INTERMEDIÁRNE A KONCOVÉ PRODUKTY NEENZÝMOVEJ GLYKÁCIE

VLADIMÍR JAKUŠ[a] a NORBERT RIETBROCK[b]

[a]*Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: Jakus@fmed.uniba.sk,* [b]*Department. of Clinical Pharmacology, Hospital of Johann Wolfgang Goethe, University, Theodor Stern--Kai 7, D-605 98 Frankfurt am Main, Germany*

Došlo dne dne 31.III.1998

Klíčové slová: neenzýmová glykácia, AGE produkty, aminoguanidín

Obsah

1. Úvod
2. Neenzýmová glykácia proteínov
   2.1. Tvorba Schiffových zásad a Amadoriho produktov
      2.1.1. Glykovaný hemoglobin
      2.1.2. Fruktozamín
   2.2. Degradácia Amadoriho produktov
      2.2.1. N^{ε}-Karboxymetyllyzín
      2.2.2. N^{ε}-Karboxymetyletanolamín
   2.3. Tvorba AGE medziproduktov a produktov
      2.3.1. Štruktúra AGE medziproduktov
         2.3.1.1. Intramolekulové a intermolekulové zosietenie proteínov
         2.3.1.2. Reaktívny intermediát 3-deoxyglukozón
         2.3.1.3. Ostatně reaktívne intermediáty
         2.3.1.4. Produkty oxidácie aminokyselin
      2.3.2. Štruktúra AGE produktov
         2.3.2.1. FFI
         2.3.2.2 AFGP
         2.3.2.3. Pyralín
         2.3.2.4. Pentozidín
         2.3.2.5. „Crossline" A a B
         2.3.2.6. Imidazolóny A a B
         2.3.2.7. GOLD a MOLD
         2.3.2.8. Vesperlyzíny A, B a C
         2.3.2.9. MRX
3. Chemické a biologické vlastnosti AGE produktov
4. Možnosti farmakologickej inhibície tvorby AGE medziproduktov a produktov
5. Záver

1. Úvod

Pre chronický diabetes mellitus sú charakteristické funkčné a štrukturálne abnormality lokalizované v očnom tkanive, v tkanive obličiek a ciev, ktoré sa klinicky prejavia až po mnohých rokoch trvania ochorenia[1-3].

Za primárny príčinný faktor zodpovedný za vývoj väčšiny diabetických komplikácií sa považuje predížená expozícia hyperglykémii.

V poslednom čase sa čoraz zrejmejšie ukazuje, že príčinami chronických diabetických komplikácií sú volné kyslíkové radikály[4-5] a neskôr heterogénne, toxické a antigénne intermediárne a koncové produkty neenzýmovej glykácie tzv. AGE (advanced glycation end products) produkty. AGE produkty s následnou tvorbou volných kyslíkových radikálov[6-7] podnecujú oxidačně poškodenie *in vivo*. Pojem AGE produkty zaviedli Cerami a Vlassara v roku 1984. Ide o komplexně aromatické zlúčeniny, ktoré sú zodpovedné za hnednutie a zosieťovanie väzieb medzi proteínmi, tzv. „crosslinks".

Zistilo sa, že AGE produkty hrajú významnú úlohu nielen v patogenéze diabetu ale aj pri ateroskleróze, ďalej pri neurodegeneratívnej tzv. Alzheimerovej chorobe[8] i fyziologickom starnutí[9]. Signifikantně patologické poškodenie môže vyplývať aj z tvorby volných kyslíkových radikálov generovaných AGE produktami[10]. Voľné kyslíkové radikály, pokiaľ nie sú eliminované prirodzenými antioxidačnými rezervami[11-12] spôsobujú zmeny v štruktúre proteínov, makrofágmi sprostredkovanú lipoperoxidáciu[13] a poškodenie DNA.

2. Neenzýmová glykácia proteínov

2.1. Tvorba Schiffových zásad a Amadoriho produktov

Pri hyperglykémii neenzýmová glykácia začína reakciou glukózy s aminoskupinou proteinu cestou nukleofilnej adície (Maillardova reakcia). To má za následok tvorbu nestabilnej Schiffovej zásady buď v aldimínovej forme s otvoreným reťazcom alebo v stabilnejšej forme s glykozylamínovým kruhom. Hladiny Schiffovej zásady stúpajú rýchle a rovnováha sa dosahuje už v priebehu 1 hodiny. Tieto štruktúry v priebehu niekoľkých týždňov ďalej prechádzajú na chemicky stabilnejšie Amadoriho produkty[14,15]:

$$\text{Glukóza} + NH_2\text{-}R \rightleftarrows \text{Schiffova zásada} \rightleftarrows$$

$$\rightleftarrows \text{Amadoriho produkt}$$

Samotné Amadoriho produkty generujú volné radikály[16-18]. Chémia Amadoriho produktov bola rozsiahle študovaná u ľudského hemoglobinu (HbA_1 a HbA_{1c}) (cit.[19]). Obsah Amadoriho produktov tvorený *in vivo* alebo *in vitro* bol určený u celého radu biologicky významných bielkovín ako sú napr. kryštalíny šošovky. Neskór sa zistilo, že glykovaný môže byť aj kolagén, keratín[20,21], elastín[22], lipoproteíny, enzýmy, DNA a najnovšie aj aminofosfolipidy biologických membrán[23]. Amadoriho produkty sa môžu takto podieľať na iniciácii a propagácii lipoperoxidácie.

2.1.1. Glykovaný hemoglobin

Zavedenie glykovaných proteínov (glykovaný hemoglobin (GHb) (cit.[24]), fruktozamín) ako markerov sledovania

a hodnotenia dlhodobej metabolickej kompenzácie poskytuje diabetologickým pracoviskám možnosť objektívne zhodnotiť úroveň starostlivosti o diabetikov. V klinickej praxi sa ukázalo, že hodnoty GHb odrážajú kvalitu kontroly krvnej glukózy v priebehu predchádzajúcich 6–8 týždňov. GHb je takto široko využívaný ako hodnotný indikátor pre dlhodobú kontrolu diabetu. GHb je aj dôležitým ukazovateľom metabolickej kompenzácie gravidnej ženy s diabetes mellitus [25-26].

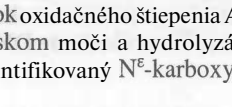
2.1.2. Fruktozamín

Meranie hladiny fruktozamínu[27] u glykovaných sérových proteínov je novším spôsobom monitorovania hladiny krvného cukru u diabetikov. V klinickej praxi sa ukázalo, že hladiny fruktozamínu odrážajú priemernú koncentráciu krvného cukru za posledně 2 až 3 týždne. Takto stanovenie fruktozamínu v sére môže spolu s GHb poskytnúť klinicky užitočnú informáciu pre detekciu a kontrolu diabetu.

2.2. Degradácia Amadoriho produktov

2.2.1. N^{ε}-Karboxymetyllyzín

Amadoriho produkty môžu byť degradované cestou ich oxidácie. Ako výsledok oxidačného štiepenia Amadoriho produktov bol *in vivo* v ľudskom moči a hydrolyzáte bielkovín ľudskej očnej šošovky identifikovaný N^{ε}-karboxymetyllyzín (CML)[28]



N^{ε}-Karboxymetyllyzín
(protein)

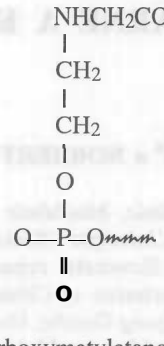
In vitro štúdie ukázali, že hydroxylový radikál generovaný z H_2O_2 účinkom Fe^{2+} iónov vedie ku tvorbe CML (cit.[29]).

CML je bezfarebná, nefluoreskujúca a nezosieťovaná chemická modifikácia proteinu. Bol navrhnutý ako všeobecný marker oxidačného stresu a poškodenia dlhožijúcich proteínov pri starnutí, ateroskleróze a diabete[30].

Pomocou imunolokalizácie sa zistilo, že CML sa v závislosti od veku hromadí v koži, pľúcach, srdci, obličkách, v črevách, v intervertebrálnych diskoch i artériach. Zvýšené hladiny CML boli nájdené aj v sérových proteínoch diabetikov a v aterosklerotických plakoch a penových bunkách. Nakoľko tvorba CML silno závisí od oxidačných podmienok, súčasne so vzrastajúcim výskytom CML v diabetickom sére a sérových proteínoch autori navrhli úlohu CML ako endogénneho biomarkera pre oxidačně poškodenie[31].

2.2.2. frř-Karboxymetyletanolamín

N^{ε}-Karboxymetylethanolamín (CME) bol navrhnutý za biomarker modifikácie fosfolipidov v priebehu Maillardovej reakcie *in vivo*[22]. CME bol zistený v membráne erytrocytov a v moči. Predpokladá sa, že CME môže byť zložkou AGE lipidov v LDL lipoproteínoch. Bol navrhnutý aj model iniciácie a propagácie peroxidácie lipidov glykáciou[33].



N^{ε}-Karboxymetyletanolamín
(lipid)

Z viacerých prác vyplýva, že ku glykácii aminofosfolipidov dochádza *in vivo* v pečeni potkanov[34] a v červených krvinkách[23]. Tento proces indukuje peroxidáciu nenasýtených vyšších karboxylových kyselin fosfolipidov. Z tohto dôvodu môže mať glykácia fosfolipidov *in vivo* vplyv na lipid-lipidové a lipid-proteínové interakcie v biologických membránach a ovplyvňovať tak biologické funkcie biomembrán. Vyššie uvedené obidve práce dávajú tak nový pohľad fyziológiu a patofyziológiu membrán buniek.

2.3. Tvorba AGE medziproduktov a produktov

U bielkovín, ktoré majú pomalú fyziologickú rýchlosť premeny (s dlhým polčasom rozpadu), podliehajú Amadoriho produkty sérii dalších reakcií

Amadoriho produkt →→→ AGE produkty

ako sú progresívna dehydratácia, kondenzácia, oxidácia a cyklizácia, ktoré za spoluúčasti volných kyslíkových radikálov vedú k následnému hnednutiu a zosieťovaniu polypeptidových reťazcov. Takto vznikom AGE produktov sa zároveň menia funkčné vlastnosti bielkovín a lipidov, čo vedie k rozvoju neskorých komplikácií diabetu.

Koncentrácia AGE produktov u diabetikov koreluje s nálezom retinopatie a nefropatie. Najvyššia hladina reaktívnych AGE produktov bola nájdená u diabetikov s chronickým zlyhaním, čo vysvetľuje zvlášť rýchly rozvoj orgánových komplikácií diabetu u týchto chorých[35-36].

2.3.1. Štruktúra AGE medziproduktov

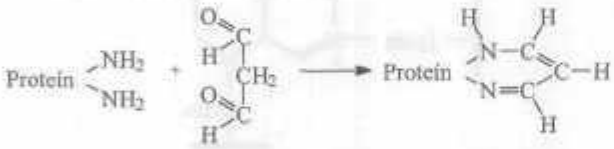
2.3.1.1, Intramolekulové a intermolekulové zosietenie proteínov

Vo vývoji pretrvávajúcich diabetických komplikácií je zahrnutý aj oxidačný stres. Viaceré práce poukazujú na zvýšenú peroxidáciu lipidov a akumuláciu malóndialdehydu (MDA) v dôsledku tvorby volných kyslíkových radikálov pri diabete[37-39]. Zistilo sa, že v erytrocytoch diabetických pacientov dochádza k peroxidácii lipidov a akumulácii reaktívnych karbonylových zlúčenín ako napr. MDA, 4-hydroxynonenal alebo 3-deoxyglukozón, a že stupeň tejto lipoperoxidácie zodpovedal stupňu hyperglykémie. Zvýšená lipoperoxidácia a akumulácia MDA môže ďalej stimulovať glykáciu proteínov

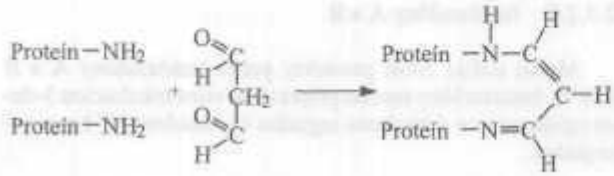
v podmienkach diabetu. Preto redukovanie oxidačného stresu môže zmenšovať diabetické komplikácie.

Reaktívne karbonylové zlúčeniny, ktoré sa izolovali pri diabete sú nielen toxické ale po reakcii s volnými aminoskupinami spósobujú zosieťovanie proteínov s následnou tvorbou krížových vázieb („crosslinks") ako intramolekulových (obr. 1), tak aj intermolekulových (obr. 2).

Tieto AGE medziprodukty sú potom menej citlivé ku katabolizmu, čo môže viesť ku akumulovaniu proteínov na stenách ciev.



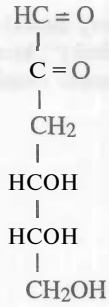
Obr. 1. **Intramolekulový „crosslink"**



Obr. 2. **Intermolekulový „crosslink"**

2.3.1.2. Reaktívny intermediát 3-deoxyglukozón

Zlúčenina 3-deoxyglukozón (3-DG) vzniká z Amadoriho produktov a patrí medzi typické fragmentačné štruktúry (reaktívne α-dikarbonylové zlúčeniny), ktoré po reakcii s volnými aminoskupinami tvoria AGE medziprodukt ako u diabetikov tak u zdravých ľudí. Pomocou fluorescenčnej spektroskopie bol analyzovaný napr. adukt 3-DG s butylamínom[40]:



3-Deoxyglukozón

3-DG bol dokázaný v diabetickom sére[41]. Možno ho stanoviť pomocou HPLC[42]. Knecht a spol.[43] detegovali 3-DG a 3-deoxyfruktózu v ľudskom moči pomocou GC/MS metódy.

2.3.1.3. Ostatně reaktívne intermediáty

Reakciami deoxyglukozónov môžu vznikat' látky ako furfural, pyranóny alebo reduktóny, ktoré reakciou s amínmi a dalšími karbonylovými zlúčeninami tvoria hnedé fluoreskujúce zlúčeniny, ktorých štruktúra ja málo známa. V prípade reakcii len s amínmi vznikajú zlúčeniny absorbujúce v UV oblasti. Sú to väčšinou bezfarebné zlúčeniny ako pyroly, pyrolinóny a pyrolinon reduktóny[15].

Pomocou fluorescenčnej spektroskopie boli analyzované adukty MDA ako i 4-hydroxynonenalu s kolagénom[44]. Pomocou NMR spektroskopie sa zistilo, že MDA tvorí s kolagénom vaskulárneho systému dihydropyridínové deriváty[45].

V kolagénových štruktúrach boli pomocou hmotnostnej spektrometrie dokázané furoylové štruktúry ako 2-furánaldehyd, 2-acetylfurán a furánglyoxál[46].

Ako potenciálny reaktívny intermediát je aj metylglyoxál, vznikajúci autooxidáciou glukózy.

2.3.1.4. Produkty oxidácie aminokyselin

Z práce[47] vyplýva, že produkty oxidácie aminokyselin vznikajúce pri glykácii kolagénu *in vitro* môžu byť možným zdrojom oxidačného stresu indukovaného AGE produktami. Konkrétne ide o hydroperoxidy dopa, *m*-tyrozínu, dityrozínu, valínu a leucínu.

Pri glykooxidácii kolagénu kože[48] vznikali metionínsulfoxid a *orto*-tyrozín ako produkty oxidácie aminokyselin, ktoré vznikali súbežne s CML a pentozidínom. Tieto indikátory slúžia na nezávislé vyhodnotenie stavu oxidačného stresu v diabete.

2.3.2. Štruktúra AGE produktov

Sledovanie AGE produktov a štúdium ich chemickej štruktúry je velmi perspektívnou cestou v diabetológii. Výskum AGE produktov prebieha dvoma smermi.

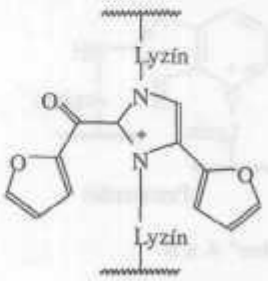
Prvý smer sa zameriava na určenie hlavnej štruktúry AGE produktov a zistenie ich prítomnosti *in vivo*.

Druhý smer sa zameriava na receptory pre AGE produkty a jeho patofyziologickú funkciu.

V priebehu posledných 15 rokov boli izolované a charakterizované viaceré AGE produkty[49-54]. Tieto produkty boli purifikované z modelových inkubácií glukózy a proteinu alebo priamo izolované z kolagénu spojivových tkanív.

2.3.2.1. FFI

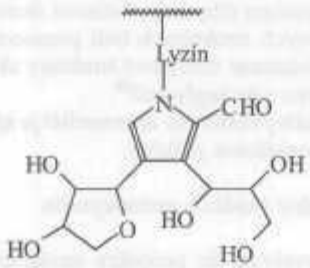
Ako prvý AGE produkt bol identifikovaný FFI (2-(2-furoyl)-4(5)-(2-furanyl)-1*H*-imidazol), ktorý je výsledkom kondenzácie dvoch od lyzínu odvodených Amadoriho produktov. Aj keď sa FFI považoval neskór za artefakt ako produkt hydrolýzy, nie je vylúčené, že štruktúry podobné FFI existujú *in vivo*, nakoľko boli dokázané anti-FFI protilátky.



FFI

2.3.2.2. AFGP

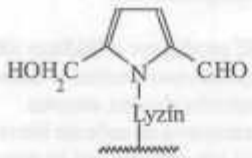
AGE produkty obsahujúce pyrolový kruh ako AFGP (1--alkyl-2-formyl-3,4-diglukozyl pyrol) a pyralín boli izolované od modelovej *in vitro* inkubačnej zmesi [50]. Súčasné imunohistochemické štúdie potvrdzujú, že tieto AGE produkty sa vyskytujú *in vivo* a akumulujú v dlhožijúcich bazálnych membránach tkanív[55].



AFGP

2.3.2.3. Pyralín

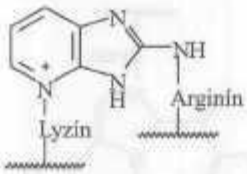
Pyralín ([ε-2-formyl-5-hydroxymetyl-pyrol-1-yl]-L-norleucín) bol identifikovaný ako hlavný AGE produkt pri reakcii 3-deoxyglukozónu (3-deoxy-D-erytro-2-hexulóza) s proteínmi[56]. *In vivo* bol dokázaný výskyt voľného i viazaného pyralínu v ľudskej uremickej plazme[57].



Pyralín

2.3.2.4. Pentozidín

Pentozidín je fluorescenčný „protein-crosslink" a glykooxidačný marker pre kumulatívne poškodenie v proteínoch v diabete, pri starnutí a urémii[58]. Pentozidín je hlavnou fluorescenčnou zosieťujúcou štruktúrou (pri excitácii/emisii 335/385, nm) vytvárajúcou sa medzi lyzínovými a arginínovými zvyškami v AGE proteínoch. Pentozidín bol detegovaný v rozličných tkanivách. Prvý krát bol izolovaný z nerozpustného kolagénu tvrdej pleny mozgu od diabetických pacientov. Pentozidín je dobre definovaná zlúčenina, ktorá sa dá pripraviť aj *in vitro* reakciou medzi arginínom, lyzínom a sacharidom (hexózou alebo pentózou).

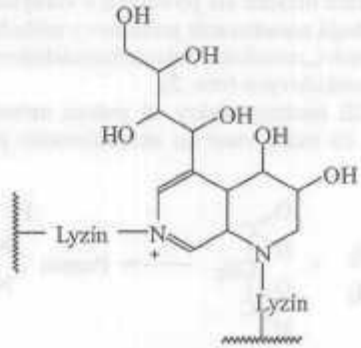


Pentozidín

2.3.2.5. „Crossline" A a B

Z reakčnej zmesi pozostávajúcej z proteinu s voľnou ε--aminoskupinou a glukózy pripraviť *in vitro* fluorescenčný AGE produkt tzv. „crossline" A resp. B.

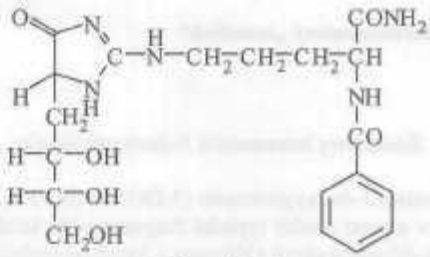
Táto zlúčenina bola dokázaná aj *in vivo*[59].



„Crossline" A

2.3.2.6. Imidazolóny A a B

Medzi ďalšie AGE produkty patria imidazolóny A a B (cit.[60]). Imidazolóny možno pripraviť *in vitro* inkubáciou 3-deoxyglukozónu s derivátom arginínu t.j. amidom N^{α}-benzoylarginínu.



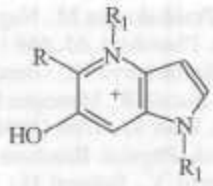
Imidazolón A

2.3.2.7. GOLD a MOLD

GOLD (glyoxál-lyzínový dimér) a MOLD (metylglyoxál-lyzínový dimér) sú „crosslinky", ktoré možno izolovať z modelových inkubačných zmesí obsahujúcich dikarbonylové zlúčeniny a proteiny[61].

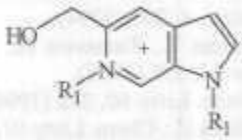
2.3.2.8. Vesperlyzíny A, B a C

Z albuminu hovädzieho séra modifikovaného glukózou bol izolovaný AGE produkt vesperlyzín A (6-hydroxy-1,4--di6-(L-norleucyl)-1*H*-pyrrol [3,2*b*]pyridín), ďalej jeho 5-metyl derivát vesperlyzín B a vesperlyzín C (5-hydroxy-metyl-1,6-di6-(L-norleucyl)-1*H*-pyrol [3,4-*b*]pyridín[54].



Vesperlyzín A
R=H
R_1: $-(CH_2)_4-CH(NH_2)COOH$

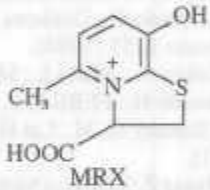
Vesperlyzín B
R= CH_3
R_1: $-(CH_2)_4-CH(NH_2)COOH$



Vesperlyzín C
R_1: $-(CH_2)_4-CH(NH_2)COOH$

2.3.2.9. MRX

Z reakčnej zmesi pozostávajúcej z albuminu hovädzieho séra a glukózy bol izolovaný takzvaný Maillardov reakčný produkt X (MRX)[62].



MRX

MRX bol izolovaný aj z modelovej inkubačnej zmesi cysteinu, arginínu a glukózy. MRX bol navrhnutý za biomarker hyperglykémie.

Mechanizmus tvorby AGE produktov nie je dosiaľ objasnený, nakoľko nie sú známe všetky ich štruktúry. Asi tretina AGE zlúčenín sa vyznačuje fluorescenciou, čo sa aj využíva pri ich stanovení pomocou fluorescenčnej spektroskopie. Ostatné AGE produkty tvoria štruktúry, ktoré majú antigénne vlastnosti.

Na detekciu antigénnych AGE produktov v ľudských a krvných vzorkách sa používa imunochemická metóda ELISA. Podľa štandardizovanej metódy bola zistená priemerná hladina AGE produktov v normálnom ludskom sére 5,0±2,2 $U.ml^{-1}$ a u diabetických pacientov 20,3±3,8 $U.ml^{-1}$ (cit.[63]).

V poslednom čase sa zvýšená pozornosť venuje aj reaktívnym nízkomolekovým AGE aduktom tzv. cirkulujúcim AGE peptidom (M < 10 kDa), ktorých zvýšené koncentrácie boli dokázané v sére a obličkách diabetikov[64]. Sú pravdepodobne výsledkom neúplného katabolizmu AGE produktov makrofágmi a ostatnými bunkami.

3. Chemické a biologické vlastnosti AGE produktov

AGE produkty boli zistené napríklad na vaskulárnych stenách, lipoproteínoch a lipidových zložkách. Vyznačujú sa chemickými a biologickými vlastnosťami, ktorých prehľad je uvedený nížšie:

Patologicky relevantně chemické vlastnosti AGE produktov

Výskyt AGE produktov v proteínoch, lipidoch a nukleových kyselinách
AGE produkty sú chemicky ireverzibilné
Tvorba AGE produktov v proteínoch vedie k zvýšenej rezistencii k tráveniu proteolytickými enzýmami
AGE produkty na lipidoch indukujú oxidáciu lipidov
AGE produkty chemicky inaktivujú NO (relaxačně faktory produkované endotelom)
AGE produkty sú vysokoreaktívne zlúčeniny spósobujúce:
- polymerizáciu bielkovín tj.tvorbu skrížených väzieb medzi polypeptidmi toho istého proteinu, napr. kolagénu
- vychytávanie neglykovaných proteínov, ako napr. Ig, LDL atď.
- inaktiváciu vychytávačov radikálov

Patologicky relevantně biologické vlastnosti AGE produktov

AGE produkty zvyšujú uvoľňovanie cytokínu a rastového faktoru z makrofágov ⇒ zvýšená proliferácia buniek a akumulácia bunečnej matrix
AGE produkty indukujú transendoteliálnu migráciu monocytov/makrofágov ⇒ zvýšená proliferácia buniek, napr. fibroblasty, bunky hladkých svalov
AGE produkty zvyšujú permeabilitu endotelových buniek ⇒ zvýšená vaskulárna priepustnosť
AGE produkty znižujú hladinu trombomodulínu ⇒ koagulopatie
AGE produkty zvyšujú koncentráciu kolagénu IV, fibronektínu, laminínu ⇒ akumulácia matrix
AGE produkty znižujú deformabilitu erytrocytov
AGE produkty aktivujú transkripčný faktor NF-kappaB
AGE produkty zvyšujú rychlosť mutácie DNA

AGE produkty poškodzujú artérie a to cestou zoslabenia cievnych stien a zvýšenia cievnej priepustnosti. AGE produkty ďalej poškodzujú mitochondrie, nukleové kyseliny a kolagén. Takzvané lipidové AGE produkty podporujú lipoperoxidáciu a môžu slúžiť dokonca aj ako marker lipoperoxidácie. Glykovaných proteínov u diabetikov pribúda minimálne 2,5 krát viacej než u zdravých. Intravenózne podávanie glykovaného Hb alebo albuminu u králikov nespdsobí žiadne zdravotné potiaže. Podávanie AGE produktov vedie k výrazným toxickým príznakom, zvlášť syndrómu vaskulárnych porúch, ako zvýšenej vaskulárnej priepustnosti, prieniku mononukleárov do extravazálneho priestoru. Podávanie AGE produktov vedie k hypertrofii obličiek s glomerulárnou i tubulárnou hypertrofiou a zhrubnutiu glomerulárnej membrány.

AGE majú priamy toxický účinok na endoteliálne bunky[65]. AGE produkty inaktivujú relaxačně faktory produkované endotelom ako *in vitro* tak *in vivo*. Na endoteliálnych bunkách sú receptory, na ktoré sa môžu viazať AGE produkty, čo vedie k ich zvýšenej permeabilite. AGE receptory sú aj na bunkách hladkých svalov, fibroblastoch, mezangiálnych bunkách, v pečeni a v T-lymfocytoch.

4. Možnosti farmakologickej inhibície tvorby AGE produtov

Nové poznatky o chémii a biológii neenzýmovej glykácie môžu viesť k významnému klinickému pokroku ako v diagnostike tak aj pri hľadaní farmakologicky účinného inhibítora tvorby

AGE produktov. Objasňovať mechanizmy inhibície tvorby AGE medziproduktov a produktov je úloha extrémne ťažká v dôsledku komplexnosti kaskádových reakcií glykácie za spoluúčasti volných kyslíkových radikálov. Dôležitá je aj volba najvhodnejšej metody na štúdium a stanovenie AGE produktov[66,67].

Glykáciu možno znížiť blokovaním volných kyslíkových radikálov antioxidantmi, ako napr. vitamínom E (cit.[68]), kyselinou α-lipoovou[69], stobadínom[70] alebo flavonoidmi[71].

Perspektívny sa zdá byť aminoguanidín[72], pyridoxamín[73], thiamín[74,75] a Schiffovezásady[76,77]. Aminoguanidín bol navrhnutý v roku 1986 ako perspektívny inhibitor tvorby AGE produktov[78].

Je známe, že aminoguanidín môže blokovať tvorbu intermediárnych a koncových produktov glykácie cestou kondenzácie s Amadoriho produktom, glukózou alebo väzbou na reaktívne karbonylové zlúčeniny vznikajúce v druhom stupni neenzýmovej glykácie[79,80]. Aminoguanidín prednostne reaguje s 3-deoxyglukozónom a výrazne redukuje tvorbu „cross-linkov" odvodených od glukózy. Aminoguanidín má antiradikálovú aktivitu a inhibuje LDL oxidáciu[81]. Zistilo sa, že eliminuje účinok volných kyslíkových radikálov vznikajúcich rádiolýzou vody[82].

Derivát aminoguanidínu - rezorcylidénaminoguanidín (RAG) má antiglykačný účinok[77] a tiež výrazný inhibičný účinok na lipoperoxidáciu v erytrocytoch[83,84].

Z látok obsahujúcich tiolovú skupinu sa antiglykačným resp. aj antioxidačným účinkom vyznačuje penicillamín[85-87], ACE inhibitor kaptopril[88,89] a α-lipoát[90].

Látky brániace vznik AGE produktov spoločne s antioxidačnou terapiou[69] môžu významne obohatiť terapiu diabetu.

5. Záver

Výsledky výskumu procesu neenzýmovej glykácie za posledné roky ukázali, že AGE produkty a volné kyslíkové radikály majú význam pri patogenéze róznych ochorení ako diabetes mellitus, Alzheimerova choroba, ateroskleróza ako i pri fyziologickom starnutí. Stále aktuálny je význam objasňovania štruktúr AGE produktov ako i hladania súvislostí medzi glykáciou proteínov a oxidačným stresom v biologických systémoch. Nemenej dôležité je tu definovanie markerov glykácie a oxidačného stresu. Objasňovanie mechanizmu tvorby AGE produktov spolu so stratégiou vývoj a a prevencie diabetických komplikácií môže v blízkej budúcnosti potenciálne viesť k úspešnej antiglykačnej terapii kombinovanej suplementáciou antioxidantmi.

LITERATÚRA

1. Brownlee M., Cerami A., Vlassara H.: N. Engl. J. Med. *318,* 1315 (1988).
2. Brownlee M.: Diabetes *43,* 836 (1994).
3. Bucala R., Vlassara H., Cerami A.: Drug Develop. Res. *32,* 77 (1994).
4. Baynes J. W.: Diabetes *40,* 405 (1991).
5. Mularkey C. J., Edelstein D., Brownlee M.: Biochem. Biophys. Res. Commun. *173,* 932 (1990).
6. Zu J., Morita J., Nishikawa, Kashimura N.: Carbohydr. Lett. *1,* 457 (1996).
7. Ortwerth B. J., Prabhakaram M., Nagaraj R. H., Linetsky M.: Photochem. Photobiol. *65,* 666 (1997).
8. Vitek M. P., Bhattacharya K., Glendening J. M., Stopa E., Vlassara H., Bucala R., Manogue K., Cerami A.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA *91,* 4766 (1994).
9. Sullivan R.: Arch. Physiol. Biochem. *104,* 797 (1996).
10. Masaki H., Okano Y., Sakurai H.: Biochem. Biophys. Res. Commun. *18,* 235 (1997).
11. Ďuračková Z.: *Voľné radikály a antioxydanty* v *medicíne (I),* str. 285. SAP, Bratislava 1998.
12. Rácz O., Ništiav F., Šipulová A., Riemerová M.: Arch. Gerontol. Geriatr. *4,* 207 (1994).
13. Matsui J., Onuma T., Tamaswa N., Suda T.: J. Diab. Complications *11,* 338 (1997).
14. Souček R.: Chem. Listy *90,* 252 (1996).
15. Obšil T., Pavlíček Z.: Chem. Listy *91,* 558 (1997).
16. Gillery P., Monboisse J. C, Maquaert F. X., Borel J. P.: Diabete Metab. *14,* 25 (1998).
17. Ceriello A.: Diabet. Med. *14,* Suppl. 3, S45 (1997).
18. Hunt J. W., Wolff S. P.: Free Rad. Res. Commun. *12-13,* 115(1991).
19. Rácz O., Vícha T., Pačin J.: *Glykohemoglobín, glykácia bielkovín a diabetes melitus,* str. 243. Osveta, Martin 1989.
20. Márová I., Záhejský J.: Acta Diabetol. *32,* 38 (1995).
21. Márová I., Záhejský J.: Cesk. Derm. *69,* 125 (1994).
22. Baydanoff S., Konova E., Dosheva I., Dorowski P.: Glycosylation Disease *1,* 53 (1994).
23. Ravandi A., Kuksis A., Marai L., Myher J. J., Steiner G., Lewisa G., Kamido H.: FEBS Lett. *381,11* (1996).
24. Trivelli L. A., Ranney H. M., Lai H. T.: N. Engl. J. Med. *284,* 353 (1971).
25. Weisman A., Hagay Z.: Diabetes Metab. Rev. *10,* 45 (1994).
26. Matti P., Zardini E., Brunn E., Moghetti P., Fornale M., Padovani E. M.: Minerva Ginecol. *49,* 73 (1997).
27. Johnson R. N., Metcalf P. A., Baker J. K.: Clin. Chim. Acta 727, 87(1983).
28. Ahmed M. U., Thorpe S. R., Baynes J. W.: J. Biol. Chem. *261,* 4889 (1986).
29. Nagai R., Ikeda K., Higashi T., Sano H., Jinnouchi Y., Araki T., Horiuchi S.: Biochem. Biophys. Res. Commun. *234,* 167 (1997).
30. Fu M., Requena J. R., Jenkins A. J., Lyons T. J., Baynes J. W., Thorpe S. R.: J. Biol. Chem. *271,* 9982 (1996).
31. Schleicher E. D., Wagner E., Nerlich A. G.: J. Clin. Invest. *99,* 457 (1997).
32. Requena J. R., Ahmed M. U., Fountain C. W., Degenhardt T. P., Reddy S., Perez C, Lyons T. J., Jenkins A. J., Baynes J. W., Thorpe S. R.: J. Biol. Chem. *272,* 17479 (1997).
33. Hicks M., Delbridge L., Yue D. K., Reeve T. S.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 757, 649 (1988).
34. Pamplona R., Bellmunt M. J., Portero M., Riba D., Prat J.: Life Sci. *57,* 873(1995).
35. Holeček V., Racek J.: Klin. Biochem. Metab. *3,* 18 (1995).
36. Racek J., Eiselt J., Holeček V., Veselá E., Krejčová L, Třeška V., Opatrný K., Valenta J.: Biochem. Metab. *5,* 92 (1997).
37. Sato Z., Hotta N., Sakamoto N., Matsuoka S., Ohishi N., Yagi K.: Biochem. Med. *21,* 104 (1979).
38. Noberasco G., Odetti P., Boeri D., Maiello M., Adezati L.: Biomed. Pharmacother. *45,* 193 (1991).
39. Jain S. K., Mc Vie W., Duett J., Herbst J. J.: Diabetes *38,* 1539 (1989).

40. Hayase F., Hinuma H., Asano M., Kato H., Arai S.: Biosci. Biotech. Biochem. *58,* 1936 (1994).
41. Niwa T., Takeda., Yoshizumi H., Tatematsu, Ohara M., Tomiyama S., Niimura K.: Biochem. Biophys. Res. Commun. *196,* 837 (1993).
42. Fujii E., Iwase H., Ishii-Karakasa I., Yajima Y., Hotta K: J. Chromatogr. B *660,* 265 (1994).
43. Knecht K. J., Feather M. S., Baynes J. W.: Arch. Biochem. Biophys. *294,* 120 (1994).
44. Odetti P., Pronzato M. A., Noberasco G., Cosso L., Traverso N., Cottalasso D., Marinari U. M.: Lab. Invest. *70,* 61 (1994).
45. Slatter D. A., Murray M., Bailey A. J.: FEBS Lett. 427, 180(1998).
46. Lapolla A., Fedele D., Seraglia R., Traldi P.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 5, 527 (1991).
47. Fu S., Fu M., Baynes J. W., Thorpe S. R., Dean R. T.: Biochem J. *330,* 233 (1998).
48. Wells-Knecht M. C, Lyons T. J., Mc Cance D. R., Thorpe S. R., Baynes J. W.: J. Clin. Invest. 700, 839 (1997).
49. Pongor S., Ulrich P. C, Benesath F. A., Cerami A.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA *81,* 2684 (1984).
50. Njoroge F. G., Sayre L. M., Monnier V. M.: Carbohydr. Res. 167,211(1987).
51. Farmar J., Ulrich P., Cerami A.: J. Org. Chem. *53,* 2346 (1988).
52. Sell D. R., Monnier V. M.: J. Biol. Chem. *264,* 21597 (1997).
53. Nakamura K., Haegawa T., Fukunaga ¥., Ienaga K.: J. Chem. Soc. Chem. Commun. *14,* 992 (1992).
54. Nakamura K., Nakazawa Y., Ienaga K.: Biochem. Biophys. Res. Commun. *232,* 227 (1997).
55. Hayase F., Nagaraj R., Miyata S., Njoroge S., Monnier V. M: J. Biol. Chem. *263,* 3758 (1989).
56. Portero-Otin M., Nagaraj R. H., Monnier V. M.: Biochim. Biophys. Acta 7247, 74 (1995).
57. Odani H., Shinzato T., Matsumoto Y., Takai I., Nakai S., Miwa M., Iwayama N., Amano L, Maeda K.: Biochem. Biophys. Res. Commun. *224,* 237 (1996).
58. Sell D. R., Nagaraj R. H., Grandhee S., Odetti P., Lapolla A., Fogarty J., Monnier V. M.: Diabetes/Metab. Rev. *7,* 239(1991).
59. Obayashi H., Nakano K., Shigeta H., Yamaguchi M., Yoshimori K., Fukui M., Fujii M., Kitagawa Y., Nakamura K., Nakazawa Y., Ienaga K., Ohta M., Nishimura M., Fukui I., Kondo M.: Biochem. Biophys. Res. Commun. *226,* 37 (1996).
60. Niwa T., Katsuzaki T., Miyazaki S., Miyazaki T., Ishizaki Y., Hayase F., Tatemichi N., Takei Y.: J. Clin. Invest. *99,* 1272 (1997).
61. Wells-Knecht K. J., Brinkmann E., Wells-Knecht M. C, Litchfield J. E., Ahmed M. U., Reddz S., Zyzak D. V., Thorpe S. R., Baynes J. W.: Nephrol. Dial. Transplant 77, 41 (1996).
62. Oya T., Kumon H., Kobayashi H., Akiba M., Hosokawa T., Kakimoto N., Nakamura K., Morimitsu Y., Osawa T.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 246, 267 (1998).
63. Mitsuhashi T., Vlassara H., Founds H.W., Li Y. M.: J. Immunol. Methods *207,* 79 (1997).
64. Gugliucci A., Menini T.: Life Sci. *62,* 2141 (1998).
65. Bauer V., Gergeľ D.: Bratislav. Lek. Listy *95,* 243(1994).
66. Deyl Z., Mikšík I.: J. Chromatogr. B *699,* 287 (1997).
67. Mikšík L, Deyl Z.: J. Chromatogr. A *698,* 369 (1997).
68. Jain S. K., Palmer M.: Free Radical Biol. Med. *22,* 593 (1997).
69. Packer L.: Diabetologia *36,* 1212 (1993).
70. Štefek M., Drozdíková I., Vajdová K.: Acta Diabetol. *33,* 35 (1996).
71. Vertommen J., Van den Enden M., De Leeuw I.: Phytoterapy Res. *8,* 430 (1994).
72. Hou F. F., Boyce J., Chertow G. M., Kay J., Owen W. F. Jr.: J. Am. Soc. Nephrol. 9, 277 (1998).
73. Booth A. A., Khalifah R. G., Todd P., Hudson B.: J. Biol. Chem. *272,* 5430 (1997).
74. Booth A. A., Khalifah R. G., Hudson B. G.: Biochem. Biophys. Res. Commun. *220,* 113 (1996).
75. La Selva M., Beltramo E., Pagnozzi F., Bena E., Molinatti P. A., Porta M.: Diabetologia *39,* 1263 (1996).
76. Onuska K. D., Lahitová N., Čársky J.: Toxicol. Environ. Chem. *57,* 163 (1996).
77. Jakuš V., Čársky J., Fuhr U., Štefek M.: Diabetes Stoffwechsel *6,* Suppl. *3,* 16 (1997).
78. Brownlee M., Vlassara H., Kooney A., Ulrich P., Cerami A.: Science *232,* 1629 (1986).
79. Al-Abed Y., Bucala R.: Chem. Res. Toxicol. *10,* 875 (1997).
80. Requena J. R., Vidal P., Cabezas-Cerrato J.: Diabet. Res. Clin. Pract. *19,* 23 (1993).
81. Menzel E. J., Sobal G., Staudinger A.: Biofactors *6,* 111 (1997).
82. Lisfi D., Jore D., Bonnefont-Rousselot D., Delattre J., Belaraj A., Gardes -Albert M.: J. Chim. Phys. *94,* 283 (1997).
83. Jakuš V., Hrnčiarová M., Čársky J., Krahulec B., Rietbrock N.: Life Sci. 1998 - tlači.
84. Hrnčiarová M., Čársky J., Jakuš V., Zlatoš L.: Bratislav. Lek. Listy *99,* 364(1998).
85. McPherson J. D., Shilton B. H., Walton D. J.: Biochemistry *27,* 1901 (1988).
86. Jakuš V., Keita Y., Stay E., Rietbrock N.: Eur. J. Clin. Pharmacol. *47,* 103 (1994).
87. Keita Y., Michailova M., Kratzer W., Wörner G., Wörner W., Rietbrock N.: Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol. *30,* 441 (1992).
88. Jakuš V., Fuhr U., Rietbrock N.: Eur. J. Clin. Pharmacol. *47,* A103 (1994).
89. Wörner W., Jakuš V., Fuhr U.: Diabetes Stoffwechsel 5, 135 (1996).
90. Suzuki Y. J., Tsuchiya M., Packer L.: Free Radic. Res. Commun. 77, 211 (1992).

V. Jakuš[a] and N. Rietbrock[b] *("Institute of Medical Chemistry, Biochemistry and Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic, [b]Department of Clinical Pharmacology, Hospital of J. W. Goethe University, Frankfurt/Main, Federal Republic of Germany):* **Intermediate and Final Products of Nonenzymatic Glycation**

Recent experimental findings suggest that free oxygen radicals and AGEs may be significantly involved in the development of chronic diabetic complications. The present review summarizes the knowledge of problems of nonenzymatic protein glycation and the importance of early and advanced glycation end products. Chemical and biological properties of advanced glycation end products are discussed. The strategy of influencing the development and prevention of diabetic complications in the near future include a potential successful antiglycation therapy and supplementation by antioxidants.