

Konrad Szosland, Maria Bryszewska

BIOCHEMICZNE ASPEKTY POWSTAWANIA POWIKŁAŃ W CUKRZYCY

Artykuł daje przegląd najnowszej wiedzy na temat biochemicznych aspektów powstawania powikłań w cukrzycy. Szczególnie dużo uwagi poświęcono roli nieenzymatycznej glikozylacji białek w rozwoju powikłań cukrzycowych.

1. RODZAJE POWIKŁAŃ W CUKRZYCY

Przewlekłe powikłania w cukrzycy pojawiają się w późniejszym okresie choroby w postaci wyraźnie określonych zespołów klinicznych lub zmian patologicznych odpowiadających zespołom występującym w innych jednostkach chorobowych. Przez wiele lat trwania cukrzycy jej powikłania rozwijają się często bezobjawowo nawet w tych przypadkach, w których brak jest dobrego wyrównania metabolicznego. Z chwilą zaś ich klinicznego ujawnienia możliwości terapeutyczne są bardzo małe, a efekty ograniczają się jedynie do terapii objawowej. Jest to mało skuteczna walka, która z reguły kończy się niepowodzeniem, a rozwijające się powikłania doprowadzają do kalectwa.

Do głównych przewlekłych powikłań w cukrzycy zalicza się zmiany w dużych i małych naczyniach zarówno tętniczych, jak i żylnych (*angiopathia diabetica*) oraz w zakresie nerwów obwodowych (*neuropathia diabetica*). Inne powikłania narządowe dotyczące: nerek, przewodu pokarmowego, narządu ruchu, wzroku wynikają nie tylko z zaburzeń metabolicznych, ale są kompilacją tych zaburzeń; upośledzenia funkcji naczyń krwionośnych i układu nerwowego: centralnego, obwodowego, sympatycznego i parasympatycznego.

Swoiste zmiany w naczyniach włosowatych występują tam, gdzie naczynia mają błonę podstawną i dotyczą przede wszystkim włosniczek zaopatrujących nerki i narząd wzroku – prowadząc szybko do nefropatii i retinopatii cukrzycowej. Badania przeprowadzone w Stanach Zjednoczonych ujawniły, że za ok. 5000 przypadków ślepoty rocznie [39] odpowiedzialna jest retinopatia,

a 90% pacjentów z cukrzycą typu I po 15 latach choroby ma zaawansowane zmiany w siatkówce [31]. Po 20 latach trwania cukrzycy u 40–60% pacjentów rozwija się *angioretinopathia proliferativa* [31, 39] – por. tab. 1.

Tabela 1

Częstość występowania choroby małych naczyń w cukrzycy – w % [West i wsp. 1982]

Rodzaj zmiany	6 lat	20 lat
Retinopatia (łącznie)	13,9	68,6
Retinopatia proliferacyjna	0,9	12,7
Ślepota siatkówkowa	0,6	5,0
Białkomocz	20,1	31,9

Również inne zmiany, takie jak: krwawienia do ciała szklanego, zaćma, obrzęki i włóknienie plamki żółtej są powodem utraty zdolności widzenia.

Neuropatia cukrzycowa może przybierać różne formy, jako: polineuropatia obwodowa, mononeuropatia, neuropatia układu wegetatywnego. Wszystkie te zaburzenia mogą prowadzić do poważnego ograniczenia aktywności psycho-fizycznej pacjentów z cukrzycą, szczególnie typu I [24, 36, 64].

Brak jest obecnie miarodajnych danych co do częstości występowania neuropatii. Wynika to z kilku przesłanek: zbyt wysokich kosztów specjalistycznych badań neurologicznych, niemożności objęcia nimi wszystkich chorych, a także znacznego stopnia zróżnicowania obrazu klinicznego oraz trudności z opracowaniem jednolitych kryteriów diagnostycznych, które można byłoby zastosować w badaniach epidemiologicznych. Tłumaczy to duże rozbieżności w piśmiennictwie dotyczące częstości występowania neuropatii (od 5 do 90% w różnych krajach). W badaniach z terenu Polski, w których rozpoznawanie opierało się na danych klinicznych, częstość występowania tego powikłania wynosi ok. 40% [23]. Neuropatia obwodowa dotyczy głównie włókien nerwowych, przede wszystkim kończyn górnych i dolnych, upośledzając czucie powierzchniowe. Manifestuje się bólami, zniesieniem bądź ograniczeniem czucia dotyku i brakiem odruchów ścięgnistych. Wczesne uszkodzenia mogą być wykrywane jedynie przy zastosowaniu pomiaru przewodnictwa nerwowego. Tym wczesnym zmianom towarzyszy spadek poziomu mioinozytolu we włóknach, zaburzenia transportu jonów sodowych i zahamowanie czynności ATP-azy sodowo-potasowej w tkankach [86], a także nieenzymatyczna glikozylacja białek [36, 64]. W późniejszym okresie pojawiają się zmiany morfologiczne, które w przeciwieństwie do zmian wczesnych nie reagują na

inhibitory reduktazy aldozowej, czy doustne stosowanie mioinozitolu. Również i w tych przypadkach poprawa wskaźników biochemicznych nie wpływa na przebieg powikłań.

1.1. Neuropatia układu vegetatywnego

Może ona dotyczyć zarówno układu przy-, jak i współczulnego, powodując zaburzenia czynnościowe praktycznie wszystkich narządów i układów, co prowadzić może do kalectwa, a nawet stanowić o życiu chorego.

1.2. Mononeuropatia cukrzycowa

Mononeuropatia jest wynikiem zmian we włóknach nerwowych pojedynczego nerwu, np. czaszkowego, lub splotu. Z reguły objawy w postaci porażenia lub zapalenia pojawiają się nagle i praktycznie mogą dotyczyć każdego nerwu. Jednak najczęściej opisywana jest mononeuropatia nerwu twarzowego.

1.3. Nefropatia cukrzycowa

Nefropatia cukrzycowa jest jedną z głównych przyczyn zgonów chorych na cukrzycę. Pierwszym objawem rozpoczynającej się nefropatii jest białkomocz rzędu 50–200 mg/24 godz., niewykrywalny rutynowymi metodami [44]. W momencie zauważalnego białkomoczu rozpoczyna się spadek filtracji nerkowej. Zaawansowana nefropatia pod postacią zespołu nerczycowego i ze spadkiem GFR (w granicach 50 do 70%) ma gorsze rokowanie przez współistniejące nadciśnienie [53]. W tym schyłkowym okresie można jeszcze podjąć próbę przeszczepu nerki bądź przewlekłej dializy, co sprawia że 3-letni okres przeżycia dla tych chorych zwiększył się z 30 do ok. 60% [71]. Jest to jednak terapia zbyt późna i niebywale kosztowna. Szacuje się, że w USA koszty leczenia chorych na cukrzycę z powodu niewydolności nerek wynoszą 10 miliardów dol. rocznie [64].

2. BIOCHEMICZNE PODŁOŻE POWSTAWANIA POWIKŁAŃ W CUKRZICY

Głównym patofizjologicznym czynnikiem w patomechanizmie powstawania powikłań w cukrzycy jest nieprawidłowe przechodzenie substancji – przede wszystkim białkowych – ze światła naczyń do ich ścian i odkładanie się tych związków pod błoną wewnętrzną [3, 6, 28, 45, 63, 73].

Od kilkunastu lat dane napływające z licznych badań klinicznych, morfologicznych i biochemicznych dowodzą, że jedyną przyczyną powstawania

powikłań cukrzycowych jest hiperglikemia, która daje początek wszelkiego rodzaju „późnym” powikłaniom [1, 5, 9, 11, 20, 35, 39, 55, 83]. Klinicyści są zdania, że jedynie ścisła kontrola metaboliczna może zapobiec lub opóźnić występowanie powikłań [24, 39, 70]. Jednakże ostatnie doniesienia sugerują, że kiedy w cukrzycy dojdzie już do ich powstania, to poprawa wskaźników metabolicznych nie zapobiega patologicznym procesom [38, 78, 83].

Dwa główne mechanizmy tłumaczą patomechanizm powstawania powikłań, w których nadmierne stężenie glukozy powoduje trwale uszkodzenie komórek i tkanek.

2.1. Zmiana prawidłowego toru przemiany metabolicznej glukozy wewnątrz komórek

Wewnątrzkomórkowa hiperglikemia może spowodować, poprzez zmianę prawidłowego toru przemiany metabolicznej, powstanie produktów przemiany, które mogą zmieniać fizjologiczne funkcjonowanie komórek. Ten właśnie mechanizm tłumaczy np. zmiany w zakresie glikoprotein w błonie podstawnej w kłębkach nerkowych, zaburzenia w biochemicznej przemianie białka mieliny w nerwach obwodowych, nieprawidłowe wytwarzanie prostacyklin w płytkach krwi oraz zaburzenia w wydzielaniu somatomedyny i hormonu wzrostu.

Za powyższe zmiany odpowiedzialna jest przemiana glukozy w cyklu wieloalkoholowym. Ten sam mechanizm odpowiedzialny jest za powstawanie zmian w soczewce oka i włóknach nerwowych, a więc w tkankach, które nie wymagają insuliny do transportu glukozy. Konsekwencją tych zmian jest powstanie ostrej zaćmy i wczesnej polineuropatii obwodowej [17, 30]. Ta zwiększona, niefizjologiczna przemiana glukozy w cyklu wieloalkoholowym pociąga za sobą szereg innych zaburzeń, jak spadek poziomu NADPH, glutationu i mioinozytolu. Każdy z tych czynników może być już przyczyną powstawania powikłań cukrzycowych [5].

2.2. Nieenzymatyczna glikozylacja białek

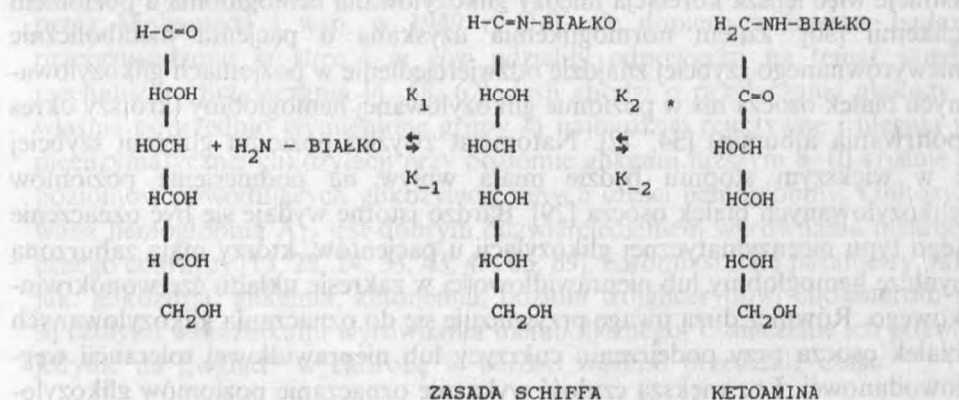
Drugim mechanizmem, który w przypadku hiperglikemii tłumaczy powstawanie powikłań w cukrzycy jest nieenzymatyczna glikozylacja białek. W tym procesie glukoza, bez udziału enzymów, przyłączana jest do białka. Trwale związki powstałe w wyniku tej reakcji gromadzą się wewnątrzkomórkowo – w przypadku komórek, które do transportu glukozy nie potrzebują insuliny lub są przyłączane do białek błon komórkowych krążących białek osocza, czy białek strukturalnych. Niewątpliwie najlepiej poznanym glikozylowanym białkiem jest hemoglobina [37, 43, 69].

Współczesne badania na temat nieenzymatycznej glikozylacji ogniskują się na AGE (*Advanced Glycosylated End – products*) [46], które powstają bardzo

powoli z wiązania ketoaminowego poprzez szereg dalszych reakcji i przegrupowań. Związki te są chemicznie bardzo trwałe i ulegają kumulacji na białkach o długim czasie półtrwania. W związku z tym należy przedstawić podobieństwa i różnice pomiędzy ketoaminami i mniej znanymi AGE. Łączącym je ogniwem jest to, iż są one ściśle związane z hiperglikemią, a ich obecność ma ścisły związek z istnieniem powikłań w cukrzycy.

2.2.1. Nienenzymatyczna glikozylacja białek o okresie półtrwania od kilku dni do kilku tygodni

Niestabilna zasada Schiffa szybko uzyskuje stały poziom odzwierciedlający *in vivo* poziom glikemii. Szybkość powstawania zasady Schiffa jest równa stałej dysocjacji (K_{-1}). Po okresie kilku tygodni, na skutek powolnego przekształcania chemicznego w zasadzie Schiffa ($K_2 = 1,6\% K_1$) pojawia się stabilny, ale chemicznie odwracalny produkt – ketoamina (por. rys. 1). Powstawanie ketoaminy nie odbywa się w „nieskończoność”, jednakże stan równowagi dynamicznej uzyskiwany jest po wielu tygodniach. Po osiągnięciu tego stanu w powstawaniu ketoaminy, mierzone jej poziomy nie wzrastają jako funkcja czasu. Najlepiej poznano tę reakcję na przykładzie hemoglobiny, jako modelu białka [13, 41, 43, 46, 72].



Rys. 1. Schemat glikozylacji białka

* – przekształcenie Amadoriego; K – stałe tworzenia

Przykładem tego typu glikozylacji jest również nienenzymatyczna glikozylacja białek osocza. Zmiany dotyczące składu białek osocza były przedmiotem licznych doniesień [15, 34, 41, 42]. Obserwowano wzrost: α_1 kwasu gliko-

proteinowego, β_2 globulin, dopełniacza C₃, C₄, fibrynogenu, immunoglobuliny A, ceruloplazminy, białka C reaktywnego, α_2 globuliny, haptoglobiny, α_1 antytrypsyny, spadek ilości prealbumin, albumin i immunoglobuliny D.

Procesowi nieenzymatycznej glikozylacji białek osocza początkowo nie poświęcano zbyt wiele uwagi. Ostatnio coraz więcej doniesień dotyczy zmian zachodzących pod wpływem glikozylacji bądź to w samych białkach, bądź w lipoproteinach [87]. Szczególnie dużo uwagi poświęca się lipoproteinom, albowiem to one w głównej mierze odpowiedzialne są za rozwój zmian miażdżycowych, powodujących u chorych na cukrzycę zwiększone ryzyko zapadalności i zachorowalności na tzw. choroby cywilizacyjne [27, 76].

W badaniach *in vitro* glikozylowane LDL ulegają znacznie większemu rozkładowi przez fibroblasty aniżeli LDL nieglikozylowane [75].

Badania przeprowadzone u chorych na cukrzycę dowodzą ścisłej współzależności między stopniem wyrównania metabolicznego (hiperglikemia) i poziomem glikozylowanego LDL oraz stopniem glikozylacji innych białek osocza [41], a także ilością glikozylowanej hemoglobiny [51]. Białka osocza ulegające nieenzymatycznej glikozylacji mogą być bardzo cennym wskaźnikiem wyrównania metabolicznego.

Nieenzymatyczna glikozylacja dotyczy wolnej lizynowej reszty białka i oznaczenie stopnia glikozylacji może przynieść szereg korzyści. Indywidualne różnice w ilości glikozylowanych białek u osób zdrowych są niewielkie [65]. Istnieje więc lepsza korelacja między glikozylowaną hemoglobina a poziomem glikemii [50]. Zatem normoglikemia uzyskana u pacjenta metabolicznie niewyrównanego szybciej znajdzie odzwierciedlenie w poziomach glikozylowanych białek osocza niż w poziomie glikozylowanej hemoglobiny (krótszy okres półtrwania albumin) [34, 77]. Natomiast zwyżka poziomu glikemii szybciej i w większym stopniu będzie miała wpływ na podniesienie poziomów glikozylowanych białek osocza [29]. Bardzo istotne wydaje się być oznaczenie tego typu nieenzymatycznej glikozylacji u pacjentów, którzy mają zaburzoną syntezę hemoglobiny lub nieprawidłowości w zakresie układu czerwono krwinkowego. Również dużą uwagę przywiązuje się do oznaczania glikozylowanych białek osocza przy podejrzeniu cukrzycy lub nieprawidłowej tolerancji węglowodanowej. I tu większą czułość wykazuje oznaczanie poziomów glikozylowanych białek osocza niż tzw. słodkiej hemoglobiny [77], która była do niedawna najlepiej poznanym glikozylowanym białkiem w ustroju ludzkim i bywa traktowana jako model wzorcowy nieenzymatycznej glikozylacji.

U dorosłych i u dzieci powyżej 6 miesiąca życia 90% hemoglobiny stanowi hemoglobina A – tetramer złożony z dwóch par polipeptydowych łańcuchów $\alpha_2\beta_2$. Pozostałe ilości hemoglobiny to: A₂ ($\alpha_2\beta_2$) i HbF tzw. płodowa ($\alpha_2\gamma_2$) stanowiące 2,0% i 0,5% ilości hemoglobiny. Za syntezę hemoglobiny odpowiedzialne są osobne geny. Inne składowe hemoglobiny nie są już

budowane pod kontrolą genów, a stanowią one potranslacyjne modyfikacje hemoglobiny A.

Badania za pomocą metod elektroforetycznych wykazały, że hemoglobina ludzka nie jest homogenną strukturą, a jest białkiem heterogennym. Pierwszym, który zwrócił na to uwagę był Allen w roku 1955 [2]. Później spostrzeżenie to potwierdzili inni badacze [16, 67]. Początkowo nie wiązano występowania pewnych frakcji hemoglobiny z cukrzycą. Dopiero badania Huismana w 1962 r. wykazały podwyższone poziomy frakcji tzw. szybkiej hemoglobiny u 4 pacjentów, u których poprzednio rozpoznawano cukrzycę [32], a w 1968 r. Rahbar potwierdził za pomocą elektroforezy obecność frakcji hemoglobiny u osób z cukrzycą [57, 59].

W świetle osiągnięć dzisiejszej nauki znany jest fakt istnienia kilku potranslacyjnych modyfikacji HbA [14]. Oznacza się je symbolami: HbA_{1a} (0,4%), A_{1b} (0,4%), A_{1c} (3%). HbA_{1a} składa się z dwóch komponentów: A_{1a1} (0,2%) i A_{1a2} (0,2%). Sekwencje aminokwasów w łańcuchach polipeptydowych są takie jak w HbA, z wyjątkiem obecności przy N-końcowej walinie łańcucha β dodatkowej cząsteczki; w przypadku HbA_{1a1} jest nią fruktozo-1,6-dwufosforan, w HbA_{1a2} glukoza-6-fosforan, w HbA_{1b} produkt dezaminacji HbA, a w HbA_{1c} glukoza.

N-końcowa walina łańcucha β i NH₂-końcowa reszta walin łańcucha α i grupy ϵ -aminowe reszt lizyny łańcuchów α i β HbA są miejscami glikozylacji hemoglobiny. Badania na temat glikozylacji *in vitro* były przeprowadzone przez Mohameda i wsp. w 1949 r. [14], ale dopiero późniejsze badania przeprowadzone *in vitro* i *in vivo* udzieliły odpowiedzi na temat samego mechanizmu przyłączania [4, 58, 62]. Jeśli chodzi o przyłączanie glukozy to właśnie poprzednio wymienione grupy są najbardziej reaktywne i ulegają już nieenzymatycznej glikozylacji przy poziomie glikemii niższym 8–10 krotnie od poziomów powodujących glikozylację innych części hemoglobiny. Glikozylowana hemoglobina A_{1c} jest dobrym odzwierciedleniem wyrównania metabolicznego cukrzycy [13, 22, 24, 35, 43, 49, 65, 69], natomiast inne parametry, takie jak: glikozuria, glikemia, ketonemia, poziom trójglicerydów, cholesterolu nie są czułymi wskaźnikami wyrównania metabolicznego. Oznaczenie ich pozwala jedynie na „wgląd” w chorobę w bardzo wąskim przedziale czasu.

2.2.2. Białka strukturalne o długim czasie przeżycia

Białka o długim czasie przeżycia – w przeciwieństwie do tych, których czas przeżycia jest krótszy – akumulują poketoaminowe glikozylowane nieenzymatycznie produkty, tzw. AGE (krzyżowo powiązane białka) [46]. Białka o długim czasie przeżycia to: krystalina, kolagen, elastyna, białka mieliny. AGE powstają bardzo powoli poprzez serię dalszych reakcji: przegrupowań i odwodnienia. Związki te są łatwo identyfikowane ze względu na ich

charakterystyczne brązowe zabarwienie, fluorescencję i współudział w sieciowaniu białek.

Ich struktura jest determinowana przez jeden końcowy produkt glikozylacji przebiegającej w warunkach fizjologicznych: 2-furoyl-4(5)-(2-furanyl)-1-M-imidazol. Powstawanie ich jest niezwykle powolne, ale w przeciwieństwie do ketoaminy, raz powstały związek jest niezwykle trwały. W wyniku tego poziom AGE wzrasta przez cały okres biologicznego życia białka w stosunku proporcjonalnym do stężenia ketoaminy. Zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* ten proces opisywany był dla bardzo wielu białek ustrojowych [8, 10, 13, 25, 26, 37, 41, 47, 52]. Jednak trudności metodologiczne były przyczyną ograniczenia doświadczeń do niektórych izolowanych białek. Rozwój technik badawczych umożliwił obserwację glikozylacji nieenzymatycznej w odniesieniu do różnych biologicznych struktur, traktowanych jako homogenaty tkankowe. Jako metody badawcze stosuje się chromatografię powinowactwa czy chromatografię wysokociśnieniową [66, 81, 88].

Jedynie ketoamina może być wykrywana rutynowymi metodami w odniesieniu do nieenzymatycznej glikozylacji. Hiperglikemia towarzysząca cukrzycy powoduje wzrost stężenia ketoaminy w różnych tkankach i jest ono bardzo podobne do stężenia tego związku sformatowanego z hemoglobiny. Dwu czy nawet trzykrotny wzrost jest widoczny w przypadku porównywania białek pobranych od chorych z cukrzycą i od osób zdrowych.

Wykrycie AGE w makromolekułach może być dokonane przy użyciu metod spektroskopowych i fluorescencyjnych, jednakże dokładna klasyfikacja i określenie specyfiki związków obecnie nie są możliwe. Ta niemożność oceny jakościowej i ilościowej produktów powstałych z ketoaminy praktycznie uniemożliwia w poszukiwaniach klinicznych określenie w przypadku białek o długim czasie przeżycia przedziału czasu, w którym miała miejsce hiperglikemia. W obecnej chwili nie ma właściwie możliwości ustalenia korelacji między całkowitą glikozylacją nieenzymatyczną a stopniem zaawansowania powikłań. Przyczyną tego stanu rzeczy jest to, iż np. wartości wczesnych glikozylowanych produktów, takich jak: glikozylowana hemoglobina czy glikozylowana błona podstawna w kłębkach nerkowych wzrastają, gdy poziomy glikemii są wysokie i ulegają normalizacji, gdy glikemia powraca do normy. Te początkowe produkty nieenzymatycznej glikozylacji: zasada Schiffa i ketoamina (produkt Amadoriego) nie ulegają kumulacji na białkach o długim czasie trwania. To właśnie tłumaczy fakt, że nie ma korelacji między stężeniem tych związków a obecnością czy stopniem zaawansowania retinopatii cukrzycowej [80].

Natomiast powstanie AGE nie zależy od poziomów glikemii i nie koreluje z nimi. Trwałe chemicznie AGE tworzą kowalentne połączenia z grupami aminowymi innych białek. Struktura chemiczna tych związków zależy w głównej mierze od przyłączenia dwóch molekuł glukozy do dwóch reszt lizynowych

grup aminowych. Kiedy już AGE stają się produktem stale związanym z białkiem, następuje ich powolne odkładanie w długo żyjących białkach ścian naczyń. Jest ono proporcjonalne do poziomów glikemii w długich przedziałach czasowych.

Liniowy wzrost kumulacji tych produktów w zależności od wieku był wykazany *in vivo* w badaniach przeprowadzonych nad kolagenem zawartym w naczyniach wieńcowych i błonie podstawnej kłębków nerkowych. Dla przykładu można podać, że brak jest np. korelacji między stężeniem zasady Schiffa i ketoaminy a występowaniem retinopatii [80], natomiast istnieje ścisły związek między podwyższonymi poziomami AGE przyłączonymi do kolagenu a zaawansowaniem zmian retinopatii cukrzycowej [48].

Zdaniem niektórych autorów hiperglikemia w cukrzycy może również powodować, iż lipidy osocza mogą być przyłączane do białka poprzez AGE, zaburzając jego fizjologiczną rolę. Potwierdzają to doniesienia, które mówią, że przy stężeniu LDL cholesterolu 2,6 mmol/l 3,2 raza więcej LDL jest przelączanych do kolagenu w przypadku obecności AGE, niż u ludzi zdrowych [12].

Również na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż zmiana procesów wewnątrzkomórkowych stymulowanych po pobudzeniu receptora makrofagów dla AGE może wywołać bądź nasilić powikłania cukrzycowe. Monocyty odgrywające istotną rolę w regulacji przemian zarówno zewnątrz, jak i wewnątrzkomórkowych białek, posiadają specyficzny receptor dla AGE – wyizolowany i dokładnie opisany [56, 82]. Receptor makrofaga reaguje nie z wczesnymi produktami glikozylacji, a jedynie z AGE. Mechanizm interakcji pomiędzy AGE i receptorem jest następujący: po pobudzeniu receptora następuje produkcja kinazy kolagenowej, ewentualnie innych proteaz wewnątrzkomórkowych oraz interleukiny 1 do wartości 5-krotnie wyższej od normy [79, 84]. Równocześnie te same enzymy rozpoczynają rozkład glikozylowanych białek w osoczu i kaskadowe zmiany zwyrodnieniowe w ścianie naczyń oraz wzrost syntezy białek. Interleukina 1 powoduje, że niektóre komórki proliferują, powodując wzrost ilości włókien kolagenowych w naczyniach. Wszystkie te czynniki, mające swój związek z AGE, zwiększają ekspresję mRNA, co może prowadzić do nowotworzenia [79].

3. CZYNNIKI DETERMINUJĄCE

ROZLEGŁOŚĆ NIEENZYMATYCZNEJ GLIKOZYLACJI

Rozległość nieenzymatycznej glikozylacji dla danego białka jest determinowana sumą różnych niezależnych zmiennych: pH, temperaturą, stężeniem białka, zawartością grup NH_2 , stężeniem glukozy, czasem inkubacji [46]. Pierwsze z 4 wymienionych czynników są dla ustroju ludzkiego względnie stałe.

In vitro pH ma istotne znaczenie – w eksperymencie obniżenie pH poniżej 7,0 powoduje całkowite zahamowanie powstawania ketoaminy, natomiast przy wzroście pH od 7,0 do 9,0 zwiększa się ilość ketoaminy [46]. Ta obserwacja pokrywa się z hipotezą, że jedynie wolne grupy aminowe w białku mogą brać udział w tego typu reakcji.

Wzrost temperatury, podobnie jak we wszystkich reakcjach chemicznych, wpływa na zwiększenie ilości ketoaminy.

Stężenie białka i ilość grup aminowych w doświadczeniach *in vivo* są wartościami stałymi. Natomiast stężenie glukozy i czas inkubacji są najważniejszymi klinicznie czynnikami; tylko one bowiem są tymi zmiennymi, które *in vivo* najbardziej mogą się różnić i odbiegać od normy. Wzrastające stężenie glukozy powoduje, że stopień akumulacji ketoaminy rośnie prawie równolegle.

Czas inkubacji ma również ogromne znaczenie i to z dwóch powodów: po pierwsze ketoamina jest kumulowana w zależności od czasu, aż do osiągnięcia stanu równowagi. Po drugie uzyskanie stanu równowagi w poziomie ketoaminy – zależnej od poziomu glikemii – nie oznacza zatrzymania tego procesu w odniesieniu do AGE. Poziom AGE może ulegać obniżeniu jedynie w przypadku biologicznego niszczenia białka – różnego ze względu na średni czas przeżycia. Konsekwencją kliniczną stałego wzrostu AGE, zależną od procesów fizjologicznych, są: tworzenie powiązanych krzyżowo związków białkowych oraz zmiany strukturalne zależne od odwodnienia i przyłączenia cząsteczek glukozy. Dla przykładu: w kolagenie chorych na cukrzycę jest znacznie więcej AGE niż w kolagenie osób zdrowych. Natomiast w grupie chorych z cukrzycą typu I zawartość AGE jest największa [47].

4. ZMIANY PROCESÓW FIZJOLOGICZNYCH PRZEZ NIEENZYMATYCZNĄ GLIKOZYLACJĘ

Nieenzymatyczna glikozylacja dotyczy praktycznie wszystkich białek ustrojowych. Nadmierne stężenie glukozy powoduje wzrost poziomu ketoaminy – dzieje się tak na przykład w białkach hemoglobiny. Natomiast relatywny wzrost poziomu AGE opisywany jest przede wszystkim dla białek o długim czasie przeżycia.

Do bardzo niedawna nie wiadano nic na temat znaczenia AGE i ketoaminy; jednak ostatnie dane pozwalają na pewne przybliżenie tego problemu.

Zaburzenia w fizjologii w przypadku hiperglikemii i konsekwencji wynikających z tego dotyczą:

- 1) aktywności enzymów,
- 2) wiązania cząsteczek regulatorowych,
- 3) krzyżowego łączenia się białek – AGE,

- 4) zmniejszonej podatności na proteolizę,
- 5) zaburzeń w zakresie działania kwasów nukleinowych,
- 6) zaburzeń w zakresie immunogenności.

4.1. Aktywność enzymów

Z podanych powyżej przesłanek można byłoby sądzić, że nieenzymatyczna glikozylacja nie powinna dotyczyć enzymów ze względu na ich krótki okres półtrwania. Jednakże powstawanie zasady Schiffa przebiega bardzo szybko w warunkach fizjologicznych, a wzrastająca jej ilość może zmieniać właściwości katalityczne. Najbardziej prawdopodobnym mechanizmem jej aktywacji jest przyłączenie glukozy do reszt lizynowych, istotnych dla prawidłowego działania części czynnej enzymu. Na przykład: w rybonukleazie A zmiany w zakresie lizyny w pozycji 45 powodują całkowitą utratę aktywności enzymatycznej. Inkubacja tego enzymu z glukozą w czasie 24 godz. powoduje także 50% utratę właściwości enzymatycznych. Związane jest to z glikozylacją dwóch reszt lizynowych w 1 molekułę [26]. Drugim rodzajem enzymu, którego aktywność jest modyfikowana przez glikozylację jest proteaza sulfhydrylowa, która posiada cystynę, a nie serynę (mniej aktywną), która kowalennie przyłącza substraty [85]. Dowodem na to jest katepsyna B wyizolowana z komórek wątroby, która po 2-tygodniowej inkubacji z glukozą o stężeniu 300 mg/dl traci całkowicie swoje właściwości enzymatyczne [19]. Podobnie i aktywność papainy spada o 70–90% po poddaniu jej nieenzymatycznej glikozylacji. Natomiast sama utrata zdolności enzymatycznych zależy od czasu inkubacji i stężenia glukozy. Po 15-dniowej inkubacji w 44,4 mmol roztworze glukozy aktywność izoenzymu A spadała do 20% początkowej wartości, jednocześnie towarzyszył jej wzrost masy cząsteczkowej ze 130 000 do 250 000 [19, 26]. Sugeruje to, że glikozylacji towarzyszą zmiany w agregacji cząsteczek i powstawanie wiązań krzyżowych – również i ten czynnik winien być rozpatrywany, jako mogący osłabiać czynność enzymatyczną.

4.2. Wiązanie cząsteczek regulatorowych

Proces ten jest inhibowany reakcją nieenzymatycznej glikozylacji, jeżeli do prawidłowego działania konieczna jest wolna reszta ϵ -aminowa lizyny lub wolna N-terminalna grupa NH_2 . Na przykład zaburzone może być przyłączanie 2,3-DPG do hemoglobiny, jeżeli jest ona glikozylowana, ponieważ 2,3-DPG wymaga wolnych grup aminowych N-terminalnej waliny, lizyny 82 i histydyny 143 łańcucha, co w rezultacie może prowadzić do zaburzonego powinowactwa tlenowego hemoglobiny [9].

4.3. Krzyżowe wiązania białek - AGE

Badania nieenzymatycznej glikozylacji wykazują, że proces ten powoduje powstanie zabarwionych, fluoryzujących, struktur powiązanych krzyżowo. Po raz pierwszy udowodniono zależność między hiperglikemią a agregacją cząsteczek oraz powstawaniem między nimi krzyżowych wiązań na krystalinie soczewki oka [60, 61]. Jej glikozylacja powodowała zmętnienie (wzrastająca glikozylacja reszt lizynowych grupy ϵ -aminowych), które tłumaczone jest jako konsekwencja zmian ciężaru cząsteczkowego i agregacji. Dodanie związków redukujących wiązania dwusiarczkowe powoduje zmniejszenie stopnia agregacji.

Te przesłanki skłaniają do wysnucia wniosku, że zmiany konformacyjne białek, zapoczątkowane przez nieenzymatyczną glikozylację, powodują później zwiększenie podatności grup sulfhydrylowych na oksydację. W warunkach fizjologicznych soczewka oka jest ochraniana przed oksydacją i tworzeniem wiązań krzyżowych między cząsteczkami białka przez wewnątrzkomórkowy układ glutationu. Na skutek zmian metabolicznych i synergistycznego działania nieenzymatycznej glikozylacji dochodzi do przekształceń patologicznych manifestujących się klinicznie zaćmą, a chemicznie powstawaniem wiązań dwusiarczkowych [18].

Rozległe tworzenie krzyżowych wiązań między cząsteczkami białka, zapoczątkowane przez hiperglikemię, może również powodować nieodwracalne zmiany w zakresie przewodnictwa nerwowego opisywanego w cukrzycy [74].

Jest rzeczą interesującą, że powstawanie krzyżowych wiązań występuje również wtedy, kiedy grupy nieenzymatycznie glikozylowanych białek wychwytują nieglikozylowane białka. Eksperymentalne dodanie albumin czy gammaglobulin IgG do glikozylowanego kolagenu, w środowisku wolnym od glukozy, powoduje przyłączanie ich do kolagenu [7]. Ta biochemiczna reakcja tłumaczy widziane linie immunofluorescencyjne w błonie wewnętrznej naczyń osób chorych na cukrzycę.

4.4. Podatność na proteolizę

Białka pogrubiałe na skutek glikozylacji błony podstawnej kłębków nerkowych są bardziej odporne na trawienie enzymami proteolitycznymi niż białka nieglikozylowane [40]. Również i proteoliza glikozylowanego kolagenu przez kolagenazę i pepsyny produkowane przez bakterie jest ograniczona [68].

4.5. Wpływ glikozylacji na kwasy nukleinowe

I-rzędowe grupy NH_2 nukleotydów są chemicznie mniej aktywne w stosunku do cukrów redukujących niż ϵ -aminowa grupa lizynowa, jednak i tu również zaobserwowano nieenzymatyczną glikozylację prowadzącą do mutacji DNA [9].

Uwzględniając długi czas trwania białka – kwasów nukleinowych – a tym samym możliwość powstawania AGE, można się spodziewać takich konsekwencji, jak: aberracja chromosomów, uszkodzenia prawidłowego łańcucha kwasów, zaburzenia procesów naprawy, replikacji i transkrypcji [33, 54]. Zmieniony przez glikozylację DNA może powodować wady powstające w okresie płodowym – podobne do tych, które wywoływane są przez czynniki mutagenne [9].

4.6. Immunogenność

Kowalentne przyłączanie się nowych związków do własnych białek ustrojowych może spowodować powstanie przeciwciał przeciwko komórkom gospodarza. Również sama ketoamina jest słabym czynnikiem immunogennym. Jej działanie immunizacyjne wzrasta, gdy powstaje *in vivo*. Dokładnych danych co do immunogenności AGE w piśmiennictwie brakuje [9].

Tabela 2

Zmiany właściwości białek pod wpływem glikozylacji [21]

Białko	Zmiana właściwości
Hemoglobina	zwiększone powinowactwo do tlenu
Białka błon erytrocytów	zwiększenie adhezji, zmniejszenie elastyczności
Albuminy	zaburzenia osmotyczne, zaburzenia w transporcie metabolitów
Lipoproteiny osocza	aterogeneza, zmiany w swoistości dla receptora LDL
Krystalina soczewki	zaburzenia w przewodnictwie światła
Kolagen	zmiana struktury tkanek
Białka mieliny	zaburzenia w przewodnictwie nerwowym
Insulina endogenna	obniżenie biologicznej aktywności
Błona wewnętrzna komórek	zaburzenia w utrzymaniu integralności komórek
Antytrombina III	nadmierna koagulacja
Ferrytyna	zaburzenie magazynowania Fe
Tkanka płucna	upośledzenie sprężystości

Szczególnie należy podkreślić, że ogromnie ważnym czynnikiem towarzyszącym nieenzymatycznej glikozylacji są zmiany dotyczące tkanki łącznej oraz

jej roli w procesie powstawania miażdżycy. Przeprowadzane badania wykazują, że LDL przy stężeniu LDL cholesterolu 1030 mg/dl są przyłączane do zglikozylowanego kolagenu w stopniu 3 razy większym niż w przypadku prawidłowego kolagenu, powodując powstawanie kumulacji lipidów w ścianach naczyń [83] – por. tab. 2.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] Alberti K. G. M. M. (1982), *Complications of diabetes*, Keen H., Jarret J. (red.), Edward Arudd (Publishers) Ltd, London, 231–270.
- [2] Allen D. W., Schroeder W. A., Balog J. (1958), *J. Amer. Chem. Soc.*, **80**, 1628–1634.
- [3] Ashton N. (1983), *Pathogenesis of diabetic retinopathy*, Thieme-Stratton: New York, 86–106.
- [4] Bartosz G. (1983), *Zagad. Biof. Współ.*, **8**, 163–180.
- [5] Brownlee M., Cerami A. (1981), *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 385–432.
- [6] Brownlee M., Cerami A., Vlassara H. (1988), *N. Engl. J. Med.*, **318**, 1315–1321.
- [7] Brownlee M., Pongor S., Cerami A. (1983), *J. Exp. Med.*, **158**, 1739–1744.
- [8] Brownlee M., Vlassara H., Cerami A. (1983), „Diabetes”, **32**, 680–684.
- [9] Brownlee M., Cerami A., Vlassara H. (1984), *Ann. Int. Med.*, **4**(101), 527–537.
- [10] Brownlee M., Vlassara H., Cerami A. (1984), „Diabetes”, **33**, 532–535.
- [11] Brownlee M., Vlassara H., Cerami A. (1987), *The pathogenetic role of nonenzymatic glycosylation in diabetic complications*, Churchill Livingstone, London, 94–139.
- [12] Brownlee M., Vlassara H., Kooney A., Urich P., Cerami A. (1986), „Diabetes”, **35**, Suppl. 29, 523^a (abstract).
- [13] Bryszewska M., Szosland K. (1988), *Clin. Biochem.*, **21**, 49–51.
- [14] Bunn H. F., Gabbay K. H. (1978), „Science”, **200**(4337), 21.
- [15] Cignarelli M., Blonda M., Cospite M. R., Damato A., Nardelli G., Giorgino R. (1983), „Diabete & metabolisme” [Paris], **9**, 272–276.
- [16] Clegg M. D., Schroeder W. A. (1959), *J. Amer. Chem. Soc.*, **81**, 6065–6069.
- [17] Clements R. S. Jr. (1982), *The role of abnormal polyol metabolism in diabetic complications*, [w:] Brodoff B. N., Bleicher S. J., (red.), *Diabetes mellitus and Obesity*, Williams and Wilkins, Baltimore, 117–128.
- [18] Cohen M. P., Van Yu-Wu (1983), „Experimental Gerontology”, **18**, 461–469.
- [19] Coradello H., Pollack A., Pugnana M., Leban J., Luben G. (1981), *IRCS Med. Sci.*, **9**, 766–767.
- [20] Cudworth A. G., Bodansky H. J., West K. M. (1982), *Genetic and metabolic factors in relationship to the prevalence and severity of diabetic complication*, [w:] Keen H., Jarret J. (red.), *Complications of Diabetes*, Edward Arnold (Publishers) Ltd, London, 1–18.
- [21] Czech A. (1986), *Pol. Tyg. Lek.*, **11**(41), 343–347.
- [22] Czech A., Tatoń J. (1983), *J. Chron. Dis.*, **11**(36), 803–810.
- [23] Czyżyk A. (1987), *Patofizjologia i klinika cukrzycy*, Rozdz. *Neuropatia cukrzycowa*, Warszawa, 413–420.
- [24] The DCCT Research Group (1986), „Diabetes”, **35**, 530–545.
- [25] Duncan B. B., Heiss G. (1984), *Amer. J. Epidem.*, **2**(120), 169–189.
- [26] Eble A. S., Thorpe S. R., Baynes J. W. (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 9506–9512.
- [27] Entmacher P. S., Krall L. P., Kranczer S. N. (1985), *DIABETES MORTALITY from vital statistic*, [w:] Marble A., Krall L. P., Bradley R. F., Chrislieb A. R.,

- Soeldner J. S. (red.), *Joslin's diabetes mellitus 12th edn.*, Lea and Febiger, Philadelphia, 278–297.
- [28] Glaser B. M., D'Amore P. A., Michels R. G., Patz A., Fenselau A. (1980), *J. Cell. Biol.*, **84**, 298–304.
- [29] Gagnoli G. (1982), „*Diabetologia*”, **22**, 222–223.
- [30] Greene D. A. (1983), „*Metabolism*”, **32**, 118–123.
- [31] Herman W. H., Teutsch S. M., Sepe S. J. et al. (1983), „*Diabetes Care*”, **6**, 608–612.
- [32] Huisman T. H. J., Dozy A. M. (1962), *J. Lab. Clin. Med.*, **60**, 302–319.
- [33] Karran P., Ormerod M. G. (1973), *Biochem. Biophys. Acta.*, **299**, 54–64.
- [34] Kennedy L., Mehl T. D., Riley W. J., Merinee T. J. (1981), „*Diabetologia*”, **21**, 94–98.
- [35] Kilo Ch. (1985), *Am. J. Med.*, **79**, (suppl. 2B), 33–37.
- [36] Kirschenbaum D. M. (1984), *Ped. Clin. North Amer.*, **3**(31), 611–621.
- [37] Koenig R. J., Cerami A. (1980), *Rev. Med.*, **31**, 29–34.
- [38] Lauritzen T., Frost-Larsen K., Larsen H. W., Deckert T. (1983), „*Lancet*”, **1**, 200–204.
- [39] Leslie N. D., Sperling M. A. (1986), *J. Ped. [St. Louis]*, **4**(108), 491–497.
- [40] Lubeck G., Polack A. (1980), *Renal. Physiol.*, **3**, 4–8.
- [41] Lyons T. J., Baynes J. W., Patrick J. S., Colwell J. A., Lopes-Viella M. F. (1986), „*Diabetologia*”, **29**, 685–689.
- [42] McMillan D. E. (1976), „*Diabetes*”, **25**, 858–864.
- [43] Miedma K., Casparie T. (1984), *Ann. Clin. Biochem.*, **21**, 2–15.
- [44] Mogensen C. E., Christensen C. K. (1984), *N. Eng. J. Med.*, **311**, 89–93.
- [45] Mogensen C. E., Steffes M. W., Deckert T., Christiansen J. S. (1981), „*Diabetologia*”, **21**, 89–93.
- [46] Monnier V. M., Cerami A. (1983), *Nonenzymatic glycosylation and browning of proteins in vivo*, [w:] Waller G. R., Feather M. S. (red.), *The Maillard Reaction in Foods and Nutrition*. American Chemical Society Symposium. Series No. 215, Washington 431–439.
- [47] Monnier V. M., Kohn R. R., Cerami A. (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 583–587.
- [48] Monnier V. M., Vishawanath V., Frank K., Elmets C. A., Dauchot P., Kohn R. R. (1986), *N. Engl. J. Med.*, **314**, 403–408.
- [49] National Diabetes Data Group (1979), *Classification of Diabetes Mellitus and Other Categories of Glucose Intolerance*, National Institutes of Health, July, Baltimore.
- [50] Ney K. A., Collay K. J., Pizzo S. V. (1981), *Annal. Biochem.*, **118**, 294–300.
- [51] Odetti P., Ansaldi E., Diara C., Cheli V., Andraghetti G., Buzzo P., Prando R. (1985), „*Diabete & Metabolisme*” [Paris], **9**, 26–31.
- [52] Papele A., Guitton J. D., Legrand Y., Favel F., Muh J. P. (1983), „*Haemostasis*”, **13**, 36–41.
- [53] Parving H. H., Andersen A. R., Smidt U. M. (1983), „*Lancet*”, **1**, 1175–1179.
- [54] Petes T. D., Farber R. A., Tarrant G. M., Holliday R. (1974), „*Nature*”, **251**, 434–436.
- [55] Pirart J. (1978), „*Diabetes Care*”, **1**, 168–188, 252–263.
- [56] Radolf S., Vlassara H., Cerami A. (1987), *Fed. Proc.*, **46**, 2116 abs.
- [57] Rahbar S. (1968), *Clin. Chim. Acta.*, **22**, 296–298.
- [58] Rahbar S. (1980–1981), *Biol. Med.*, **40**, 373–385.

- [59] Rahbar S., Blumenfeld O., Ranney H. M. (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 838-843.
- [60] Reynolds T. M. (1963), *Adv. Food. Res.*, **12**, 1-52.
- [61] Reynolds T. M. (1965), *Adv. Food. Res.*, **14**, 167-283.
- [62] Rochman H. (1980), *Ann. Clin. Lab. Science*, **2**(10), 111-115.
- [63] Ross R. (1986), *N. Engl. J. Med.*, **314**, 916-921.
- [64] Santiago J. V. (1986), *Clin. Chem.*, **32/10(B)**, 48-53.
- [65] Schleicher E. D., Gerbitz K. D., Dolhofer R., Reindl E. (1984), „*Diabetes Care*”, **6**(7), 548-556.
- [66] Schleicher E., Schleicher L., Wieland O. H. (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **99**, 1011-1019.
- [67] Schnek A. G., Schroeder W. A. (1961), *J. Amer. Chem. Soc.*, **83**, 1472-1478.
- [68] Schnider S. L., Kohn R. R. (1981), *J. Clin. Invest.*, **67**, 1630-1635.
- [69] Schwartz J. S., Clancy C. M. (1984), *Ann. Internal. Med.*, **5**(101).
- [70] Shade D. S., Santiago J. V., Skyler J. S., Rizza R. R. (1983), *Intensive Insulin Therapy*, Medical Examination Publishing Co., Inc., Princeton, New Jersey, 280-282.
- [71] Shapiro F. L., Comty C. M. (1982), *N. Engl. J. Med.*, **300**, 309-320.
- [72] Shapiro R., McManus M. J., Zalut C., Bunn H. F. (1980), *J. Biol. Chem.*, **7**(255), 3120-3127.
- [73] Shimomura H., Spiro R. G. (1987), „*Diabetes*”, **36**, 374-381.
- [74] Sidenius P. (1982), „*Diabetes*”, **31**, 356-363.
- [75] Steinbrecher U. P., Witztum J. L. (1984), „*Diabetes*”, **33**, 130-134.
- [76] Szosland K., Mroszczyk M., Chmielecki K., Loba J., Torzecka W., Chromińska D. (1981), *Pol. Tyg. Lek.*, **36**, 719-721.
- [77] Verillo A., De Teresa A., Nunziata V. (1983), „*Diabetologia*”, **24**, 391-393.
- [78] Viberti G. C., Bilous R. W., Mackintosh D., Bending J. J., Keen H. (1983), *Br. Med. J. [Clin. Res.]*, **286**, 598-602.
- [79] Vilček J. (1987), *Lab. Invest.*, **56**, 234-248.
- [80] Vishwanath V., Frank K. E., Elmets C., Dauchot P. J., Monnier V. (1986), „*Diabetes*”, **35**, 916-921.
- [81] Vlassara H., Brownlee M., Cerami A. (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5190-5192.
- [82] Vlassara H., Brownlee M., Cerami A. (1986), *J. Exp. Med.*, **164**, 1301-1309.
- [83] Vlassara H., Brownlee M., Cerami A. (1986), *Clin. Chem.*, **32/10(B)**, B37-B41.
- [84] Vlassara H., Brownlee M., Manague K., Pasagian A., Cerami A. „*Science*” – not published yet.
- [85] Wals C. (1979), *Enzymatic Reaction Mechanisms*, W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1-928.
- [86] Winegrad A., Green D. (1977), *N. Eng. J. Med.*, **26**, 760-769.
- [87] Witztum J. L., Mohoney E. M., Bronks M. J., Fisher M., Elan R., Steinberg D. (1982), „*Diabetes*”, **31**, 283-291.
- [88] Yve D. K., McLennan S., Turtle J. R. (1983), „*Diabetologia*”, **24**, 377-381.

Wpłynęło do Redakcji
„Folia biochimica et biophysica”
11.06.1991

Klinika Chorób Przewodu Pokarmowego
i Przemiany Materii
Akademii Medycznej w Łodzi
Katedra Biofizyki
Uniwersytetu Łódzkiego

BIOCHEMICAL ASPECTS OF THE DIABETIC COMPLICATIONS

The article gives the current review of the biochemical aspects of the diabetic complications. Especially much attention has been paid to a role of the non-enzymatic glycosylation of proteins in the development of the diabetic complications.

Modelowe tytuły

COMPARATIVE STUDIES OF PARAQUAT INTERACTIONS WITH FISH AND BOVINE OXY- AND DEOXYHEMOGLOBINS

In this study it has been demonstrated that in oxyhemoglobin solution paraquat undergoes a change in the course of the reaction. It was found that paraquat reacts with the protein in the solution. These differences have been experimentally confirmed. All was by differences in the mechanism and properties of hemoglobins (oxy and deoxy forms). Oxy hemoglobin exhibits the so-called Bohr effect while deoxy hemoglobin (the other deoxygenated form) is characterized by the so-called Hb effect. However, at the present stage of investigations, no explanation can account only for a small part of the effect of paraquat on hemoglobin solutions. The most important result of this study is the observation that the oxyHb solution contained in the protein is paraquat are able to convert not only into the oxyHb form but also into the deoxyHb form, which is suggested by paraquat action. The results of the study and the results of the study are discussed in the context of the available results from the study of the paraquat action on the hemoglobin solution. Such an interpretation of the observed effect is supported by the observed spectra of hemoglobin solutions, especially by spectra of oxy- and deoxy- oxyHb and deoxyHb.

1. INTRODUCTION

Paraquat (2, 2'-1, 1'-dimethyl-4, 4'-bipyridinium salt) is a powerful herbicide which shows contact and systemic activity. Mitchell and Hill [1] described in 1973 its toxic properties and found that there is a radical cation, which is a radical cation, known for chemists under the name of "methyl viologen". The reduction of the PQ molecule leads to the relatively stable cation radical. This process is related to the transfer of one of the pair of electrons from the bipyridinium group. As a result, the resonance form of the compound is created. These free radicals have a potential ability to react with oxygen (which leads probably to generation of superoxide anion radical) with the simultaneous oxidation of its own form.