyna,

20 μ M cytochrom c, 50 mM bufor potasowo-fosforanowy pH 7,8 i 0,1 mM EDTANa₃ oraz 30 μ l supernatantu. Pomiar rozpoczynano dodaniem 20 μ l roztworu oksydazy ksantynowej i prowadzono w temperaturze 30⁰C. Aktywność SOD wyznaczano z liniowego odczytu zmian absorbancji pomiędzy 15 sekundą a drugą minutą i 15 sekundą przy długości fali 550 nm.

Aktywność SOD definiuje się jako ilość enzymu, która powoduje zahamowanie redukcji cytochromu c w ciągu minuty o 50% i była obliczana ze wzoru:

$$\text{Aktywność SOD} = \frac{0,026 - \Delta A}{0,013 \times m.tk} \text{ jednostki na gram mokrej masy mięśnia}$$

Gdzie ΔA – średni spadek absorbancji w ciągu 1 min.

m.tk – mokra masa mięśnia w gramach w przeliczeniu na objętość dodawanego supernatantu.

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) wyrażono w jednostkach na gram mokrej masy mięśnia.

Aktywność mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej MnSOD (mSOD) wyznaczano tak jak w przypadku całkowitej aktywności tSOD dodając do środowiska inhibitor izoenzymu cytozoluowego (CuZnSOD), 2 mM KCN.

Aktywność cytozoluowej dysmutazy CuZnSOD (cSOD) obliczono ze wzoru:

$$\text{Aktywność cSOD} = \text{tSOD} - \text{mSOD}$$

4. Oznaczanie produktów peroksydacji białek i lipidów:

4.1. Oznaczanie stężenia grup sufhydrylowych (grup SH).

Stężenie grup SH oznaczano metodą spektrofotometryczną (Rice-Evans *et al.* 1991). Każde badanie wykonywano podwójnie wraz z indywidualną próbą ślepą. Stężenia zredukowanych grup sulfhydrylowych odczytywano z krzywej kalibracyjnej roztworów standardowych zredukowanego glutationu.

Do próbek dodawano kolejno 150 μ l supernatantu lub wzorca zredukowanego glutationu, 150 μ l 10 mM buforu sodowo-fosforanowego pH 8,0, 300 μ l 10% SDS, dokładnie wymieszano i uzupełniono dodaniem 2400 μ l tego samego buforu. Do prób dodawano 300 μ l buforu (próba ślepa), lub 300 μ l 63 mM DTNB-(próba badana lub wzorzec), a następnie inkubowano przez jedną godzinę w temperaturze 37⁰C w łaźni wodnej z wytrząsaniem. Absorbancję odczytywano w kuwetach o $d = 1$ cm przy długości fali 412 nm. Podstawą wyliczenia zawartości grup SH w próbce jest różnica absorbancji próby badanej po odjęciu odpowiadającej jej wartości otrzymanej dla próby ślepej.

Stężenie grup sulfhydrylowych wyliczano z jednoczesnym wykonaniem krzywej kalibracyjnej i wyrażono w μ molach grup SH na gram mokrej masy mięśnia.

4.2. Oznaczanie stężenia dialdehydu malonowego (MDA).

Stężenie MDA mierzono spektrofotometrycznie wykorzystując komercyjny zestaw odczynników LPO-586 (OxisResearch, Portland, USA).

Do badań używano supernatantu przechowywanego w -70⁰ C. Do próbek dodawano 600 μ l supernatantu (próba badana), wody (próba ślepa), lub standardu S2 (10 mM (1,1,3,3-tetrametoksy-propan w 20 mM buforu tris/HCl pH. 7.4) oraz 1950 μ l odczynnika R1 (10,3 mM N-metylo-2-fenylindol) rozpuszczony w mieszaninie trzech objętości acetonitrilu i jednej objętości metanolu) i mieszano przez około pięć sekund. Po dodaniu 450 μ l

12 M HCl i ponownym wymieszaniu próby inkubowano przez jedną godzinę w łaźni wodnej z wytrząsaniem w temperaturze 45°C. Próbki schładzano w lodzie przez około dwie minuty, wirowano przy 4,500 x g przez 10 minut. Absorbancję supernatantu odczytywano przy długości fali 586 nm w kuwecie o $d = 1$ cm względem próby ślepej.

Stężenie MDA wyznaczano z odczytu absorbancji prób z krzywej wzorcowej i wyrażano w nanomolach MDA na gram mokrej masy mięśnia.

5. Metody statystyczne.

Do oceny wyników wykorzystano parametryczny test t-Studenta, lub testy nieparametryczne Wilcoxona (sparowany) oraz Mann-Whitneya (niesparowany).

WYNIKI

1. Aktywności enzymów generujących NAD(P)H.

Aktywność **dehydrogenazy mleczanowej**, enzymu z przemian glikolitycznych, generującego NAD(P)H jest podobna u osób ze złamaniami i pacjentów z miernym stopniem unieruchomienia. Natomiast w grupie ze średnim i całkowitym stopniem unieruchomienia aktywność tego enzymu ma tendencję malejącą i jest to przypuszczalnie wynikiem spadku aktywności izoenzymu M (Ryc. 8). Obserwowane obniżenie aktywności LDH wydaje się być też związane z płcią pacjentów, jest bowiem wyraźnie zaznaczony u mężczyzn przy niewielkich różnicach w aktywności tego enzymu u kobiet (Ryc. 9).

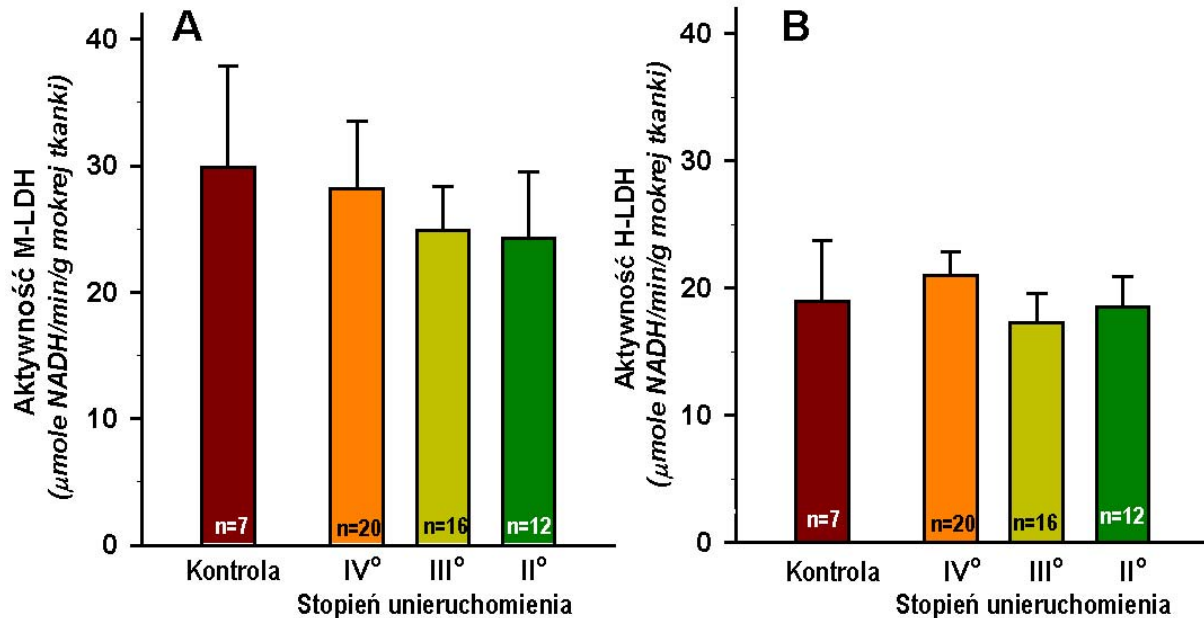
Tabela 3. Wpływ stopnia unieruchomienia stawu biodrowego na całkowite aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) i jabłczanowej (MDH) w bioptatach mięśnia biodrowego.

Stopień unieruchomienia	LDH	MDH
	<i>(μmole NADH/min./g mokrej tkanki)</i>	
Kontrola (złamania)	48,9 \pm 9,2 (n= 7)	97,4 \pm 10,0 (n= 10)
IV^o (mierny)	49,2 \pm 5,6 (n= 20)	110,6 \pm 7,3 # (n= 25)
III^o (średni)	42,2 \pm 3,1 (n=16)	115 \pm 8,6 # (n= 17)
II^o (całkowity)	42,8 \pm 5,8 (n= 12)	88,4 \pm 7,0 (n= 13)

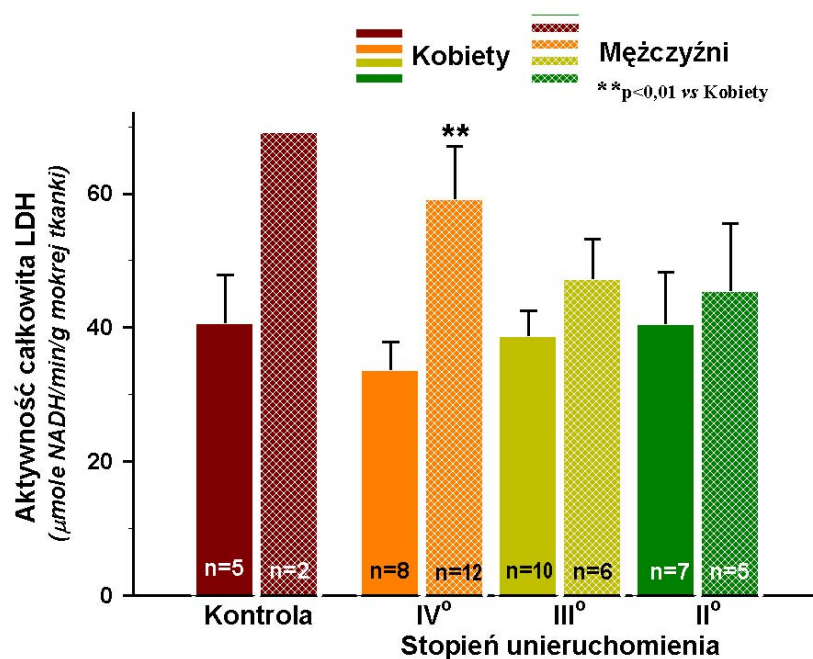
p < 0,05 vs stopień II

Zwraca uwagę fakt, że aktywność LDH w grupie kontrolnej i u osób z czwartym stopniem unieruchomienia jest wyraźnie wyższa u mężczyzn aniżeli u kobiet. Dopiero długotrwałe i postępujące unieruchomienie prowadzi do obniżenia aktywności tego enzymu do poziomu podobnego u obu płci.

Rycina 8. Wpływ stopnia unieruchomienia stawu biodrowego na całkowite aktywności izoenzymu mięśniowego (A) i sercowego (B) dehydrogenazy mleczanowej w biopsatach mięśnia biodrowego.

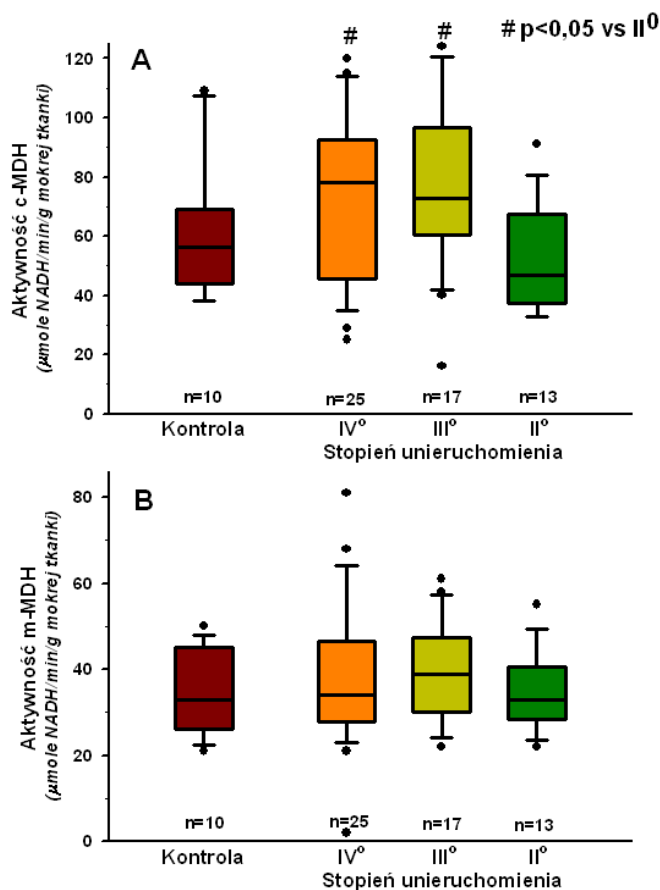


Rycina 9. Wpływ stopnia unieruchomienia stawu biodrowego na całkowite aktywności dehydrogenazy mleczanowej w biopsatach mięśnia biodrowego w zależności od płci badanych pacjentów.

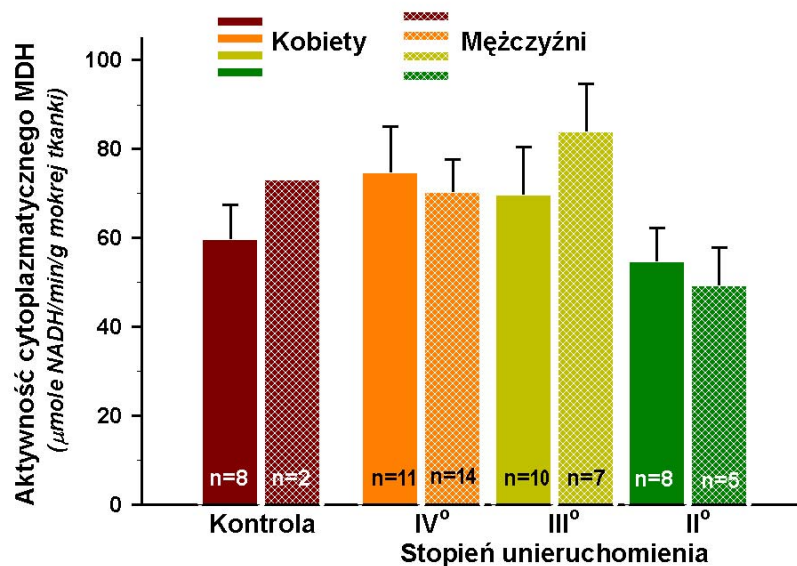


Najwyższą aktywność **dehydrogenazy jabłczanowej** (Tab. 3) obserwuje się u pacjentów z miernym (IV) i średnim (III) stopniem unieruchomienia i nie jest ona znacząco wyższa w porównaniu do wartości kontrolnych. Całkowite unieruchomienie (stopień II) pociąga za sobą wyraźny, bo ponad 20% spadek aktywności w odniesieniu do wartości najwyższych i nieco niższy od wartości obserwowanych w grupie kontrolnej. Obserwowane zjawisko zdaje się wynikać tylko ze zmian (Rycina 10A) w aktywności izoenzymu cytoplazmatycznego, którego aktywność u osób unieruchomionych w stopniu II jest mniejsza aż o ok. 30% w porównaniu z IV i III stopniem ($53,2 \pm 5,3$ vs odpowiednio $72,7 \pm 5,7$ i $76,0 \pm 7,4$ $\mu\text{mole NADH}/\text{min}/\text{g}$ mokrej tkanki; $p < 0,05$). Nie obserwuje się natomiast istotnych różnic w aktywnościach dehydrogenazy jabłczanowej pomiędzy kobietami i mężczyznami (Ryc. 11.)

Rycina 10. Wpływ stopnia unieruchomienia stawu biodrowego na aktywności izoenzymu cytoplazmatycznego (A) i mitochondrialnego (B) dehydrogenazy jabłczanowej w biopłatach mięśnia biodrowego.



Rycina 11. Wpływ stopnia unieruchomienia stawu biodrowego na aktywności izoenzymu cytoplazmatycznego dehydrogenazy jabłczanowej w bioptatach mięśnia biodrowego w zależności od płci badanych pacjentów.



2. Aktywności enzymów metabolizmu wolnych rodników tlenowych.

Aktywność **oksydazy cytochromowej**, głównego mitochondrialnego enzymu, którego aktywność może mieć związek z generowaniem rodnika nadtlenkowego wzrasta wraz ze stopniem unieruchomienia (Tab. 4). U osób ze średnim stopniem unieruchomienia jest o 29% wyższa aniżeli w kontroli. Natomiast u osób o całkowitym unieruchomieniu obserwuje się gwałtowny bo 37% spadek aktywności tego enzymu w porównaniu do wyników obserwowanych u osób z grupy III.

Podobne zmiany obserwuje się w odniesieniu do **katalazy**. Aktywność tego enzymu wzrasta wraz ze wzrostem unieruchomienia, i w grupie osób z III stopniem unieruchomienia osiąga wartość o 41% wyższą od oznaczanych w kontroli (Tab. 4). Pełne unieruchomienie przywraca jednak aktywność katalazy do poziomu obserwowanego w kontroli. Nie wykazano też żadnych istotnych różnic w aktywnościach obu tych enzymów pomiędzy kobietami i mężczyznami (Ryc. 12, 13).

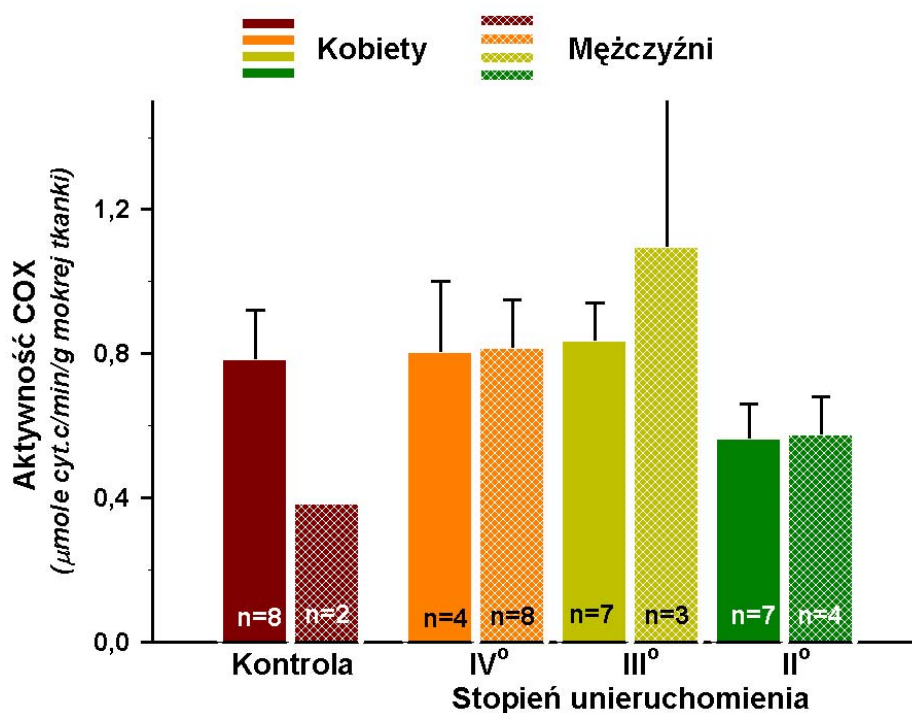
Tabela 4. Wpływ stopnia unieruchomienia stawu biodrowego na całkowite aktywności oksydazy cytochromu C (COX), dysmutazy ponadtlenukowej (SOD) oraz katalazy (CAT) w bioptatach mięśnia biodrowego.

Stopień unieruchomienia	COX	SOD	CAT
	$\mu\text{mole}/\text{min}/\text{g}$ mokrej tk	jednostki/g mokrej tk	$\mu\text{mole}/\text{min}/\text{g}$ mokrej tk
Kontrola (złamana)	0,71 ± 0,11 (n=10)	531 ± 31 (n=10)	321 ± 39 (n=11)
IV° (mierny)	0,82 ± 0,10 # (n=12)	670 ± 26**## (n=11)	428 ± 40 * (n=25)
III° (średni)	0,92 ± 0,14 # (n=10)	589 ± 51 (n=9)	546 ± 71**# (n=17)
II° (całkowity)	0,57 ± 0,07 (n=11)	533 ± 29 (n=10)	358 ± 35 (n=14)

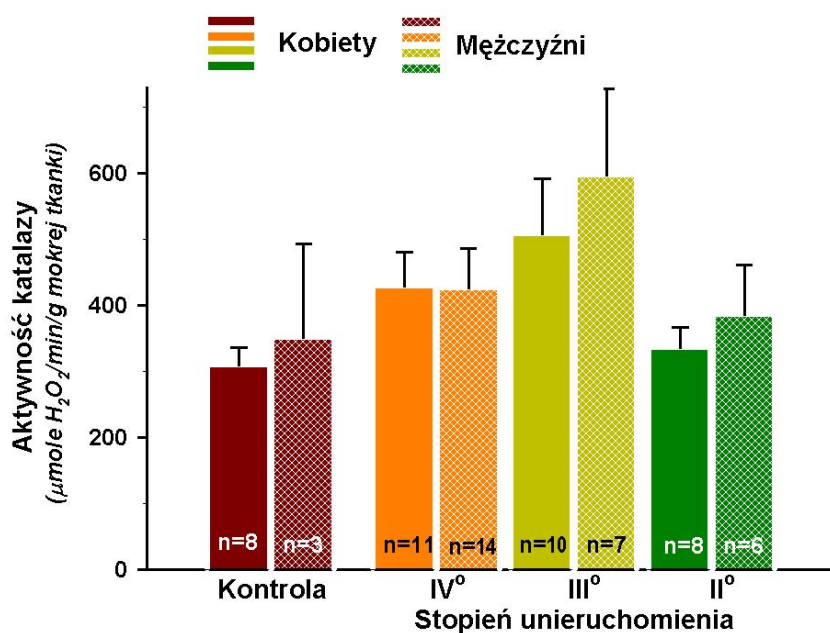
* p < 0,05, ** p < 0,01 vs kontrola

p < 0,05, ## p < 0,01 vs stopień II

Rycina 12. Wpływ stopnia unieruchomienia stawu biodrowego na aktywności oksydazy cytochromu c w bioptatach mięśnia biodrowego w zależności od płci badanych pacjentów.

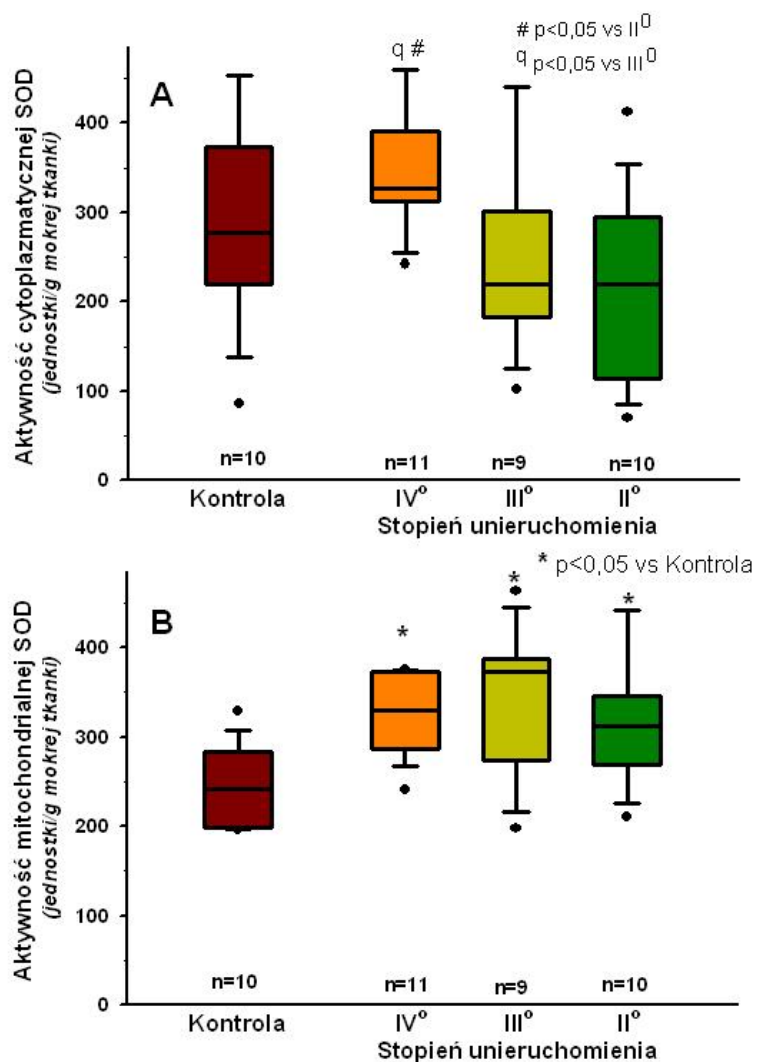


Rycina 13. Wpływ stopnia unieruchomienia stawu biodrowego na aktywności katalazy w biopsatach mięśnia biodrowego w zależności od płci badanych pacjentów.



Znacznie mniej wyraźnie zaznaczone zmiany obserwuje się w odniesieniu do aktywności **dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)**. Są one najwyższe u osób z miernym stopniem unieruchomienia, a w grupie o II stopniu unieruchomienia aktywność powraca do wartości oznaczanych w grupie kontrolnej. W przypadku tego enzymu obserwuje się natomiast wyraźne różnice w aktywności izoenzymów, cytoplazmatycznego i mitochondrialnego w zależności od stopnia unieruchomienia stawu biodrowego (Ryc. 14). W porównaniu do kontroli aktywność dysmutazy mitochondrialnej (Ryc. 14B.) jest wyraźnie, bo ponad 20% wyższa we wszystkich badanych grupach pacjentów. Natomiast aktywność izoenzymu cytoplazmatycznego (Ryc. 14A) jest nieco wyższa jedynie w grupie osób z miernym stopniem unieruchomienia po czym gwałtownie maleje bo aż o 28% i 39%, odpowiednio w grupie z III i II stopniem unieruchomienia. Nie wydaje się aby na dynamikę zmian aktywności tego enzymu miała wpływ płeć badanych osób, kierunek zmian jest podobny u kobiet i mężczyzn.

Rycina 14. Wpływ stopnia unieruchomienia stawu biodrowego na aktywności izoenzymu cytoplazmatycznego (A) i mitochondrialnego (B) dysmutazy ponadtlenkowej w biopsatach mięśnia biodrowego.



3. Wpływ reaktywnych form tlenu na białka i lipidy w mięśniach unieruchomionych.

Efekty działania ROS na struktury komórkowe mięśnia oceniano poprzez pomiar stężenia wolnych grup SH oraz malonowego dialdehydu (MDA) (Tab. 5). Wskaźniki te pozwalają na pośrednią ocenę stopnia uszkodzenia odpowiednio białek i lipidów. W porównaniu do kontroli (Ryc. 15) obserwuje się stopniowy ubytek wolnych grup SH szczególnie widoczny w grupie pacjentów całkowicie unieruchomionych. Natomiast stężenie **dialdehydu**

malonowego w mięśniach wyraźnie wzrasta w grupie IV i III, odpowiednio o 42% i 39% w stosunku do kontroli. Całkowite unieruchomienie niemal przywraca wartość tego wskaźnika do obserwowanych w grupie kontrolnej.

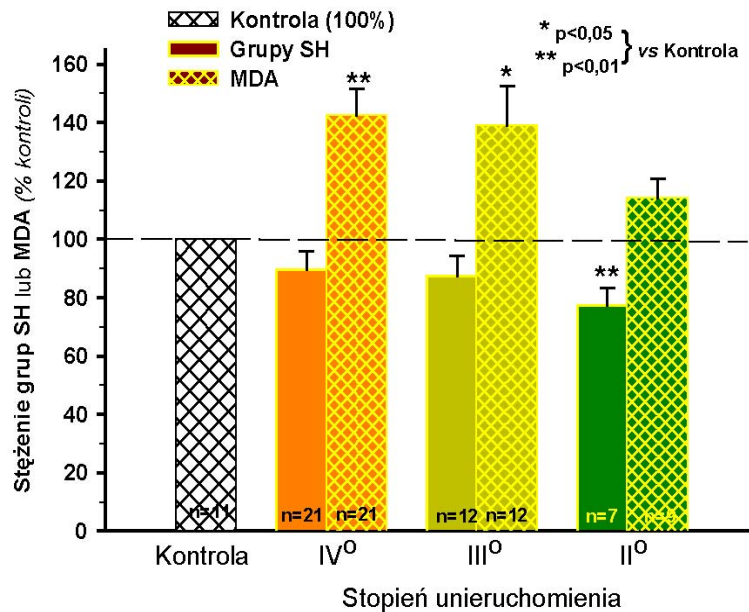
Tabela 5. Wpływ stopnia unieruchomienia stawu biodrowego na zawartość grup SH oraz malonowego dialdehydu (MDA) w bioptatach mięśnia biodrowego.

Stopień unieruchomienia	Grupy SH	MDA
	(μ mole./g mokrej tkanki)	(nmole./g mokrej tkanki)
Kontrola (złamania)	4,53 \pm 0,26 (n=11)	24,7 \pm 2,4 (n=10)
IV^o (mierny)	4,08 \pm 0,26 (n=21)	35,1 \pm 2,3** (n=21)
III^o (średni)	3,94 \pm 0,30 (n=12)	34,3 \pm 3,3* (n=13)
II^o (całkowity)	3,55 \pm 0,29 * (n=7)	28,2 \pm 1,6 (n=9)

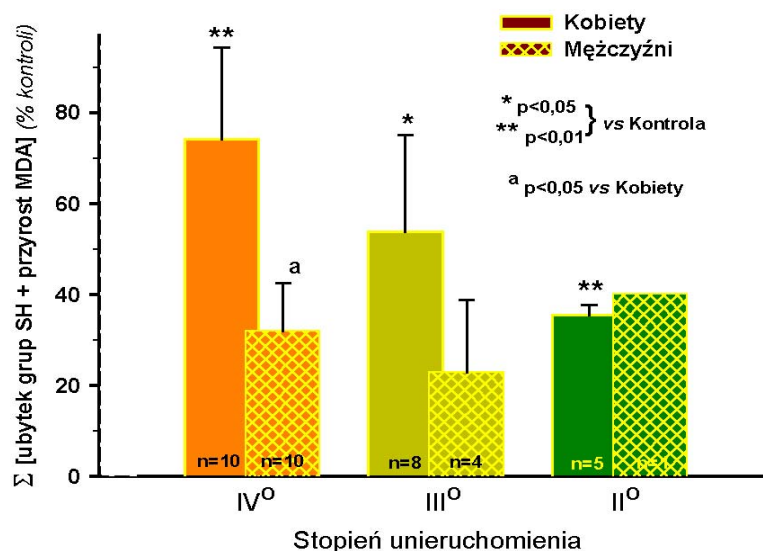
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs kontrola

Względne, w odniesieniu do kontroli zmiany w stężeniu obu wskaźników dają możliwość bardziej całościowej oceny stopnia uszkodzenia komórek. Suma względnego przyrostu MDA wraz z ubytkiem grup SH (Ryc. 16) jest najwyższy u osób z miernym stopniem unieruchomienia (IV) i maleje wraz z ograniczeniem ruchomości. Efekt ten wydaje się być zależny od płci badanych pacjentów i jest wyraźniej zaznaczony u kobiet. Wskaźnik sumy uszkodzeń w stopniu IV unieruchomienia jest znacząco wyższy u kobiet aniżeli u mężczyzn (odpowiednio 74 ± 20 % vs 32 ± 11 , $p < 0,05$). Różnice te u kobiet wydają się być głównie związane z ubytkiem grup SH (dane nie przedstawione). Poniższe wyniki sugerują, iż dochodzi do uszkodzenia białek szczególnie u kobiet, natomiast, niezależne od płci wydają się uszkodzenia błon lipidowo-białkowych.

Rycina 15. Wpływ stopnia unieruchomienia stawu biodrowego na względną zmianę stężeń grup SH i dialdehydu malonowego w biopsjach mięśnia biodrowego.



Rycina 16. Wpływ stopnia unieruchomienia stawu biodrowego na względną zmianę sumy stężeń grup SH i dialdehydu malonowego w biopsjach mięśnia biodrowego w zależności od płci badanych pacjentów.



NAJWAŻNIEJSZE OBSERWACJE

- Ograniczenie ruchomości stawów u mężczyzn prowadzi do przyrostu aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH), podczas gdy efektu tego nie obserwuje się u kobiet. Wraz ze wzrostem stopnia ograniczenia ruchomości aktywność LDH wraca do poziomu obserwowanego u kobiet.
- Unieruchomienie stopnia miernego (IV) i średniego (III) prowadzi do wzrostu aktywności dehydrogenazy jabłczanowej (MDH) w mięśniach. Pełne unieruchomienie przywraca aktywność tego enzymu do wartości obserwowanych w grupie kontrolnej.
- Zmiany aktywności MDH wydają się być związane tylko ze zmianami aktywności cytoplazmatycznej formy MDH.
- Mierny (IV) i średni (III) stopień unieruchomienia prowadzi do znaczącego wzrostu aktywności oksydazy cytochromu c (COX) i katalazy (CAT). Pełne unieruchomienie przywraca aktywność tych enzymów do wartości obserwowanych w kontroli.
- Częściowe unieruchomienie prowadzi do względnego przyrostu aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). Aktywność SOD jest najwyższa u osób z miernym (IV) stopniem unieruchomienia.
- Niezależnie od stopnia unieruchomienia obserwuje się podwyższone względne aktywności izoenzymu mitochondrialnego MnSOD, podczas gdy aktywność cytozolowego CuZnSOD maleje u osób z całkowitym unieruchomieniem do poziomu kontrolnego.
- Wraz ze wzrostem unieruchomienia obserwuje się znaczący spadek stężenia grup SH, wyraźniej zaznaczony u kobiet aniżeli u mężczyzn.
- Unieruchomienie powoduje wzrost stężenia dialdehydu malonowego (MDA), szczególnie widoczny u pacjentów z miernym (IV) i średnim (III) stopniem unieruchomienia.

DYSKUSJA

W przeprowadzonych badaniach można wyodrębnić trzy podstawowe etapy metabolizmu aktywnych form tlenu. Pierwszą grupę stanowią enzymy, których produkty są jednocześnie substratami dla enzymów generujących reaktywne formy tlenu. W pracy reprezentantem tych enzymów jest **dehydrogenaza mleczanowa LDH** oraz **dehydrogenaza jabłczanowa MDH**. Obie mogą dostarczać NAD(P)H, będącego substratem w reakcji katalizowanej przez oksydazę NAD(P)H, jednego z kluczowych enzymów wytwarzających anionorodnik ponadtlenny (Griendling *et al.* 2000). Enzymy bezpośredniego metabolizmu ROS stanowią drugą grupę. Do grupy tej można zaliczyć badaną w pracy **oksydazę cytochromową**, będącą końcowym ogniwem procesu wytwarzania anionu ponadtlenkowego w mitochondriach oraz **dysmutazę ponadtlenkową** i **katalazę**, odgrywających kluczową rolę w metabolizmie i neutralizacji reaktywnych form tlenu. Trzecią grupę obserwacji stanowią efekty oddziaływania ROS na tkanki, w których dochodzi do uszkodzenia białek komórkowych, materiału genetycznego oraz błon lipidowo-białkowych. Etap ten był reprezentowany w pracy przez pomiar produktów peroksydacji komórkowych lipidów, **dialdehydu malonowego (MDA)** oraz stężenie **grup SH**, odzwierciedlających stopień uszkodzenia białek.

Jednym z najczęściej obserwowanych skutków unieruchomienia w mięśniu szkieletowym jest wzrost aktywności przemian beztlenowych. Mogłoby to sugerować, że wzrasta również wytwarzanie NAD(P)H w reakcji katalizowanej przez enzym dehydrogenazę mleczanową. W dostępnym piśmiennictwie możemy spotkać bardzo zróżnicowane doniesienia dotyczące aktywności tego enzymu. Mogą mieć one swoje przyczyny w aktywności fizycznej i wieku badanych osób (Larsson *et al.* 1978; Orlander *et al.* 1978), sposobie i rodzaju pobierania materiału biologicznego oraz w warunkach

wykonania samego oznaczenia (temperatura, skład środowiska) (Aniansson *et al.* 1986). Jednakże większość publikowanych wyników oznaczeń aktywności całkowitego LDH w mięśniach zawiera się pomiędzy 30-60 $\mu\text{moli}/\text{min.}/\text{gram}$ tkanki i pokrywa się z wartościami uzyskanymi w prezentowanej pracy (Tab. 3). Aktywności tego enzymu maleją wraz ze stopniem ograniczenia ruchomości w stawie, szczególnie widoczne u mężczyzn (Ryc. 9). Efekt ten nie jest związany z wiekiem jako, że średni wiek pacjentów we wszystkich badanych grupach był bardzo do siebie zbliżony (Tab.-apendix). Podobnie spadek aktywności LDH w mięśniu szkieletowym obserwuje się u pacjentów unieruchomionych opatrunkiem gipsowym po przeprowadzonym leczeniu operacyjnym. Do spadku aktywności tego enzymu dochodzi również u zwierząt, które podwieszano przez okres 3-5 tygodni (Ohira *et al.* 2002; Simard *et al.* 1985b). Autorzy tych prac zjawisko to interpretują jednak jako wynik niezależny od zjawiska transformacji włókien mięśniowych, gdyż stopień obniżenia aktywności LDH jest równoległy do spadku w stężeniu białka.

Być może przyczyną zwiększenia aktywności LDH u mężczyzn jest, większa aniżeli u kobiet aktywność fizyczna i związana z tym większa aktywność glikolityczna. Przesłanką wskazującą na taką możliwość jest obserwacja, że różnic pomiędzy płciami nie zauważa się u pacjentów z pełnym unieruchomieniem stawu biodrowego (Ryc. 9. grupa II). Taki wniosek można też wysnuć z obserwacji, że u osób prowadzących sedenteryjny tryb życia w różnych grupach wiekowych, obserwuje się wzrost aktywności z wiekiem innego enzymu przemiany glikolitycznej, kinazy pirogronianowej i efekt ten wyraźniej zaznaczony jest u mężczyzn niż u kobiet (Pastoris *et al.* 2000).

Drugim enzymem, mogącym dostarczać NAD(P)H, którego aktywność była oznaczana to dehydrogenaza jabłczanowa. Aktywność całkowita tego enzymu w mięśniu jest ponad dwukrotnie wyższa od LDH. W prowadzonych badaniach zawierają się one pomiędzy 80 a 120 $\mu\text{mole}/\text{min.}/\text{gram}$ tkanki. Wyniki te mieszczą się w zakresie wartości obserwowanych i opisywanych

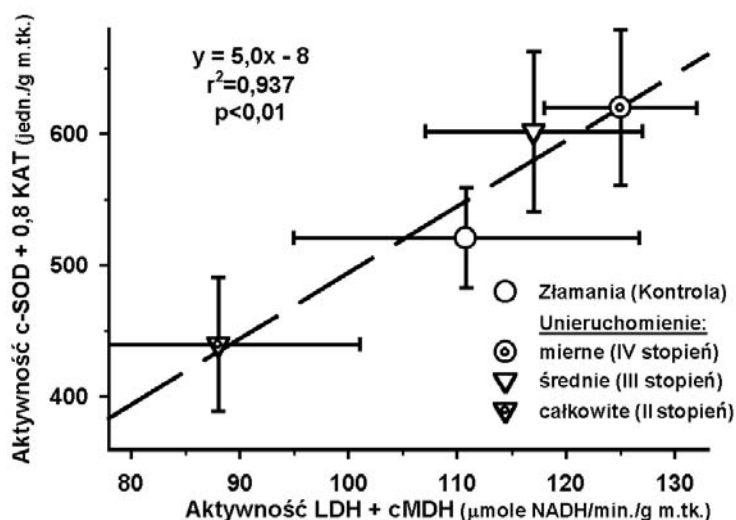
w literaturze (Rosser and Hochachka 1993; Simoneau *et al.* 1985; Bouchard *et al.* 1986), gdzie oznaczane wartości wahały się od 20-230 μmoli na minutę na gram tkanki. Przyczyną tak dużego zakresu aktywności może być, oprócz przyczyn opisanych wcześniej dla LDH, bardziej zróżnicowane rozmieszczenie tego enzymu w komórce. W odróżnieniu od LDH aktywność MDH występuje nie tylko w cytoplazmie, ale też w mitochondriach i są to dwie odmienne formy enzymu.

Przedstawione w pracy wyniki wskazują, że częściowe ograniczenie ruchomości stawów biodrowych (stopień IV i III) pociąga za sobą wzrost aktywności całkowitej MDH (Tab. 3) przy czym efekt ten związany jest jedynie ze zmianami formy cytoplazmatycznej enzymu. Nie wydaje się też być związany z płcią. Obserwowany w mojej pracy kierunek zmian aktywności MDH jest jednak odmienny od opisywanych wcześniej na zwierzętach (Simard *et al.* 1985a; Simard *et al.* 1985b). Jednakże cytowane doświadczenia były prowadzone na szczurach, które podwieszano i u których badane mięśnie odnerwiono, a więc na modelu całkowicie odmiennym do prezentowanego w pracy.

Wzrost aktywności cytoplazmatycznej formy MDH i zmiany aktywności LDH sugerują, że enzymy te mogłyby być ważnym źródłem NAD(P)H jako prekursora wytwarzania aktywnych form tlenu. Warunkiem podstawowym tego procesu jest obecność oksydazy NAD(P)H. Wysoką aktywność tego enzymu stwierdza się oczywiście w komórkach fagocytarnych oraz śródbłonku naczyń (Griendling *et al.* 2000), ale znaczące aktywności wykazano również w mięśniu szkieletowym (Xia *et al.* 2003). Występuje on tam głównie w formie cytoplazmatycznej enzymu, który w większym stopniu aniżeli mitochondrialny wydaje się być odpowiedzialny za wytwarzanie anionu nadadtlenkowego. Powstaje zatem pytanie czy uzyskane wyniki pozwalają ocenić udział LDH i MDH w generowaniu cytoplazmatycznego NAD(P)H dla oksydazy tego dinukleotydu, mogąc w ten sposób modulować wytwarzanie reaktywnych form tlenu w komórce. Efektem tego powinny być zarówno zmiany w aktywności

enzymów generujących wolne rodniki, enzymów je usuwających oraz zróżnicowane skutki oddziaływania reaktywnych form tlenu na tkanki. Na istnienie takiego zależnego od siebie ciągu zdarzeń pośrednio wskazywałyby uzyskane w pracy wyniki badań. Pierwszą z tych zależności pokazano na rycinie 17, na której przedstawiono zależność pomiędzy sumą cytoplazmatycznych aktywności LDH i MDH (c-MDH), a sumą cytoplazmatycznych aktywności dysmutazy CuZnSOD i katalazy. Przyjęto przy tym, że około 80% aktywności tego ostatniego enzymu występuje w cytoplazmie.

Rycina 17. Współzależność pomiędzy sumą cytoplazmatycznych aktywności dehydrogenaz LDH i MDH a sumą cytoplazmatycznych aktywności dysmutazy SOD i katalazy.

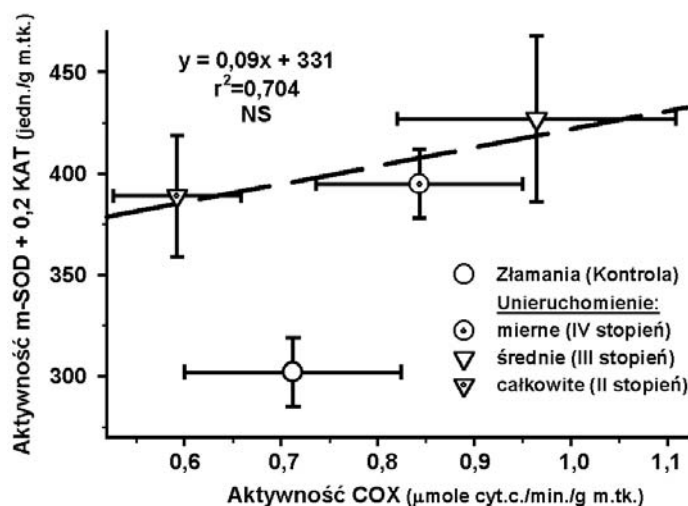


Wysoce znamiennej zależności pomiędzy badanymi parametrami pozwala przypuszczać, że unieruchomienie mięśni zdaje się indukować wytwarzanie reaktywnych form tlenu, a istotną rolę w tym procesie może odgrywać NAD(P)H generowany przez cytoplazmatyczne dehydrogenazy, mleczanową i jabłczanową. Przedstawione wyniki nie pozwalają jednak na ocenę jak wielki mógłby być ilościowy udział oksydazy NAD(P)H w wytwarzaniu ROS. Nie oznaczano bowiem w pracy aktywności żadnego z cytoplazmatycznych enzymów odpowiedzialnych za wytwarzanie anionu nadadtlenkowego ani wielkości jego produkcji. Jednakże, w doświadczeniach przeprowadzanych na zwierzętach, które poddano wpływowi różnorodnych form unieruchomienia

wskazują, że w stanach tych dochodzi do wzrostu produkcji reaktywnych form tlenu (Kondo *et al.* 1993a; Kondo *et al.* 1993b; Lawler *et al.* 2003), sugerując, że jest to głównie efekt zwiększonej aktywności oksydazy ksantynowej. Autorzy Ci wskazują również na wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych w cytoplazmie komórki, głównie CuZnSOD.

Znacznie trudniej jest ocenić zdolności mitochondriów do wytwarzania reaktywnych form tlenu w komórce. Oznaczana w pracy aktywność oksydazy cytochromowej tylko pośrednio odzwierciedla możliwości generowania ROS w łańcuchu oddechowym i nie obejmuje innych możliwych źródeł, jak np. oksydaza NAD(P)H. Trudno jest też ocenić zdolności mitochondriów do neutralizacji wolnych rodników. Wprawdzie w pracy oznaczano względne aktywności MnSOD, mitochondrialnej izofory dysmutazy, to udział drugiego enzymu katalazy w tym procesie jest znacznie słabiej rozpoznany. Dane literaturowe wskazują, co najwyżej, na niewielki udział w obronie antyoksydacyjnej katalazy mitochondrialnej (Phung *et al.* 1994; Turrens 2003). Przyjmując jednak ułomność tych informacji, przyjęto próbę określenia zależności pomiędzy wytwarzaniem ROS, ocenianym poprzez aktywność oksydazy cytochromowej, a sumą aktywności enzymów zużywających wolne rodniki: MnSOD powiększoną o 20% oznaczonych aktywności CAT (Ryc. 18).

Rycina 18. Współzależność pomiędzy aktywnością oksydazy cytochromu c a sumą mitochondrialnych aktywności dysmutazy SOD i katalazy.



Zależność ta wykazuje podobną tendencję dla warunków obserwowanych w cytoplazmie (Ryc.D1), nie wykazuje jednak zmian statystycznie znamiennej. Uwagę zwraca fakt, że aktywność mitochondrialnych enzymów neutralizujących ROS jest wyraźnie wyższa u osób długotrwale unieruchomionych w porównaniu do osób ze złamaniami, u których unieruchomienie mięśni nie przekraczało kilku dni. Interpretacja tego zjawiska może być dwojaka. Wzrost enzymów zużywających ROS może być przejawem zmian zachodzących w mitochondriach w stanie atrofii mięśni i/lub jest odpowiedzią na zwiększoną produkcję ROS w tej organeli komórkowej.

Na pierwszą możliwość wskazują wcześniejsze obserwacje, że unieruchomienie prowadzi raczej do spadku aktywności COX oraz ograniczenia tlenowych przemian mitochondrialnych (Connor and Hood 1998). Jednakże w grupach przede mnie badanych osób o niepełnym unieruchomieniu (stopień III i IV), obserwujemy wzrost aktywności oksydazy cytochromowej. Najprawdopodobniej jest to związane z utrzymującą się aktywnością mięśni, a tym samym z podejmowanym wysiłkiem fizycznym, co w konsekwencji może prowadzić do zwiększonej produkcji anionorodnika ponadtlenkowego w łańcuchu oddechowym. Za drugą możliwością przemawiają obserwacje, że niepełne unieruchomienie prowadzi do wzrostu aktywności enzymów obrony antyoksydacyjnej (Tab.4). Efekt taki występuje również u zwierząt z jedną kończyną unieruchomioną stosunkowo krótko, bo przez dwanaście dni (Kondo *et al.* 1993b), lecz nie u zwierząt podwieszonych przez cztery tygodnie (Lawler *et al.* 2003a). Nie można też wykluczyć innej przyczyny, jaką jest obserwowany w atrofii spadek zawartości białka w mięśniach (Loughna *et al.* 1986; Homberger *et al.* 2001; Goldberg 1969). Nierównomierny ubytek różnych białek może w efekcie prowadzić do pozornego wzrostu aktywności niektórych enzymów jako, że wyniki przeliczane są bądź na zawartość białka, bądź na mokrą wagę tkanki.

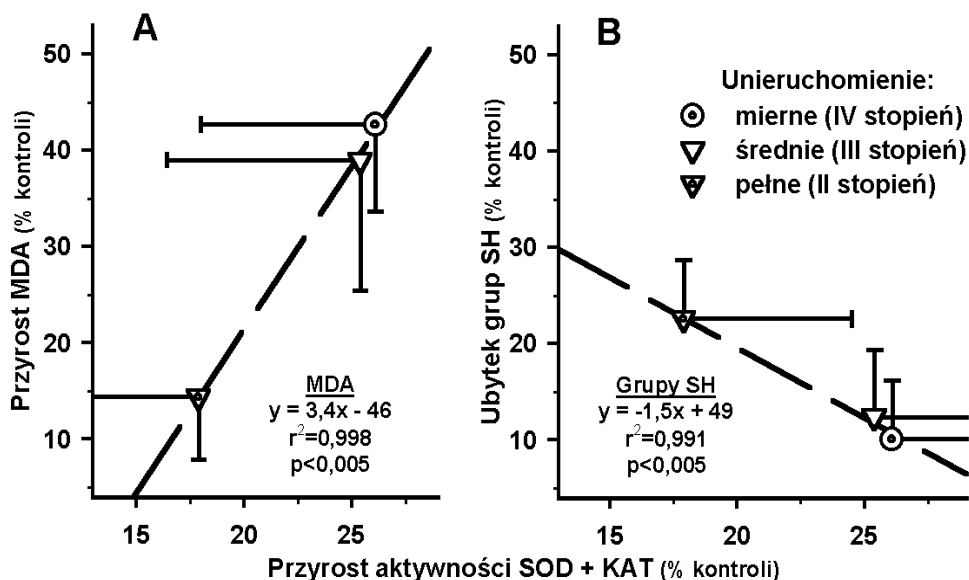
Przedstawiona ocena wskazuje, że w wyniku częściowego unieruchomienia może dochodzić do wzrostu produkcji ROS, a w konsekwencji

do wzrostu aktywności enzymów usuwających reaktywne formy tlenu. Natomiast całkowite unieruchomienie najczęściej przywraca aktywności do poziomów zbliżonych do wartości kontrolnych. Przedstawione wyżej współzależności wskazują też, że zmiany w aktywności enzymów usuwających wolne rodniki mogą być efektem zmian produkcji ROS. Enzymem, który wydaje się podstawowym w enzymatycznej linii obrony antyoksydacyjnej jest dysmutaza ponadtlenkowa (SOD). Jej przybliżona całkowita aktywność wzrasta szczególnie w grupach z częściowo zachowaną funkcją w stawie w porównaniu z grupą o całkowitym ograniczeniu ruchomości, w której mięśnie odpowiedzialne za czynny ruch w stawie wykazują mniejszą aktywność. Podobne obserwacje odnoszą też się do innego enzymu obrony antyoksydacyjnej, do katalazy.

Zmiany aktywności tych enzymów podobnie jak zmiany w ilości wytwarzanych ROS powinny mieć swoje „przełożenie” w skutkach oddziaływania wolnych rodników na składniki komórkowe. W pracy starałem się określić czy unieruchomienie prowadzi, poprzez zwiększoną produkcję ROS do uszkodzenia lipidów i białek komórkowych. Jeżeli, jak to sugerują wyniki tej pracy zmiany aktywności enzymów neutralizujących wolne rodniki odzwierciedlają ich produkcję, to zmiany SOD i CAT powinny korelować ze stopniem uszkodzenia białek i lipidów. Taki przewidywany efekt jest wyraźnie widoczny w odniesieniu do lipidów, gdzie wzrostowi aktywności SOD i katalazy towarzyszy wzrost stężenia MDA (Ryc. 19A), wskazując w ten sposób na prawdopodobieństwo zwiększenia uszkodzenia struktur lipidowych komórki.

Całkowicie jednak inaczej prezentują się podobne zależności w odniesieniu do białek komórkowych. Wraz ze wzrostem aktywności enzymów antyoksydacyjnych maleje stopień uszkodzenia białek, uwidoczniiony w wynikach pracy wyraźnym ograniczeniem spadku stężenia grup SH (Ryc. 19B).

Rycina 19. Współzależność pomiędzy sumą względną zmian aktywności całkowitych dysmutazy SOD i katalazy a względnym przyrostem stężenia aldehydu malonowego (A) lub względnym ubytkiem stężeń grup SH (B).



Poczynione w pracy obserwacje wskazują jednocześnie, że unieruchomienie prowadzi do wzrostu uszkodzenia zarówno białek jak i lipidów (Tab. 5), potwierdzając przypuszczenie, że w tej sytuacji dochodzi do wzrostu produkcji ROS. Powiązanie tych obu obserwacji sugeruje, że istnieją odmienności w mechanizmach neutralizujących ROS w mięśniach w odniesieniu do białek i do lipidów. Największe uszkodzenie lipidów i jednocześnie wzrost aktywności antyoksydantów uwidacznia się najbardziej u ludzi z częściowo zachowaną ruchomością mięśni. Natomiast największy stopień uszkodzenia białek widoczny jest w sytuacji pełnego unieruchomienia (II), a więc w sytuacji gdy aktywność dysmutazy i katalazy u badanych pacjentów jest najniższa. Prowadzi to do wniosku że, struktura białek komórek mięśniowych wydaje się być bardziej efektywniej aniżeli struktury lipidowe chroniona przed destrukcyjnym działaniem ROS. Wydaje się też, że zjawisko to może być ściśle związane z zmianami aktywności enzymów antyoksydacyjnych.

WNIOSKI

1. Częściowe ograniczenie ruchomości w stawie biodrowym prowadzi do wzrostu aktywności w mięśniach szkieletowych zarówno enzymów generujących jak i usuwających aktywne formy tlenu. Zmiany te zanikają w mięśniach całkowicie unieruchomionych.
2. W częściowo unieruchomionych mięśniach przypuszczalnie dochodzi do wytwarzania zwiększonych ilości aktywnych form tlenu.
3. Unieruchomienie mięśnia prowadzi do uszkodzenia jego struktur białkowych i lipidowych przy czym stopień uszkodzenia wydaje się wynikać z jednoczesnych zmian w aktywności enzymów odpowiedzialnych za wytwarzanie ROS oraz enzymów je neutralizujących.

STRESZCZENIE

Jedną z najbardziej rozpowszechnionych chorób prowadzącą do ograniczenia funkcji lokomocyjnych jest choroba zwyrodnieniowa stawów biodrowych. Jej etiologia jest bardzo złożona, począwszy od zmian spowodowanych zbyt dużymi obciążeniami, poprzez wpływ wieku, a na czynnikach genetycznych skończywszy. W konsekwencji dochodzi do ograniczenia ruchomości objętych procesem chorobowym stawów co prowadzi do zmian w metabolizmie mięśnia funkcjonalnie z tym stawem związanego. Jedną z konsekwencji tego stanu może być zaburzenie przemian związanych z produkcją i obroną przed reaktywnymi formami tlenu.

Celem pracy było zbadanie czy ograniczenie ruchomości spowodowane zmianami zwyrodnieniowymi w stawie biodrowym zmienia metabolizm reaktywnych form tlenu i w ten sposób może przyczynić się do wzmożonego uszkodzenia mięśnia i jego atrofii.

Badaniem objęto 67 osób (37 kobiet, 30 mężczyzn) o średniej wieku $66,7 \pm 1,2$ lat (36-92) wraz z grupą kontrolną 11 osób ze złamaniami ($69,3 \pm 3,3$) leczonych operacyjnie w Klinice Ortopedii AMG w latach 2001-2003. Pacjenci z rozpoznaniem choroby zwyrodnieniowej byli zakwalifikowani do zabiegu alloplastyki stawu biodrowego na podstawie badania klinicznego, badań laboratoryjnych oraz obrazu radiologicznego stawu biodrowego. W zależności od stopnia unieruchomienia pacjentów podzielono na cztery grupy wg skali D'Aubigne i Postela. Badania przeprowadzono za pisemną zgodą Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku.

Wycinki tkanki pobierano śródoperacyjnie podczas zabiegu z mięśnia szkieletowego pośladkowego średniego.

W mięśniach oznaczono (i) aktywności enzymów zaangażowanych w produkcję aktywnych form tlenu: dehydrogenazy mleczanowej i jabłczanowej oraz

oksydazę cytochromową; (ii) aktywności enzymów związanych z neutralizacją aktywnych form tlenu: dysmutazę ponadtlenkową i katalazę oraz (iii) stopień uszkodzenia białek i lipidów komórek mięśniowych poprzez ocenę odpowiednio stopnia utlenienia grup SH oraz stężenia dialdehydu malonowego (MDA). Wyniki podawano w przeliczeniu na gram mięśnia. Aktywności enzymatyczne oraz zawartości grup SH i MDA oznaczano metodami spektrokolorymetrycznymi, a uzyskane wyniki przeliczano na mokrą masę tkanki.

Częściowe ograniczenie ruchomości stawu biodrowego prowadzi do miernego przyrostu aktywności dehydrogenazy mleczanowej i jabłczanowej oraz oksydazy cytochromowej. Największy, bo ponad 20% przyrost aktywności cytoplazmatycznego MDH oraz oksydazy cytochromowej obserwuje się w grupie osób ze średnim (III⁰) stopniem unieruchomienia stawu. Całkowite unieruchomienie (II⁰) pociąga za sobą spadek aktywności tych enzymów do wartości obserwowanych w kontroli. Podobnym zmianom ulegają aktywności enzymów metabolizmu ROS: dysmutazy ponadtlenkowej oraz katalazy. Szczególnie wyraźne zmiany dotyczą cytozolowej formy dysmutazy, której aktywność rośnie u pacjentów w grupie IV, a u pacjentów z daleko posuniętym unieruchomieniem (grupa III i II) osiąga poziomy nawet mniejsze od kontrolnych. Wraz ze wzrostem stopnia unieruchomienia rośnie stopień uszkodzenia białek dochodzący do około 10% ubytku grup SH w mięśniach osób z pełnym unieruchomieniem. Stężenie MDA świadczące o uszkodzeniu lipidów, jest największe bo ok. 40% u osób z zachowaną częściowo ruchomością (grupa IV i III) w porównaniu do grupy kontrolnej.

Uzyskane wyniki prowadzą do wniosku, że unieruchomienie stawu prowadzi przypuszczalnie do wzrostu produkcji aktywnych form tlenu i w konsekwencji do uszkodzenia struktur lipidowo-białkowych komórek mięśniowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Aebi H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-6., 121-126.
2. Aniansson, A., Hedberg, M., Henning, G. B., and Grimby, G. (1986) Muscle morphology, enzymatic activity, and muscle strength in elderly men: a follow-up study. *Muscle Nerve* 9, 585-591.
3. Appell, H. J. (1990) Muscular atrophy following immobilisation. A review. *Sports Med* 10, 42-58.
4. Bartosz, G. (2004) Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. *PWN* Wyd. II..
5. Bartosz, G. (1995) Druga twarz tlenu. *PWN* wyd I.
6. Belozerova, I. N., Nemirovskaya, T. L., Shenkman, B. S., and Kozlovskaya, I. B. (2003) Characteristic of changes in the structure and metabolism of the vastus lateralis muscles in monkeys after space flight. *Neurosci Behav Physiol* 33, 735-740.
7. Bigard, A. X., Boehm, E., Veksler, V., Mateo, P., Anfous, K., and Ventura-Clapier, R. (1998) Muscle unloading induces slow to fast transitions in myofibrillar but not mitochondrial properties. Relevance to skeletal muscle abnormalities in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 30, 2391-2401.
8. Bouchard, C., Simoneau, J. A., Lortie, G., Boulay, M. R., Marcotte, M., and Thibault, M. C. (1986) Genetic effects in human skeletal muscle fiber type distribution and enzyme activities. *Can J Physiol Pharmacol* 64, 1245-1251.
9. Boveris, A. and Chance, B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134, 707-716.
10. Buckwalter, J. A. and Brown, T. D. (2004) Joint injury, repair, and remodeling: roles in post-traumatic osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res* 7-16.
11. Buckwalter, J. A. and Lane, N. E. (1997) Athletics and osteoarthritis. *Am J Sports Med* 25, 873-881.
12. Buckwalter, J. A. and Mankin, H. J. (1997) Articular cartilage. II. Degeneration and osteoarthrosis, repair, regeneration, and transplantation. *Journal of Bone and Joint Surgery (American volume)* 79, 612-632.
13. Cadenas, E. and Davies, K. J. (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29, 222-230.
14. Carmeli E, Reznick A.Z, Coleman R, Volpin G, and Zarzhevsky N (2001) Biochemical and histochemical study of hind limb muscles of aged rats after immobilization and remobilization. *Biology of Sport* 18, 21-23.
15. Cassarino, D. S. and Bennett, J. P., Jr. (1999) An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Res Brain Res Rev* 29, 1-25.

16. Castro, L. A., Robalinho, R. L., Cayota, A., Meneghini, R., and Radi, R. (1998) Nitric oxide and peroxynitrite-dependent aconitase inactivation and iron-regulatory protein-1 activation in mammalian fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 359, 215-224.
17. Castro, M. J., Apple, D. F., Jr., Rogers, S., and Dudley, G. A. (2000) Influence of complete spinal cord injury on skeletal muscle mechanics within the first 6 months of injury. *Eur J Appl Physiol* 81, 128-131.
18. Chance, B. and Williams, G. R. (1956) The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* 17:65-134., 65-134.
19. Coggon, D., Kellingray, S., Inskip, H., Croft, P., Campbell, L., and Cooper, C. (1998) Osteoarthritis of the hip and occupational lifting. *Am J Epidemiol* 147, 523-528.
20. Connor, M. K. and Hood, D. A. (1998) Effect of microgravity on the expression of mitochondrial enzymes in rat cardiac and skeletal muscles. *J Appl Physiol* 84, 593-598.
21. Czyrny, Z. (2001) Badanie obrazowe w diagnostyce chrząstki stawowej. *Acta Clinica* 1, 33-44.
22. D'Ambrosia, R. D. (2005) Epidemiology of osteoarthritis. *Orthopedics* 28, s201-s205.
23. D'Antona, G., Pellegrino, M. A., Adami, R., Rossi, R., Carlizzi, C. N., Canepari, M., Saltin, B., and Bottinelli, R. (2003) The effect of ageing and immobilization on structure and function of human skeletal muscle fibres. *J Physiol* 552, 499-511.
24. D'Aubigne, R. M. and Postel, M. (1954) Functional results of hip arthroplasty with acrylic prosthesis. *J Bone Joint Surg Am* 36-A, 451-475.
25. DeCoursey, T. E. (2003) Interactions between NADPH oxidase and voltage-gated proton channels: why electron transport depends on proton transport. *FEBS Lett* 555, 57-61.
26. Dega, W. (1983) Ortopedia i rehabilitacja. *PZWL* T II.
27. Deschenes, M. R., Britt, A. A., and Chandler, W. C. (2001) A comparison of the effects of unloading in young adult and aged skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* 33, 1477-1483.
28. Desplanches, D., Hoppeler, H., Mayet, M. H., Denis, C., Claassen, H., and Ferretti, G. (1998) Effects of bedrest on deltoideus muscle morphology and enzymes. *Acta Physiol Scand* 162, 135-140.
29. Desplanches, D., Mayet, M. H., Sempore, B., and Flandrois, R. (1987) Structural and functional responses to prolonged hindlimb suspension in rat muscle. *J Appl Physiol* 63, 558-563.
30. Dieppe, P. (1999) Osteoarthritis: time to shift the paradigm. This includes distinguishing between severe disease and common minor disability. *BMJ* 318, 1299-1300.
31. Droge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47-95.
32. Edgerton, V. R., Zhou, M. Y., Ohira, Y., Klitgaard, H., Jiang, B., Bell, G., Harris, B., Saltin, B., Gollnick, P. D., Roy, R. R., and . (1995) Human fiber size and enzymatic properties after 5 and 11 days of spaceflight. *J Appl Physiol* 78, 1733-1739.

33. Fell, R. D., Steffen, J. M., and Musacchia, X. J. (1985) Effect of hypokinesia-hypodynamia on rat muscle oxidative capacity and glucose uptake. *Am J Physiol* 249, R308-R312.
34. Felson, D. T. (1990) Osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 16, 499-512.
35. Felson, D. T., Hannan, M. T., Naimark, A., Berkeley, J., Gordon, G., Wilson, P. W., and Anderson, J. (1991) Occupational physical demands, knee bending, and knee osteoarthritis: results from the Framingham Study. *J Rheumatol* 18, 1587-1592.
36. Felson, D. T., Lawrence, R. C., Dieppe, P. A., Hirsch, R., Helmick, C. G., Jordan, J. M., Kington, R. S., Lane, N. E., Nevitt, M. C., Zhang, Y., Sowers, M., McAlindon, T., Spector, T. D., Poole, A. R., Yanovski, S. Z., Ateshian, G., Sharma, L., Buckwalter, J. A., Brandt, K. D., and Fries, J. F. (2000) Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med* 133, 635-646.
37. Ferretti, G., Antonutto, G., Denis, C., Hoppeler, H., Minetti, A. E., Narici, M. V., and Desplanches, D. (1997) The interplay of central and peripheral factors in limiting maximal O₂ consumption in man after prolonged bed rest. *J Physiol* 501, 677-686.
38. Filipek, J., Gelienuova, K., Kovacs, P., and Balgavy, P. (1993) Effect of lipid autoperoxidation on the activity of the sarcoplasmic reticulum (Ca²⁺-Mg²⁺)ATPase reconstituted into egg yolk phosphatidylcholine bilayers. *Gen Physiol Biophys* 12, 55-68.
39. Finkel, T. (2003) Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* 15, 247-254.
40. Fitts, R. H., Riley, D. R., and Widrick, J. J. (2000) Microgravity and skeletal muscle. *J Appl Physiol* 89, 823-839.
41. Fitts, R. H., Brimmer, C. J., Heywood-Cooksey, A., and Timmerman, R. J. (1989) Single muscle fiber enzyme shifts with hindlimb suspension and immobilization. *Am J Physiol* 256, C1082-C1091.
42. Flohe, L. and Otting, F. (1984) Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol* 105:93-104., 93-104.
43. Goldberg, A. L. (1969) Protein turnover in skeletal muscle. II. Effects of denervation and cortisone on protein catabolism in skeletal muscle. *J Biol Chem* 244, 3223-3229.
44. Griending, K. K., Sorescu, D., and Ushio-Fukai, M. (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86, 494-501.
45. Groskreutz, J. J. and Thompson, L. V. (2002) Enzymatic alterations in single type IIB skeletal muscle fibers with inactivity and exercise in 12- and 30-month-old rats. *Aging Clin Exp Res* 14, 347-353.
46. Gryglewski, R. J., Palmer, R. M., and Moncada, S. (1986) Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320, 454-456.
47. Hadler, N. M., Gillings, D. B., Imbus, H. R., Levitin, P. M., Makuc, D., Utsinger, P. D., Yount, W. J., Slusser, D., and Moskovitz, N. (1978) Hand structure and function in an industrial setting. *Arthritis Rheum* 21, 210-220.

48. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186:1-85., 1-85.
49. Hamerman, D. (1989) The biology of osteoarthritis. *N Engl J Med* 320, 1322-1330.
50. Hannan, M. T., Anderson, J. J., Zhang, Y., Levy, D., and Felson, D. T. (1993) Bone mineral density and knee osteoarthritis in elderly men and women. The Framingham Study. *Arthritis Rheum* 36, 1671-1680.
51. Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11, 298-300.
52. Heck, D. E., Kagan, V. E., Shvedova, A. A., and Laskin, J. D. (2005) An epigrammatic (abridged) recounting of the myriad tales of astonishing deeds and dire consequences pertaining to nitric oxide and reactive oxygen species in mitochondria with an ancillary missive concerning the origins of apoptosis. *Toxicology* 208, 259-271.
53. Hickman-Davis, J. M., Fang, F. C., Nathan, C., Shepherd, V. L., Voelker, D. R., and Wright, J. R. (2001) Lung surfactant and reactive oxygen-nitrogen species: antimicrobial activity and host-pathogen interactions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281, L517-L523.
54. Hikida, R. S., Gollnick, P. D., Dudley, G. A., Convertino, V. A., and Buchanan, P. (1989) Structural and metabolic characteristics of human skeletal muscle following 30 days of simulated microgravity. *Aviat Space Environ Med* 60, 664-670.
55. Hoffmann, S. J., Roy, R. R., Blanco, C. E., and Edgerton, V. R. (1990) Enzyme profiles of single muscle fibers never exposed to normal neuromuscular activity. *J Appl Physiol* 69, 1150-1158.
56. Honkonen, S. E. (1995) Degenerative arthritis after tibial plateau fractures. *J Orthop Trauma* 9, 273-277.
57. Hornberger, T. A., Hunter, R. B., Kandarian, S. C., and Esser, K. A. (2001) Regulation of translation factors during hindlimb unloading and denervation of skeletal muscle in rats. *Am J Physiol Cell Physiol* 281, C179-C187.
58. Horner, A., Kemp, P., Summers, C., Bord, S., Bishop, N. J., Kelsall, A. W., Coleman, N., and Compston, J. E. (1998) Expression and distribution of transforming growth factor-beta isoforms and their signaling receptors in growing human bone. *Bone* 23, 95-102.
59. Hudson, N. J. and Franklin, C. E. (2002) Maintaining muscle mass during extended disuse: aestivating frogs as a model species. *J Exp Biol* 205, 2297-2303.
60. Ignarro, L. J. and Kadowitz, P. J. (1985) The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 25:171-91., 171-191.
61. Javesghani, D., Magder, S. A., Barreiro, E., Quinn, M. T., and Hussain, S. N. (2002) Molecular characterization of a superoxide-generating NAD(P)H oxidase in the ventilatory muscles. *Am J Respir Crit Care Med* 165, 412-418.
62. Jordan, J. M., Renner, J. B., Luta, G., Dragomir, A., Fryer, J. G., Helmick, C. G., and Hochberg, M. C. (1997) Hip osteoarthritis (OA) is not rare in African -Americans and is different than in Caucasians. *Arthritis Rheum* 40, 236.

63. Kellgren, J. H. and Lawrence, J. S. (1957) Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis* 16, 494-502.
64. Kellgren, J. H., Lawrence, J. S., and Bier, F. (1963) Genetic factors in generalized osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis* 22:237-55., 237-255.
65. Keyse, S. M. and Tyrrell, R. M. (1989) Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 99-103.
66. Klebanoff, S. J. (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* ..
67. Kondo, H., Miura, M., and Itokawa, Y. (1993a) Antioxidant enzyme systems in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Pflugers Arch* 422, 404-406.
68. Kondo, H., Miura, M., Nakagaki, I., Sasaki, S., and Itokawa, Y. (1992) Trace element movement and oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am J Physiol* 262, E583-E590.
69. Kondo, H., Nakagaki, I., Sasaki, S., Hori, S., and Itokawa, Y. (1993b) Mechanism of oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am J Physiol* 265, E839-E844.
70. Kourtidou-Papadeli, C., Kyparos, A., Albani, M., Frossinis, A., Papadelis, C. L., Bamidis, P., Vivas, A., and Guiba-Tziampiri, O. (2004) Electrophysiological, histochemical, and hormonal adaptation of rat muscle after prolonged hindlimb suspension. *Acta Astronaut* 54, 737-747.
71. Kujala, U. M., Kaprio, J., and Sarna, S. (1994) Osteoarthritis of weight bearing joints of lower limbs in former elite male athletes. *BMJ* 308, 231-234.
72. Kujala, U. M., Kettunen, J., Paananen, H., Aalto, T., Battie, M. C., Impivaara, O., Videman, T., and Sarna, S. (1995) Knee osteoarthritis in former runners, soccer players, weight lifters, and shooters. *Arthritis Rheum* 38, 539-546.
73. Larsson, L., Sjodin, B., and Karlsson, J. (1978) Histochemical and biochemical changes in human skeletal muscle with age in sedentary males, age 22--65 years. *Acta Physiol Scand* 103, 31-39.
74. Lawler, J. M., Cline, C. C., Hu, Z., and Coast, J. R. (1997) Effect of oxidative stress and acidosis on diaphragm contractile function. *Am J Physiol* 273, R630-R636.
75. Lawler, J. M., Song, W., and Demaree, S. R. (2003) Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 35, 9-16.
76. Leger, L. A. and Taylor, A. W. (1982) The chronic effects of continuous and intermittent running upon lactate dehydrogenase activity of heart, fast and slow twitch muscles in the rat. *J Physiol (Paris)* 78, 499-506.
77. Liochev, S. I. and Fridovich, I. (1994) The role of O₂·⁻ in the production of HO·: in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 16, 29-33.
78. Loughna, P., Goldspink, G., and Goldspink, D. F. (1986) Effect of inactivity and passive stretch on protein turnover in phasic and postural rat muscles. *J Appl Physiol* 61, 173-179.

79. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
80. Miller, R. A. and Britigan, B. E. (1997) Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev* 10, 1-18.
81. Mitchell, N. S. and Cruess, R. L. (1977) Classification of degenerative arthritis. *Can Med Assoc J* 117, 763-765.
82. Mitchell, P. O. and Pavlath, G. K. (2001) A muscle precursor cell-dependent pathway contributes to muscle growth after atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 281, C1706-C1715.
83. Mittal, C. K. and Murad, F. (1977) Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 4360-4364.
84. Miu, B., Martin, T. P., Roy, R. R., Oganov, V., Ilyina-Kakueva, E., Marini, J. F., Leger, J. J., Bodine-Fowler, S. C., and Edgerton, V. R. (1990) Metabolic and morphologic properties of single muscle fibers in the rat after spaceflight, Cosmos 1887. *FASEB J* 4, 64-72.
85. Nevitt, M. C., Cummings, S. R., Lane, N. E., Hochberg, M. C., Scott, J. C., Pressman, A. R., Genant, H. K., and Cauley, J. A. (1996) Association of estrogen replacement therapy with the risk of osteoarthritis of the hip in elderly white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Arch Intern Med* 156, 2073-2080.
86. Nevitt, M. C., Lane, N. E., Scott, J. C., Hochberg, M. C., Pressman, A. R., Genant, H. K., and Cummings, S. R. (1995) Radiographic osteoarthritis of the hip and bone mineral density. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Arthritis Rheum* 38, 907-916.
87. Newman, B. and Wallis, G. A. (2002) Is osteoarthritis a genetic disease? *Clin Invest Med* 25, 139-149.
88. Nohl, H. (1994) Generation of superoxide radicals as byproduct of cellular respiration. *Ann Biol Clin (Paris)* 52, 199-204.
89. O'Sullivan, S. and Schmitz, T. (2001) Physical rehabilitation. Assessment and treatment. *F A Davis Company Philadelphia* 4th ed..
90. Ohira, M., Hanada, H., Kawano, F., Ishihara, A., Nonaka, I., and Ohira, Y. (2002) Regulation of the properties of rat hind limb muscles following gravitational unloading. *Jpn J Physiol* 52, 235-245.
91. Ojala, B. E., Page, L. A., Moore, M. A., and Thompson, L. V. (2001) Effects of inactivity on glycolytic capacity of single skeletal muscle fibers in adult and aged rats. *Biol Res Nurs* 3, 88-95.
92. Oliveria, S. A., Felson, D. T., Reed, J. I., Cirillo, P. A., and Walker, A. M. (1995) Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. *Arthritis Rheum* 38, 1134-1141.
93. Orlander, J., Kiessling, K. H., Larsson, L., Karlsson, J., and Aniansson, A. (1978) Skeletal muscle metabolism and ultrastructure in relation to age in sedentary men. *Acta Physiol Scand* 104, 249-261.

94. Otis, J. S., Roy, R. R., Edgerton, V. R., and Talmadge, R. J. (2004) Adaptations in metabolic capacity of rat soleus after paralysis. *J Appl Physiol* 96, 584-596.
95. Pastoris, O., Boschi, F., Verri, M., Baiardi, P., Felzani, G., Vecchiet, J., Dossena, M., and Catapano, M. (2000) The effects of aging on enzyme activities and metabolite concentrations in skeletal muscle from sedentary male and female subjects. *Exp Gerontol* 35, 95-104.
96. Pawlak, W., Kedziora, J., Zolynski, K., Kedziora-Kornatowska, K., Blaszczyk, J., and Witkowski, P. (1998a) Free radicals generation by granulocytes from men during bed rest. *J Gravit Physiol* 5, 131-132.
97. Pawlak, W., Kedziora, J., Zolynski, K., Kedziora-Kornatowska, K., Blaszczyk, J., Witkowski, P., and Zieleniewski, J. (1998b) Effect of long term bed rest in men on enzymatic antioxidative defence and lipid peroxidation in erythrocytes. *J Gravit Physiol* 5, 163-164.
98. Phung, C. D., Ezieme, J. A., and Turrens, J. F. (1994) Hydrogen peroxide metabolism in skeletal muscle mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 315, 479-482.
99. Powers, S. K., Kavazis, A. N., and DeRuisseau, K. C. (2005) Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288, R337-R344.
100. Radomski, M. W., Palmer, R. M., and Moncada, S. (1987) The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 92, 639-646.
101. Reznick, A. Z., Volpin, G., Ben-Ari, H., Silbermann, M., and Stein, H. (1995) Biochemical and morphological studies on rat skeletal muscles following prolonged immobilization of the knee joint by external fixation and plaster cast: a comparative study. *Eur J Exp Musculoskel Res* 4, 69-76.
102. Rice-Evans, C. A., Diplock, A. T., and Symons, M. C. (1991) *Techniques in Free Radical Research*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
103. Rosser, B. W. and Hochachka, P. W. (1993) Metabolic capacity of muscle fibers from high-altitude natives. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 67, 513-517.
104. Roth, S. and Droge, W. (1987) Regulation of T-cell activation and T-cell growth factor (TCGF) production by hydrogen peroxide. *Cell Immunol* 108, 417-424.
105. Sastry, P. S. and Rao, K. S. (2000) Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* 74, 1-20.
106. Schantz, P. G. (1986) Plasticity of human skeletal muscle with special reference to effects of physical training on enzyme levels of the NADH shuttles and phenotypic expression of slow and fast myofibrillar proteins. *Acta Physiol Scand Suppl* 558:1-62., 1-62.
107. Schatz, G. (1967) The measurement of oxidative phosphorylation in the NADH-cytochrome b segment of the mitochondrial respiratory chain. *Methods in Enzymology (red R W Estabrook, R W and Pulmann, M E)* Academic Press, New York, 10:30-33..
108. Scott, S. W. (2002) Genetics of primary generalized osteoarthritis. *Mol Genet Metab* 77, 31-34.
109. Sen, C. K., Marin, E., Kretschmar, M., and Hanninen, O. (1992) Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise, and immobilization. *J Appl Physiol* 73, 1265-1272.

110. Senger, A. (1984) Zmiany zwyrodnieniowo-zniekształcające stawów. W: Ortopedia i rehabilitacja pod red. Wiktora Degi. *PZWL Warszawa* T II, 687-695.
111. Senior, K. (2000) Osteoarthritis research: on the verge of a revolution? *Lancet* 355, 208.
112. Sharpe, M. A. and Cooper, C. E. (1998) Interaction of peroxynitrite with mitochondrial cytochrome oxidase. Catalytic production of nitric oxide and irreversible inhibition of enzyme activity. *J Biol Chem* 273, 30961-30972.
113. Shenkman, B. S., Belozeroва, I. N., Lee, P., Nemirovskaya, T. L., and Kozlovskaya, I. B. (2003) Effects of weightlessness and movement restriction on the structure and metabolism of the soleus muscle in monkeys after space flight. *Neurosci Behav Physiol* 33, 717-722.
114. Simard, C., Lacaille, M., Mercier, C., and Vallieres, J. (1985a) Enzymatic activities in slow and fast denervated old rat muscles. *Comp Biochem Physiol B* 81, 539-542.
115. Simard, C., Lacaille, M., and Vallieres, J. (1985b) Enzymatic adaptations to suspension hypokinesia in skeletal muscle of young and old rats. *Mech Ageing Dev* 33, 1-9.
116. Simoneau, J. A., Lortie, G., Boulay, M. R., Thibault, M. C., Theriault, G., and Bouchard, C. (1985) Skeletal muscle histochemical and biochemical characteristics in sedentary male and female subjects. *Can J Physiol Pharmacol* 63, 30-35.
117. Solomon, L. (1976) Patterns of osteoarthritis of the hip. *J Bone Joint Surg Br* 58, 176-183.
118. Spector, T. D., Cicuttini, F., Baker, J., Loughlin, J., and Hart, D. (1996) Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ* 312, 940-943.
119. Steffen, J. M. and Musacchia, X. J. (1984) Effect of hypokinesia and hypodynamia on protein, RNA, and DNA in rat hindlimb muscles. *Am J Physiol* 247, R728-R732.
120. Stryer, L. (1999) Biochemia. *PWN* 4th ed..
121. Talmadge, R. J., Castro, M. J., Apple, D. F., Jr., and Dudley, G. A. (2002) Phenotypic adaptations in human muscle fibers 6 and 24 wk after spinal cord injury. *J Appl Physiol* 92, 147-154.
122. Tanaka, S., Hamanishi, C., Kikuchi, H., and Fukuda, K. (1998) Factors related to degradation of articular cartilage in osteoarthritis: a review. *Semin Arthritis Rheum* 27, 392-399.
123. Threlkeld, A. J. and Currier, D. P. (1988) Osteoarthritis. Effects on synovial joint tissues. *Phys Ther* 68, 364-370.
124. Trappe, S., Trappe, T., Gallagher, P., Harber, M., Alkner, B., and Tesch, P. (2004) Human single muscle fibre function with 84 day bed-rest and resistance exercise. *J Physiol* 557, 501-513.
125. Trappe, S. W., Trappe, T. A., Lee, G. A., Widrick, J. J., Costill, D. L., and Fitts, R. H. (2001) Comparison of a space shuttle flight (STS-78) and bed rest on human muscle function. *J Appl Physiol* 91, 57-64.
126. Turrens, J. F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552, 335-344.

127. Uitterlinden, A. G., Burger, H., Huang, Q., Odding, E., Duijn, C. M., Hofman, A., Birkenhager, J. C., van Leeuwen, J. P., and Pols, H. A. (1997) Vitamin D receptor genotype is associated with radiographic osteoarthritis at the knee. *J Clin Invest* 100, 259-263.
128. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160, 1-40.
129. van Beuningen, H. M., van der Kraan, P. M., Arntz, O. J., and van den Berg, W. B. (1994) Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint. *Lab Invest* 71, 279-290.
130. van Gelder, B. and Slater, E. C. (1962) The extinction coefficient of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* 58:593-5.
131. van Saase, J. L., van Romunde, L. K., Cats, A., Vandenbroucke, J. P., and Valkenburg, H. A. (1989) Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations. *Ann Rheum Dis* 48, 271-280.
132. Wharton, D. C. and Tzagoloff, A. (1967) Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. W: Methods in Enzymology; Estabrook, R.W. and Pullman, M.E. eds. *New York: Academic Press* 10, 245-250.
133. Wierusz-Kozłowska, M. and Markuszewski, J. (2003) Choroba zwyrodnieniowa stawów. W: Wiktor Degi Ortopedia i Rehabilitacja pod red. Marciniak, W., Szulc, A. *PZWL Warszawa* T.II, 274-289.
134. Xia, R., Webb, J. A., Gnall, L. L., Cutler, K., and Abramson, J. J. (2003) Skeletal muscle sarcoplasmic reticulum contains a NADH-dependent oxidase that generates superoxide. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, C215-C221.
135. Yamashita-Goto, K., Okuyama, R., Honda, M., Kawasaki, K., Fujita, K., Yamada, T., Nonaka, I., Ohira, Y., and Yoshioka, T. (2001) Maximal and submaximal forces of slow fibers in human soleus after bed rest. *J Appl Physiol* 91, 417-424.
136. Yokoyama, Y., Beckman, J. S., Beckman, T. K., Wheat, J. K., Cash, T. G., Freeman, B. A., and Parks, D. A. (1990) Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. *Am J Physiol* 258, G564-G570.
137. Zarzhevsky, N., Menashe, O., Carmeli, E., Stein, H., and Reznick, A. Z. (2001) Capacity for recovery and possible mechanisms in immobilization atrophy of young and old animals. *Ann N Y Acad Sci* 928:212-25., 212-225.

APENDIX

Tabela I. Wyniki oznaczeń w grupie osób ze złamaniami (grupa kontrolna).

Nr	Kod pacjenta	Płeć	Wiek	Białko	LDH	H-LDH	M-LDH	MDH	mMDH	cMDH
				mg/g m.tk.	μmole NADH/min./g mokrej tkanki					
1	35TB	K	63	43,7	54,6	15,3	39,3	133,3	27,1	106,2
2	43EO	K	77	35,0	54,9	1,1	53,5	75,6	21,2	54,5
3	51DW	K	77	45,7	-	-	-	114,3	45,2	69,0
4	60KL	K	69	39,0	25,7	22,6	3,1	110,0	46,0	64,0
5	67CS	K	68	36,0	-	-	-	100,0	42,0	58,0
6	69JS	K	74	36,6	-	-	-	68,0	24,0	44,0
7	79AD	K	52	37,7	22,3	12,1	10,2	72,0	34,3	37,7
8	89WP	K	92	32,5	46,4	13,3	33,1	78,0	32,0	46,0
9	63HF	M	63	31,8	-	-	-	64,0	26,0	38,0
10	58JD	M	58	37,0	95,4	39,4	55,6	-	-	-
11	(13)WF	M	69	41,5	43,3	29,0	14,3	59,0	50,0	109,0
Razem	<i>Średnia</i>	69,3	37,9	48,9	19,0	29,9	97,4	34,8	62,6	
	SE	3,3	1,3	9,2	4,7	8,0	10,0	3,3	8,2	
	<i>n</i>	11	11	7	7	7	10	10	10	
Kobiety	<i>Średnia</i>	71,5	38,3	40,8	12,9	27,9	93,9	34,0	59,9	
	SE	4,1	1,6	7,1	3,5	9,3	8,5	3,4	7,6	
	<i>n</i>	8	8	5	5	5	8	8	8	
Mężczyźni	<i>Średnia</i>	63,3	36,8	69,4	34,2	35,0	112,0	38,0	73,5	
	SE	3,2	2,8	26,1	5,2	20,7	47,5	12,0	35,5	
	<i>n</i>	3	3	2	2	2	2	2	2	

Tabela I (cd). Wyniki oznaczeń w grupie osób ze złamaniami (grupa kontrolna).

Nr	Kod pacjenta	Płeć	Wiek	COX	SOD	SOD-1	SOD-2	CAT	-SH	MDA
				$\mu\text{mole/g}$ m.tk.	jednostki/g mokrej tkanki			$\mu\text{moleH}_2\text{O}_2/\text{min/g}$ m.tk.	$\mu\text{mole/g}$ m.tk.	nmole/g m.tk.
1	35TB	K	63	0,91	550	267	284	423	5,25	31,9
2	43EO	K	77	0,85	476	189	287	338	3,59	35,7
3	51DW	K	77	1,27	548	219	329	324	6,45	-
4	60KL	K	69	1,28	573	374	199	317	4,76	21,4
5	67CS	K	68	0,48	328	86	241	216	4,27	18,4
6	69JS	K	74	0,54	549	308	242	267	4,05	17,6
7	79AD	K	52	0,34	483	287	196	381	5,05	25,3
8	89WP	K	92	0,66	698	500	198	216	3,50	23,0
9	63HF	M	63	0,32	483	242	242	227	4,08	13,1
10	58JD	M	58	0,47	624	405	219	190	4,72	24,2
11	(13)WF	M	69	-	-	-	-	635	4,07	36,0
Razem	Średnia	69,3	0,71	531	286	244	321	4,53	24,7	
	SE	3,3	0,11	31	37	14	39	0,26	2,5	
	n	11	10	10	10	10	11	11	10	
Kobiety	Średnia	71,5	0,79	526	279	247	310	4,61	24,8	
	SE	4,1	0,13	37	44	17	26	0,35	2,6	
	n	8	8	8	8	8	8	8	7	
Mężczyźni	Średnia	63,3	0,39	554	323	230	351	4,29	24,4	
	SE	3,2	0,07	71	82	11	143	0,22	6,6	
	n	3	2	2	2	2	3	3	3	

Tabela II. Wyniki oznaczeń w grupie osób z miernym stopniem unieruchomienia (czwarty stopień - IV^o).

Nr	Kod pacjenta	Płeć	Wiek	Białko	LDH	H-LDH	M-LDH	MDH	mMDH	cMDH
				mg/g m.tk.	μmole NADH/min./g mokrej tkanki					
1	30AP	K	82	47,4				136,4	39,4	97,0
2	50EP	K	44	41,9	32,2	24,3	8,0	169,7	54,5	115,1
3	72BŁ	K	63	39,5	49,0	36,4	12,6	155,0	64,0	91,0
4	83JP	K	81	36,3	33,4	23,6	9,8	154,0	48,0	106,0
5	[4]JM	K	63	28,6	24,3	16,6	7,7	61,0	32,5	28,5
6	[5]RM	K	64	30,9				76,0	32,5	43,5
7	[7]JG	K	64	41,5	34,4	26,6	7,9	140,0	39,0	101,0
8	[8]HW	K	53	33,2	49,8	24,2	25,6	74,0	29,0	45,0
9	[9]WC	K	64	40,0	31,2	26,0	5,2	115,0	27,5	87,5
10	[11]TT	K	68	40,0				110,0	22,5	87,5
11	(12)MR	K	48	27,7	16,6	13,6	3,05	49,0	24,0	25,0
12	31SN	M	63	36,5	57,0	19,9	37,1	112,1	30,3	81,8
13	34SK	M	57	33,1	-	-	-	90,9	30,3	60,6
14	39BC	M	67	36,2	39,1	13,9	25,2	121,2	45,5	75,8
15	41TB	M	63	35,1	54,5	15,1	39,4	60,6	21,2	39,4
16	49JG	M	68	29,6	54,5	15,1	39,4	81,8	27,3	54,5
17	61PŁ	M	55	38,0	76,0	17,4	58,6	92,0	44,0	48,0
18	77WM	M	64	39,6	58,2	22,4	35,8	120,0	42,0	78,0
19	79JN	M	63	29,2	30,9	10,7	20,2	80,0	34,0	46,0
20	(1)MM	M	69	32,7	-	-	-	122,2	2,4	119,8
21	(2)ZR	M	56	38,8	50,4	27,0	23,4	155,3	68,3	87,0
22	(3)TP	M	66	29,2	101,0	39,2	61,9	150,0	36,2	113,8
23	(6 _{wz})WC	M	36	36,7	102,0	10,4	91,7	162,0	81,0	81,0
24	(11)FC	M	57	34,0	77,0	29,5	47,5	117,5	49,0	68,5
25	(14)SC	M	56	29,2	11,7	8,6	3,1	60,0	25,0	35,0

Tabela II (cd). Wyniki oznaczeń w grupie osób z miernym stopniem unieruchomienia (czwarty stopień - IV^o).

Nr	Kod pacjenta	Płeć	Wiek	COX	SOD	SOD-1	SOD-2	CAT	-SH	MDA
				$\mu\text{mole/g}$ m.tk.	jednostki/g mokrej tkanki			$\mu\text{moleH}_2\text{O}_2/$ min/g m.tk	$\mu\text{mole/g}$ m.tk.	nmole/g m.tk.
1	30AP	K	82	1,23	659	375	285	507	3,99	40,3
2	50EP	K	44	1,02	699	327	373	761	3,84	47,3
3	72BŁ	K	63	0,53	700	324	375	178	4,95	19,0
4	83JP	K	81	0,46	696	323	373	216	4,16	21,8
5	[4]JM	K	63	-	-	-	-	555	1,72	38,0
6	[5]RM	K	64	-	-	-	-	430	2,44	31,8
7	[7]JG	K	64	-	-	-	-	300	3,89	37,8
8	[8]HW	K	53	-	-	-	-	406	2,62	59,1
9	[9]WC	K	64	-	-	-	-	610	4,03	28,0
10	[11]TT	K	68	-	-	-	-	430	3,83	52,0
11	(12)MR	K	48	-	-	-	-	330	-	-
12	31SN	M	63	1,02	550	264	286	412	6,07	42,4
13	34SK	M	57	1,19	772	397	374	360	-	-
14	39BC	M	67	1,36	772	486	286	476	6,52	36,2
15	41TB	M	63	0,56	-	-	-	444	4,91	46,3
16	49JG	M	68	0,98	624	338	286	355	5,10	32,8
17	61PŁ	M	55	0,64	572	242	330	236	4,42	24,2
18	77WM	M	64	0,55	772	442	330	254	5,25	29,5
19	79JN	M	63	0,32	550	309	241	266	3,74	-
20	(1)MM	M	69	-	-	-	-	240	-	24,8
21	(2)ZR	M	56	-	-	-	-	500	4,76	26,0
22	(3)TP	M	66	-	-	-	-	760	4,08	32,0
23	(6 _{wz})WC	M	36	-	-	-	-	964	-	-
24	(11)FC	M	57	-	-	-	-	150	2,89	38,0
25	(14)CS	M	56	-	-	-	-	555	2,48	29,0

Tabela II (cd). Wyniki oznaczeń w grupie osób z miernym stopniem unieruchomienia (czwarty stopień - IV⁰).

Wyniki zbiorcze		Wiek	Białko	LDH	H-LDH	M-LDH	MDH	mMDH	cMDH
			mg/g m.tk.	μmole NADH/min./g mokrej tkanki					
Razem	Średnia	61,4	35,4	49,2	21,0	28,2	110,6	38,0	72,7
	SE	2,0	1,0	5,6	1,9	5,3	7,3	3,3	5,7
	n	25	25	20	20	20	25	25	25
Kobiety	Średnia	63,1	37,0	33,9	23,9	10,0	112,7	37,5	75,2
	SE	3,6	1,9	4,0	2,4	2,4	12,7	4,0	9,9
	n	11	11	8	8	8	11	11	11
Mężczyźni	Średnia	60,0	34,1	59,4	19,1	40,3	109,0	38,3	70,7
	SE	2,3	1,0	7,7	2,6	6,6	8,8	5,2	6,9
	n	14	14	12	12	12	14	14	14
Wyniki zbiorcze		Wiek	COX	SOD	SOD-1	SOD-2	CAT	-SH	MDA
			μmole/g m.tk.	jednostki/g mokrej tkanki			μmoleH ₂ O ₂ /min/g m.tk.	μmole/g m.tk.	nmole/g m.tk.
Razem	Średnia	61,4	0,82	670	348	322	428	4,08	35,1
	SE	2,0	0,10	26	22	14	40	0,26	2,3
	n	25	12	11	11	11	25	21	21
Kobiety	Średnia	63,1	0,81	689	337	352	429	3,55	37,5
	SE	3,6	0,19	10	13	22	52	0,31	4,1
	n	11	4	4	4	4	11	10	10
Mężczyźni	Średnia	60,0	0,82	659	354	305	427	4,57	32,8
	SE	2,3	0,13	41	34	16	59	0,37	2,2
	n	14	8	7	7	7	14	11	11

Tabela III. Wyniki oznaczeń w grupie osób z średnim stopniem unieruchomienia (trzeci stopień - III^o).

Nr	Kod pacjenta	Płeć	Wiek	Białko	LDH	H-LDH	M-LDH	MDH	mMDH	cMDH
				mg/g m.tk.	μmole NADH/min./g mokrej tkanki					
1	29HZ	K	72	38,6	36,7	8,9	27,8	109,1	39,4	69,7
2	33CW	K	79	21,0	47,8	11,5	36,3	103,0	30,3	72,7
3	38AP	K	54	36,6	61,2	18,7	42,5	124,2	51,5	72,7
4	45TT	K	69	41,8	38,9	28,0	10,9	130,3	36,4	93,9
5	54TT	K	68	39,3	28,7	22,4	6,3	93,9	30,3	63,6
6	66HB	K	71	45,9	26,6	25,7	0,9	144,0	58,0	86,0
7	75MM	K	65	35,4	24,4	10,3	14,2	64,0	24,0	40,0
8	(2 _{wz})IG	K	73	44,0	39,2	21,1	18,0	81,0	31,0	50,0
9	(3 _{wz})BM	K	70	65,2	43,7	2,6	41,1	177,0	39,0	138,0
10	(10)BA	K	73	27,7	42,7	13,6	29,1	55,0	39,0	16,0
11	44BS	M	71	50,7	42,5	29,7	12,8	184,8	60,6	124,2
12	56FS	M	70	38,7	49,6	5,4	44,2	130,3	54,5	75,8
13	71JD	M	67	43,2	72,1	35,7	36,4	86,0	22,0	64,0
14	(4)RZ	M	70	29,2	37,3	14,2	23,1	128,3	24,1	103,9
15	(7 _{wz})CP	M	74	49,0	-	-	-	139,0	32,0	107,0
16	(9 _{wz})WC	M	76	38,0	50,6	13,1	37,5	110,0	45,0	65,0
17	(12)EM	M	77	33,2	33,0	15,4	17,6	96,0	46,0	50,0
Razem	Średnia	70,5	39,9	42,2	17,3	24,9	115,1	39,0	76,0	
	SE	1,4	2,4	3,1	2,3	3,5	8,6	2,9	7,4	
	n	17	17	16	16	16	17	17	17	
Kobiety	Średnia	69,4	39,6	39,0	16,3	22,7	108,2	37,9	70,3	
	SE	2,1	3,7	3,5	2,6	4,7	11,8	3,3	10,4	
	n	10	10	10	10	10	10	10	10	
Mężczyźni	Średnia	72,1	40,3	47,5	18,9	28,6	124,9	40,6	84,3	
	SE	1,4	3,0	5,7	4,7	5,1	12,3	5,6	10,4	
	n	7	7	6	6	6	7	7	7	

Tabela III (cd). Wyniki oznaczeń w grupie osób z średnim stopniem unieruchomienia (trzeci stopień - III^o).

Nr	Kod pacjenta	Płeć	Wiek	COX	SOD	SOD-1	SOD-2	CAT	-SH	MDA
				μmole/g m.tk.	jednostki/g mokrej tkanki			μmoleH ₂ O ₂ /min/g m.tk.	μmole/g m.tk.	nmole/g m.tk.
1	29HZ	K	72	1,27	571	197	374	793	3,91	52,1
2	33CW	K	79	0,98	476	191	285	370	3,51	37,5
3	38AP	K	54	1,02	549	220	330	264	3,80	29,3
4	45TT	K	69	0,48	-	-	-	546	4,54	30,9
5	54TT	K	68	0,76	476	102	373	634	3,91	34,2
6	66HB	K	71	0,76	661	284	376	190	5,55	18,8
7	75MM	K	65	0,59	549	351	198	205	2,58	18,4
8	(2 _{wz})IG	K	73	-	-	-	-	1000	2,62	49,3
9	(3 _{wz})BM	K	70	-	-	-	-	609	-	-
10	(10)BA	K	73	-	-	-	-	482	-	-
11	44BS	M	71	1,14	698	235	463	857		56,9
12	56FS	M	70	1,82	919	501	419	381	5,32	33,8
13	71JD	M	67	0,32	403	161	242	275	5,21	25,1
14	(4)RZ	M	70	-	-	-	-	900	3,59	33,0
15	(7 _{wz})CP	M	74	-	-	-	-	1117	-	-
16	(9 _{wz})WC	M	76	-	-	-	-	305	-	-
17	(12)EM	M	77	-	-	-	-	355	2,69	26,0
Razem	Średnia	70,5	0,92	589	249	340	546	3,94	34,3	
	SE	1,4	0,14	51	39	28	71	0,30	3,3	
	n	17	10	9	9	9	17	12	13	
Kobiety	Średnia	69,4	0,84	547	224	323	509	3,80	33,8	
	SE	2,1	0,10	28	35	29	83	0,34	4,4	
	n	10	7	6	6	6	10	8	8	
Mężczyźni	Średnia	72,1	1,10	673	299	374	598	4,20	34,9	
	SE	1,4	0,43	150	103	68	131	0,64	5,8	
	n	7	3	3	3	3	7	4	5	

Tabela IV. Wyniki oznaczeń w grupie osób z całkowitym stopniem unieruchomienia (drugi stopień - II^o).

Nr	Kod pacjenta	Płeć	Wiek	Białko	LDH	H-LDH	M-LDH	MDH	mMDH	cMDH
				mg/g m.tk.	μmole NADH/min./g mokrej tkanki					
1	40MD	K	79	37,1	51,1	13,3	37,8	103,0	39,4	63,6
2	52AG	K	80	41,4	25,3	20,7	4,6	66,7	33,3	33,3
3	53EB	K	71	36,4	78,3	27,7	50,6	145,5	54,5	90,9
4	58LHT	K	78	34,5	32,4	10,3	22,0	66,9	24,3	42,6
5	73FS	K	68	32,5	36,4	19,5	16,9	60,0	22,0	38,0
6	76HK	K	60	39,0	17,1	13,6	3,5	98,0	48,0	50,0
7	87HK	K	67	41,6	-	-	-	112,0	34,0	78,0
8	(6)MS	K	75	40,7	44,4	26,0	18,3	76,0	29,0	47,0
9	42MC	M	54	34,3	25,6	6,6	19	63,6	27,3	36,4
10	47JZ	M	77	37,4	-	-	-	66,7	33,3	33,3
11	68WS	M	72	32,1	20,5	18,3	2,2	92,0	32,0	60,0
12	86ZK	M	82	26,1	47,6	25,5	22,1	-	-	-
13	(10)ZE	M	52	38,5	68,4	31,9	36,5	112,5	36,0	76,5
14	(8wz)KW	M	52	38,0	66,2	8,7	57,5	87,0	45,0	42,0
Razem	Średnia	69,1	36,4	42,8	18,5	24,3	88,4	35,2	53,2	
	SE	2,8	1,1	5,8	2,4	5,2	7,0	2,6	5,3	
	n	14	14	12	12	12	13	13	13	
Kobiety	Średnia	72,3	37,9	40,7	18,8	22,0	91,0	35,6	55,4	
	SE	2,5	1,2	7,6	2,5	6,5	10,3	4,0	7,2	
	n	8	8	7	7	7	8	8	8	
Mężczyźni	Średnia	64,8	34,4	45,7	18,2	27,5	84,4	34,7	49,6	
	SE	5,6	1,9	9,9	4,8	9,3	8,9	2,9	8,2	
	n	6	6	5	5	5	5	5	5	

Tabela IV (cd). Wyniki oznaczeń w grupie osób z całkowitym stopniem unieruchomienia (drugi stopień - II^o).

Nr	Kod pacjenta	Płeć	Wiek	COX	SOD	SOD-1	SOD-2	CAT	-SH	MDA
				$\mu\text{mole/g m.tk.}$	jednostki/g mokrej tkanki			$\mu\text{moleH}_2\text{O}_2/\text{min/g m.tk.}$	$\mu\text{mole/g m.tk.}$	nmole/g m.tk.
1	40MD	K	79	0,83	622	115	508	278	4,28	30,0
2	52AG	K	80	0,74	402	70	331	272	4,51	33,1
3	53EB	K	71	0,85	626	295	331	444	3,78	29,1
4	58LHT	K	78	0,55	506	296	210	255	3,97	
5	73FS	K	68	0,20	459	166	293	241	2,61	24,1
6	76HK	K	60	0,44	518	249	269	406	2,67	23,8
7	87HK	K	67	0,38	-	-	-	368	-	-
8	(6)MS	K	75	-	-	-	-	430	-	-
9	42MC	M	54	0,59	476	235	242	444	-	30,9
10	47JZ	M	77	0,85	550	205	345	603	-	35,2
11	68WS	M	72	0,42	476	102	374	152	-	20,3
12	86ZK	M	82	0,46	698	412	286	203	-	-
13	(10)ZE	M	52	-	--	-	-	355	3,03	27,0
14	(8wz)KW	M	52	-	-	-	-	558	-	-
Razem	<i>Średnia</i>	69,1	0,57	533	215	319	358	3,55	28,2	
	SE	2,8	0,07	29	33	26	35	0,29	1,6	
	<i>n</i>	14	11	10	10	10	14	7	9	
Kobiety	<i>Średnia</i>	72,3	0,57	522	199	324	337	3,63	28,0	
	SE	2,5	0,09	36	39	41	30	0,33	1,8	
	<i>n</i>	8	7	6	6	6	8	6	5	
Mężczyźni	<i>Średnia</i>	64,8	0,58	550	239	312	386	3,03	28,4	
	SE	5,6	0,10	52	64	30	75	-	3,2	
	<i>n</i>	6	4	4	4	4	6	1	4	

ZGODA KOMISJI ETYKI

NIEZALEŻNA KOMISJA BIOETYCZNA
DO SPRAW BADAŃ NAUKOWYCH
przy Akademii Medycznej w Gdańsku
80-210 Gdańsk ul. M. Skłodowskiej-Curie 3 a
tel. 349 10 11, 349 12 60

Gdańsk, 2000-06-29

NKEBN/620/2000

Pan

Prof. dr hab. Jerzy Popinigis
Kierownik Katedry Bioenergetyki
Akademia Wychowania Fizycznego
im. Jędrzeja Śniadeckiego
w Gdańsku – Oliwie

W odpowiedzi na pismo z dnia 16.05.2000 r. w sprawie rozszerzenia wydanej w 1994 roku zgody (*Nr TKEBN/222/94*) na prowadzenie badań dotyczących doświadczeń na mikroskopijnych próbkach mięśnia szkieletowego człowieka, pobieranych w trakcie zabiegu operacyjnego i wydanie zezwolenia na prowadzenie tych badań przez dodatkowych badaczy, to jest:

1. Katedrę i Klinikę Chirurgii Urazowej AMG – pod kierunkiem prof. dr hab. med. Jerzego Lipińskiego
2. Oddział Chirurgiczny Szpitala Wojewódzkiego w Gdańsku – pod kierunkiem dr med. Jerzego Kossaka

- Niezależna Komisja Bioetyczna do Spraw Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku na posiedzeniu w dniu 14 czerwca 2000 r. zapoznała się z ww. wnioskiem i zezwala na prowadzenie badań w jednostkach wymienionych w punktach 1 i 2 niniejszego pisma.

Do wiadomości:

1. Prof. dr hab. med. Jerzy Lipiński
Katedra i Klinika Chirurgii Urazowej AMG
2. Dr med. Jerzy Kossak
Oddział Chirurgiczny Szpitala Wojewódzkiego
w Gdańsku

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