

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej

Urszula Grudzień

Stres oksydacyjny u kobiet w ciąży powikłanej cukrzycą

Praca doktorska

Promotor: Dr hab. n. med. Bogdan Solnica, prof. UJ

Pracę wykonano w Zakładzie Diagnostyki Katedry Biochemii Klinicznej UJCM

Kierownik Zakładu: Dr hab. n. med. Bogdan Solnica, prof. UJ

Kraków, 2015

*Serdeczne podziękowania pragnę złożyć na ręce
Pana dr hab. n. med. Bogdana Solnicy Prof. UJ –
Promotora niniejszej pracy,
za nieocenioną pomoc, merytoryczne wsparcie,
ogromną cierpliwość oraz motywację.*

Niniejszą Rozprawę Doktorską dedykuję mojemu mężowi Pawłowi

Spis treści

1. Wykaz skrótów.....	5
2. Wstęp.....	7
2.1 Hiperglikemia w ciąży.....	7
2.2 Stres oksydacyjny.....	10
2.3 Stres oksydacyjny w ciąży.....	14
2.4 Stres oksydacyjny w cukrzycy.....	16
3. Założenia i cel pracy.....	19
4. Materiał i metody.....	20
4.1 Charakterystyka badanych grup.....	20
4.2 Pobieranie i zabezpieczanie materiału do badań.....	22
4.3 Metodyka badań laboratoryjnych.....	23
4.3.1 Oznaczanie całkowitej zdolności redukcyjnej osocza FRAP (<i>Ferric reducing ability of plasma, ferric reducing antioxidant power</i>).....	23
4.3.1 Oznaczanie aktywności peroksydazy glutationowej w osoczu.....	24
4.3.2 Oznaczanie aktywność reduktazy glutationowej w osoczu.....	25
4.3.3 Oznaczanie stężenia zredukowanego glutationu w hemolizacie krwinek czerwonych.....	27
4.3.4 Pozostałe badania biochemiczne i immunochemiczne.....	27
4.4 Analiza statystyczna.....	30
5. Wyniki.....	31
6. Dyskusja.....	46
7. Wnioski.....	54
8. Piśmiennictwo.....	55
9. Spis Tabel.....	69
10. Spis Rysunków.....	71
11. Streszczenie.....	72
12. Abstract.....	74

1. Wykaz skrótów

AGEs	- końcowe produkty zaawansowanej glikacji (<i>advanced glycation endproducts</i>)
ALEs	- końcowe produkty lipooksydacji (<i>lipoperoxidation end-products</i>)
AOPP	- zaawansowane produkty utleniania białek (<i>advanced oxidation protein products</i>)
ATP	- adenozynotryfosforan
BMI	- wskaźnik masy ciała (<i>body mass index</i>)
BSA	- surowicza albumina wołowa (<i>bovine serum albumin</i>)
CRP	- białko C-reaktywne
EDTA	- kwas etylenodiaminotetraoctowy
FRAP	- całkowity potencjał redukcyjny osocza – zdolność osocza do redukcji żelaza (<i>ferric reducing ability of plasma</i>)
GAPDH	- dehydrogenaza gliceraldehydo-3-fosforanu
GDM	- cukrzyca ciążowa (<i>gestational diabetes mellitus</i>)
GPX	- peroksydaza glutationowa
GR	- reduktaza glutationowa
GSH	- zredukowana forma glutationu
GSSG	- dwusiarczek glutationu - utleniona forma
hsCRP	- wysokoczuła metoda oznaczania białka C-reaktywnego
IFN γ	- interferon gamma
IL-6	- interleukina 6
IL-8	- interleukina 8
MDA	- malonyldialdehyd
NADP	- fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego - postać utleniona
NADPH	- fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego - postać zredukowana

NF-κB	- czynnik transkrypcyjny kappa B
OGTT	- doustny test tolerancji glukozy (<i>oral glucose tolerance test</i>)
PDGF	- płytkopochodny czynnik wzrostu (<i>Platelet-derived growth factor</i>)
PGDM	- cukrzyca przedciążowa (<i>pregestational diabetes mellitus</i>)
RAGE	- receptor końcowych produktów zaawansowanej glikacji (<i>AGE-Receptor</i>)
RFT	- reaktywne formy tlenu
SOD	- dysmutaza ponadtlenkowa
TCF7L2	- czynnik transkrypcyjny 7L2 (transcription factor 7L2)
TPTZ	- tripirydylo-triazyna

2. Wstęp

2.1 Hiperglikemia w ciąży

Hiperglikemia występująca w ciąży to jedno z kilku głównych powikłań dotyczących kobiety przed porodem. Liczba rozpoznanych przypadków cukrzycy u ciężarnych stale wzrasta, głównie w związku ze zwiększeniem się u lekarzy ginekologów oraz samych pacjentek świadomości konsekwencji, jakie towarzyszą nieleczonej hiperglikemii w ciąży. Częstość występowania hiperglikemii w ciąży szacuje się na 1-14% w zależności od badanej populacji i przyjętych kryteriów diagnostycznych. Zgodnie z danymi z 2002 roku w populacji polskiej wynosiła ona około 3% [1]. Obecnie częstość rozpoznawania tego zaburzenia sięga ponad 5 % ciężarnych [2, 3]. Związane jest to z rozpowszechnieniem wiedzy na temat niekorzystnych skutków nieleczonej cukrzycy, zmianą kryteriów diagnostycznych oraz modelu postępowania z choroą w ciąży. Niezwłocznie po potwierdzeniu ciąży, należy wykonać pomiar stężenia glukozy w osoczu na czczo oraz przeprowadzić pełny wywiad w kierunku obecności czynników ryzyka wystąpienia hiperglikemii w ciąży, do których należą: wielokrotne porody, wiek >35 lat, urodzenie dziecka z wadą rozwojową, zgony wewnątrzmaciczne, urodzenie dziecka ważącego powyżej 4500 gramów, nadciśnienie tętnicze, otyłość przed ciążą (BMI >27 kg/m²), rozpoznanie cukrzycy ciążowej w poprzedniej ciąży oraz wywiad rodzinny w kierunku cukrzycy typu 2 [4, 5].

Hiperglikemia u kobiety ciężarnej może występować jako cukrzyca przedciążowa (PGDM, pregestational diabetes mellitus), gdy w ciążę zachodzi kobieta chorująca na cukrzycę dowolnego typu oraz jako hiperglikemia po raz pierwszy rozpoznana w trakcie ciąży. Aktualnie obowiązujące kryteria rozpoznania i klasyfikacji hiperglikemii po raz pierwszy rozpoznanej w ciąży wyróżniają dwie jej postacie: cukrzyca w ciąży i cukrzyca ciążowa (GDM, gestational diabetes mellitus) [6]. Kryteria rozróżniania obu schorzeń, obejmujące stężenie glukozy w osoczu krwi żyłnej na czczo oraz w doustnym teście tolerancji glukozy (OGTT, oral glucose tolerance test), a także wartości glikemii przygodnej zostały przedstawione w Tabeli 1.

Tabela 1. Kryteria klasyfikacji i rozpoznania cukrzycy po raz pierwszy wykrytej w ciąży [4]. Do rozpoznania wystarczy uzyskanie jednego wyniku spełniającego kryteria.

Cukrzyca w ciąży		Cukrzyca ciążowa	
Test	Wartości odcięcia	Test	Wartości odcięcia
Glikemia na czczo	$\geq 7,00$ mmol/l [≥ 126 mg/dl] - dwukrotnie	Glikemia na czczo w OGTT	5,1-6,9 mmol/l [92-125 mg/dl]
Glikemia w 2 godz. 75 g. OGTT	$\geq 11,1$ mmol/l [200 mg/dl]	Glikemia w 1 godz. 75 g. OGTT	$\geq 10,0$ mmol/l [≥ 180 mg/dl]
Glikemia przygodna	$\geq 11,1$ mmol/l [200 mg/dl]	Glikemia w 2 godz. 75 g. OGTT	8,5-11,0 mmol/l [153-199 mg/dl]

W przypadku ujawnienia w pierwszym trymestrze ciąży zwiększonego ryzyka wystąpienia nietolerancji glukozy u przyszłej matki, należy niezwłocznie wykonać OGTT, nawet przy prawidłowym wyniku oznaczenia stężenia glukozy na czczo. Jeżeli wyniki stężenia glukozy w obu punktach czasowych testu (na czczo oraz 2 godziny od spożycia 75 gramów glukozy) będą prawidłowe, ciążarną należy pouczyć o dalszej diagnostyce między 24 a 28 tygodniem ciąży [4]. OGTT należy wykonać już w pierwszym trymestrze ciąży u każdej kobiety z grupy ryzyka oraz gdy stężenie glukozy na czczo będzie się mieścić w przedziale 5,1-6,9 mmol/l (92-125 mg/dl). Jeśli stężenie glukozy na czczo w pierwszym trymestrze ciąży mieści się w przedziale wartości referencyjnych, a kobieta nie należy do grupy ryzyka hiperglikemii w ciąży, należy u takiej pacjentki wykonać OGTT między 24 a 28 tygodniem ciąży [4].

W przypadku rozpoznania cukrzycy w ciąży lub cukrzycy ciążowej, kobieta zostaje objęta interdyscyplinarną opieką lekarską, mającą na celu optymalizację leczenia cukrzycy, edukację, kontrolę funkcji tarczycy, czynności nerek, narządu wzroku oraz ciśnienia tętniczego. Celem takiego postępowania jest przeciwdziałanie niekorzystnym skutkom hiperglikemii, w tym zmniejszenie ryzyka powikłań zarówno u matki jak i rozwijającego się płodu. Nieleczona cukrzyca wikłająca ciążę może prowadzić do szeregu powikłań położniczych. U ciążarnych z nieleczoną bądź nieprawidłowo leczoną cukrzycą zwiększa się prawdopodobieństwo poronienia i częściej występuje nadciśnienie tętnicze, które może

prowadzić do rozwinięcia się stanu przedrzucawkowego. Zwiększa się ryzyko wystąpienia niewspółmierności (dystocji) barkowej oraz konieczności wykonania cięcia cesarskiego [7]. U dzieci zwiększa się ryzyko wystąpienia wad wrodzonych, porodów przedwczesnych, makrosomii płodu oraz zaburzeń metabolicznych w tym hipokalcemii, hipoglikemii oraz hipomagnezemii [8, 9].

Patogeneza cukrzycy ciążowej związana jest ze zmniejszeniem sekrecji insuliny przez komórki β trzustki oraz rozwojem insulinooporności tkanek. Wrażliwość komórek β trzustki ulega zmniejszeniu, tym samym odpowiedź narządu na wzrost stężenia glukozy we krwi obniża się. Jednocześnie obserwowany spadek drażliwości tkanek na insulinę powoduje zmniejszenie tkankowego wychwytu i zużycia glukozy [10, 11]. Procesy te nasilają się zwłaszcza u ciężarnych z otyłością, zwiększając ryzyko wystąpienia choroby przez zwiększenie insulinooporności [12]. Insulinooporność jest obserwowana w fizjologicznej ciąży, osiągając największe nasilenie w trzecim trymestrze. Zmniejszenie drażliwości tkanek na insulinę wywołuje kompensacyjny wzrost wydzielania hormonu. Zmiany te ustępują po porodzie [13, 14]. Występowanie insulinooporności w fizjologicznej ciąży jest powodowane zmniejszaniem drażliwości tkanek na działanie insuliny przez działanie hormonów łożyskowych: progesteronu, kortyzolu, prolaktyny oraz laktogenu łożyskowego, które hamują przekazywanie sygnału po związaniu insuliny z receptorami na komórkach docelowych [15]. Insulinooporność może być także związana ze wzrostem aktywności cytokin produkowanych przez tkankę tłuszczową, która przyrasta w czasie ciąży, a spadek drażliwości na insulinę jest do tego przyrostu proporcjonalny [16]. Nie jest do końca jasne, dlaczego u części kobiet zaburzenie drażliwości tkanek i komórek β trzustki na insulinę skutkuje wystąpieniem cukrzycy. U tych kobiet dochodzi do zwiększenia stężenia glukozy na czczo i/lub w 2. godzinie OGTT. Dodatkowo, hiperglikemia zostaje nasilona przez zmniejszenie hamowania wątrobowej produkcji glukozy. Wrażliwość tkanek na insulinę u ciężarnych z GDM może się zmniejszyć do 40% wartości u zdrowych kobiet nie będących w ciąży, a stan taki może się utrzymywać nawet po porodzie [10].

Podobnie jak w przypadku cukrzycy typu 2, przyczyny wystąpienia cukrzycy ciążowej, można podzielić na genetyczne oraz wymienione wyżej środowiskowe. Naukowcy poszukują genów kandydatów, w których zmiany sekwencji nukleotydów byłyby związane z występowaniem cukrzycy ciążowej. Jednym z takich genów jest gen kodujący czynnik

transkrypcyjny 7L2 (TCF7L2). Wykazano, iż pojedynczy polimorfizm w allelu rs12255372 bądź rs7903146 silnie wiąże się ze wzrostem ryzyka zachorowania na GDM [17]. Trwają prace nad nowymi genami kandydatami cukrzycy w ciąży.

2.2 Stres oksydacyjny

Stres oksydacyjny to stan braku równowagi pomiędzy generacją w organizmie reaktywnych form tlenu (RFT) i działaniem mechanizmów antyoksydacyjnych. Reaktywne formy tlenu to szereg substancji, wśród których szczególnie aktywny jest anionorodnik ponadtlenkowy O_2^- , powstający w reakcji jednoelektronowej redukcji cząsteczki O_2 . O_2^- może ulegać przemianom do innych RFT w szeregu reakcji enzymatycznych i nieenzymatycznych. Może on reagować z wieloma substancjami, a w reakcji dysmutacji z innym anionorodnikiem ponadtlenkowym dochodzi do powstania nadtlenu wodoru oraz tlenu. Nadtlenek wodoru, również zaliczany do reaktywnych form tlenu, pełni rolę utleniacza oraz słabego reduktora. W fizjologicznym pH utlenia grupy tiolowe, indolowe, imidazolowe, fenolowe a także jony metali przejściowych. W tych ostatnich reakcjach powstaje rodnik hydroksylowy, najbardziej reaktywny spośród RFT [18, 19, 20, 21].

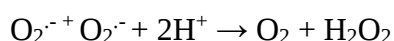
Głównym miejscem powstawania RFT jest mitochondrialny łańcuch oddechowy, w którym zachodzi proces czteroelektrodowej redukcji cząsteczek tlenu z powstaniem energii gromadzonej w wysokoenergetycznych wiązaniach ATP. W łańcuchu oddechowym dochodzi też do jednoelektronowej redukcji cząsteczki tlenu z powstaniem anionorodnika ponadtlenkowego. Zjawisko to zachodzi przy udziale cytochromu (koenzymu) Q zwanego ubichinonem. W warunkach prawidłowych niewielkie ilości powstającego anionorodnika są natychmiast eliminowane z mitochondriów przez enzymy antyoksydacyjne [22, 23, 24].

Generowanie RFT przez fagocyty to drugi z najważniejszych sposobów ich powstawania w ustroju. Fagocyty produkują RFT w mechanizmie obrony przeciwbakteryjnej, po aktywacji przez cytokiny zapalne w tym interferon gamma ($IFN\gamma$), interleukinę 2 (IL-2), interleukinę 6 (IL-6) oraz interleukinę 8 (IL-8). Enzymem odpowiedzialnym za wytwarzanie RFT przez fagocyty jest oksydaza NADPH katalizująca reakcję jednoelektronowej redukcji tlenu cząsteczkowego, z wytworzeniem anionorodnika ponadtlenkowego [25, 26, 27].

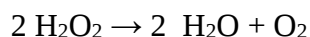
Inne źródła reaktywnych form tlenu to działanie oksydaz, w tym oksydazy ksantynowej i innych oksydaz NADPH a także cytochromu p450 [28].

Za obronę przed skutkami działania RFT na tkanki odpowiadają w ustroju antyoksydanty, które można podzielić na enzymatyczne i nieenzymatyczne, endogenne i egzogenne, hydrofobowe i hydrofilne. Antyoksydanty endogenne to grupa enzymów oraz substancji drobno cząsteczkowych, jak glutation, kwas moczowy, bilirubina, koenzym Q. Egzogenne antyoksydanty dostarczane są z pokarmem bądź w formie suplementów, do grupy tej należą: witaminy C i E, flawonoidy, karotenoidy i antocyjany [29, 30].

Pierwszym etapem eliminacji RFT z ustroju jest proces dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego, katalizowany przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD). Powstający w tej reakcji nadtlenek wodoru ulega przemianie do wody w reakcji katalizowanej przez katalazę. Dysmutaza ponadtlenkowa występuje w postaci trzech izoenzymów: SOD -1, która działa w cytoplazmie i jądrach komórkowych, SOD-2 (MnSOD-2) występujący głównie w mitochondriach oraz SOD-3 (CuZnSOD-3), którego aktywność można wykryć w osoczu. Każdy izoenzym katalizuje tę samą reakcję produkcji nadtlenku wodoru:

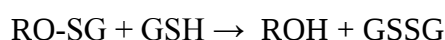


Produkt reakcji dysmutacji, za względu na swoją reaktywność i łatwość dyfuzji przez błony komórkowe ulega natychmiastowej przemianie do wody i tlenu, katalizowanej przez katalazę i peroksydazę glutationową [19, 31, 32]:



Katalaza to enzym występujący w niemal każdej komórce organizmu. Największą jej aktywność wykazano w wątrobie, nerkach, krwi (erytrocyty), szpiku, błonach śluzowych, a jej najmniejszą aktywność tego enzymu stwierdzono w tkance łącznej [33].

W eliminacji nadtlenku wodoru ważną rolę odrywa rodzina peroksydaz glutationowych. Są to enzymy mające zdolność katalizowania reakcji redukcji nadtlenków nieorganicznych (H_2O_2), grup alkoholowych lipidów oraz nadtlenków lipidów [34] zgodnie z reakcją:



Do rodziny peroksydaz glutationowych należy pięć izoform, z których każda eliminuje nadtlenek wodoru oraz nadtlenki organiczne z wykorzystaniem zredukowanego glutationu (GSH) [35, 36, 37].

Zredukowana forma glutationu odtwarzana jest dzięki aktywności reduktazy glutationowej, enzymu występującego w cytozolu, mitochondriach oraz w osoczu. Enzym ten jest flawoproteina, która wykorzystuje redukcyjny potencjał NADPH, produkowanego w szlaku pentozomonofosforawym. Enzymem tworzącym NADPH jest dehydrogenaza glukozy-6-fosforanu. Funkcja reduktazy to utrzymywanie prawidłowego stężenia GSH w komórkach, dzięki zdolności do przekształcania glutation utlenionego (GSSG) w GSH. Przy prawidłowym działaniu peroksydazy i reduktazy glutationowej, ilość całkowitego glutationu pozostaje stała [35, 36].

Glutation jest trójpeptydem zbudowanym z kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny. Glutation w 90% znajduje się w cytozolu komórek, w niewielkiej ilości w organellach takich jak mitochondria, peroksysomy, jądro. W znikomych ilościach glutation występuje w osoczu krwi. Do reakcji glutationu z rodnikami tlenowymi nie jest potrzebny żaden enzym. Możliwe jest to dzięki obecności grup tiolowych w zredukowanej cząsteczce. Może być syntetyzowany *de novo*, jak również jest częściowo wchłaniany z przewodu pokarmowego. Synteza glutationu jest regulowana poprzez szereg czynników mających wpływ na aktywność syntetazy γ -glutamylcysteinowej. Stres oksydacyjny, cytokiny zapalne, nowotwory, chemioterapia, niedobór białek w diecie, kortykosteroidy, erytropoetyna i hiperglikemia powodują spadek aktywności syntetazy. Z drugiej strony, spadek stężenia zredukowanego glutationu, prostaglandyna A₂, metale ciężkie, obecność antyoksydantów oraz insulina, a także obecność substratów syntezy zwiększają transkrypcję i aktywność syntetazy [38, 39, 40].

Obok wymienionych enzymów, elementem obrony przeciwoksydacyjnej ustroju są antyoksydanty drobnocząsteczkowe. Oprócz glutationu należą do nich: bilirubina, kwas moczowy, witaminy A, E, C, oraz melatonina. Aktywność antyoksydacyjną mają też białka związane z przemianami żelaza i miedzi: transferryna, ferrytyna i ceruloplazmina [41, 42, 43, 44].

W generowaniu reaktywnych form tlenu istotną rolę odgrywają jony metali przejściowych. W przebiegu reakcji Fentona powstający w ustroju nadtlenek wodoru zostaje przekształcony do rodnika hydroksylowego:



Dla zapobiegania reakcji Fentona istotne jest utlenianie jonów metali przejściowych, ich transport do miejsc docelowych oraz magazynowanie [45, 46]. Do grupy antyoksydantów związanych z eliminacją jonu żelazawego należą transferryna, ferrytyna oraz ceruloplazmina [47].

Brak równowagi pomiędzy opisanymi powyżej procesami powstawania RFT i eliminowania ich przez mechanizmy przeciwoksydacyjne jest określany jako stres oksydacyjny. Występuje on w szeregu różnorodnych stanów chorobowych, jak reakcje zapalne, choroby autoimmunoizacyjne, nowotwory. Nadmierna produkcja RFT może prowadzić do zmian w DNA, polegających na: mutacjach w obroksydacyjne

ębie par zasad, rearanżacjach nukleotydów, delecjach, insercjach [48], prowadzących np. do inaktywacji lub utraty genów supresorowych dla kancerogenezy. RFT mogą również ingerować w cytoplazmatyczną oraz jądrową transdukcję sygnału, np. przez blokowanie supresji działania jądrowego czynnika transkrypcyjnego kappa B (NF-κB), bądź przez hamowanie procesów fosforylacji przekazników sygnałów, prowadząc do rozwoju przewlekłego stanu zapalnego [49, 50]. RFT mają też zdolność do modulowania aktywności białek oraz genów, które działają bezpośrednio bądź pośrednio na geny odpowiedzialne za procesy proliferacji, różnicowania oraz apoptozy [51].

Wskazuje się również na związek między stresem oksydacyjnym a rozwojem chorób sercowo-naczyniowych. RFT powodują dysfunkcję śródbłónka naczyniowego, głównie przez deaktywację tlenku azotu (NO), czynnika rozszerzającego naczynia krwionośne, mającego potwierdzone działanie hamujące procesy proliferacji i zapalne, przez anionorodnik ponadtlenkowy z wytworzeniem peroksynitrylu. Eliminacja NO oraz indukcja NF-κB przez RFT wzmagają procesy aterogenne [52].

Niekorzystny wpływ nadmiernej produkcji RFT opisany został również w komórkach wątroby, w których obserwuje się zmiany strukturalne oraz funkcjonalne, a poprzez uruchomienie szlaku związanego z czynnikami transkrypcyjnymi dochodzi do zjawiska

apoptozy hepatocytów [53]. W nerkach obok apoptozy stres oksydacyjny indukuje przyspieszenie starzenia, zmniejszenie zdolności regeneracyjnych, oraz zwłóknienie narządu [54]. Produkcja RFT wiąże się również z wystąpieniem przewlekłych chorób płuc oraz przewlekłych powikłań cukrzycy [55, 56].

2.3 Stres oksydacyjny w ciąży

U zdrowych kobiet ciężarnych nasileniu ulegają przemiany tlenowe, a tym samym dochodzi do zwiększenia wytwarzania RFT. Głównym miejscem generacji RFT jest łożysko. W łożysku działa szereg mechanizmów indukujących stres oksydacyjny. Mnogość mitochondriów sprawia, że w jego komórkach produkowana jest znaczna ilość anionorodnika nadadtlenkowego $O_2^{\cdot-}$. Ze względu na rozrost łożyska wraz z wiekiem ciąży, zwiększaniu ulega ilość mitochondriów oraz generacja RFT [57]. Oprócz łańcucha oddechowego w mitochondriach, za powstawanie w łożysku anionorodnika nadadtlenkowego odpowiada oksydaza NADPH łożyska. Enzym ten różni się od oksydazy NADPH fagocytów, a jej homologi wykryto w różnych narządach. Niefagocytarne oksydazy NADPH są prawdopodobnie związane z patogenezą miażdżycy, nadciśnienia tętniczego, a ich aktywność jest stymulowana przez ligandy takie jak angiotensyna II, płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF, platelet-derived growth factor), cytokiny oraz trombinę, zmiany sił hemodynamicznych oraz metabolizmu komórki [58].

Anionorodnik nadadtlenkowy inaktywuje tlenek azotu powstały w wyniku działania syntazy tlenku azotu naczyń krwionośnych łożyska. Produktem reakcji są nieaktywne azotyny. Tlenek azotu należy do rodziny reaktywnych form azotu, które obok RFT przyczyniają się do wzrostu stresu oksydacyjnego. Związek pełni też funkcję wazodylatora, antyadhezyjną oraz antyagregacyjną w syncytiotrofoblaście, immunomodulującą w komórkach Hofbauera oraz rolę przekaźnika w szlakach sygnałowych [59]. Równowaga w produkcji obu związków: tlenku azotu oraz anionorodnika nadadtlenkowego zachowana jest, gdy ilość tlenku azotu przewyższa stężenie anionorodnika nadadtlenkowego [60]. Zaburzona równowaga w produkcji tych substancji, z uwagi na ich wysoką reaktywność, skutkuje powstaniem nadtlenoazotynu. Jest to silny oksydant, związek cytotoksyczny, który hamuje mitochondrialny łańcuch oddechowy, utlenia grupy sulfhydrylowe w białkach i inicjuje peroksydację lipidów, nawet bez obecności metali przejściowych. Powoduje nitrację aminokwasów aromatycznych w tym tyrozyny, zaburzając szlaki sygnałowe w komórkach. Poziom nitrotyrozyny wzrasta w łożyskach kobiet

cierpiących w czasie ciąży na stan przedrzucawkowy, charakteryzujący się wysokim ciśnieniem tętniczym. Z drugiej strony sugeruje się, iż nadtlenoazotyn, podobnie jak tlenek azotu, ma działanie wazodylatacyjne w naczyniach łożyska, natomiast skurcz naczyń spowodowany jest nadmiarem anionorodnika ponadtlenkowego, przy braku tlenu azotu [61, 62, 63, 64].

Wszystkie znane antyoksydanty, w tym katalaza, dysmutazy ponadtlenkowe, glutation, peroksydaza glutationowa, witaminy E i C są obecne w łożysku. Dwie izoformy dysmutazy ponadtlenkowej silnie związane są z łożyskiem: mitochondrialna Mn SOD oraz cytozolowa Cu/Zn SOD. Zaobserwowano regionalne różnice w zawartości poszczególnych antyoksydantów w łożysku, prawdopodobnie zależnie od poziomu stresu oksydacyjnego. W centralnej części procesy oksydacyjno-redukcyjne są nasilone, podczas gdy na skraju narządu poziom reakcji jest zmniejszony. Wiązane jest to z kierunkiem przepływu krwi od matki. Jednak centralna część narządu jest morfologicznie oraz enzymatycznie mniej dojrzała niż części obwodowe. Aktywność katalazy oraz peroksydazy glutationowej jest większa w centralnej części, choć nie znaleziono różnic w całkowitej ilości dysmutazy ponadtlenkowej [65, 66].

Poziom antyoksydantów i ich działanie wzrasta wraz z ciążą i obciążeniem tlenowym, eliminując powstałe reaktywne formy tlenu. Dzięki temu w organizmie zdrowej kobiety ciężarnej utrzymywana jest równowaga między procesami oksydacyjnymi oraz mechanizmami antyoksydacyjnymi [65, 66].

U zdrowych ciężarnych obserwuje się zmiany markerów stresu oksydacyjnego w porównaniu do kobiet niebędących w ciąży. Wymienić tu można zwiększoną peroksydację lipidów, obniżoną aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, wzrost produkcji tlenu azotu [103]. Autorzy nie są zgodni w temacie nasilenia odpowiedzi antyoksydacyjnej organizmu matki na zwiększony stres oksydacyjny. Mimo zaobserwowania wzrostu antyoksydantów enzymatycznych i nieenzymatycznych, niektórzy autorzy sugerują, że w ciąży nie ma wystarczającej odpowiedzi organizmu na stres oksydacyjny. Pewnym jest, że narażenie na stres wzrasta w kolejnych trymestrach aż do rozwiązania. Brakuje jednak odpowiednich metod, jednoznacznie określających zarówno poziom stresu oksydacyjnego jak i nasilenie obrony antyoksydacyjnej [67].

Za jedną z przyczyn rozwinięcia się powikłań położniczych, w tym stanu przedrzucawkowego, cukrzycy w ciąży nadciśnienia tętniczego uważa się stres oksydacyjny

[68, 69, 70, 71]. Stres oksydacyjny może stanowić zatem jedną z przyczyn hiperglikemii w ciąży, a zwiększona glikemia działa jak katalizator w syntezie RFT.

2.4 Stres oksydacyjny w cukrzycy

Cukrzyca jest stanem predysponującym do stresu oksydacyjnego. W cukrzycy typu 2 i w GDM obserwowano zwiększoną produkcję RFT. Nasilenie w warunkach hiperglikemii procesu glikolizy zwiększa dostępność substratów cyklu kwasów trójkarboksylowych, co wiedzie do nadprodukcji donorów elektronów dla mitochondrialnego łańcucha oddechowego. W efekcie, wskutek zwiększenia gradientu protonowego i wydłużenia okresu półtrwania przenośników elektronów, dochodzi do zwiększenia wytwarzania anionorodnika ponadtlenkowego przenikającego z mitochondriów do cytoplazmy. Anionorodnik ponadtlenkowy hamuje aktywność jednego z enzymów glikolizy – dehydrogenazy gliceraldehydo-3-fosforanu (GAPDH), powodując gromadzenie się glukozy i pośrednich metabolitów, co prowadzi do zwiększenia przemian glukozy w alternatywnych szlakach metabolicznych [72, 73]. Zwiększenie udziału szlaku poliolowego w metabolizmie glukozy powoduje m. in. zmiany dostępności ekwiwalentów redukcyjnych w komórce związane ze wzrostem stosunku NADH/NAD^+ i spadkiem stężenia NADPH w cytoplazmie [74]. Hiperglikemia powoduje większą wydajność glikacji białek, w tym powstawania końcowych produktów zaawansowanej glikacji (AGE), które działając przez swoje receptory (RAGE) nasilają syntezę RFT. Hiperglikemia wraz ze stresem oksydacyjnym działają jak autokatalizatory w produkcji reaktywnych form tlenu. Oba procesy przekładają się na powstawanie zaawansowanych produktów utleniania białek (advanced oxidation protein products AOPP), których główną składową są grupy karbonylowe oraz końcowych produktów lipooksydacji (lipoperoxidation end-products [ALEs]) [75, 76, 77]. Grupy karbonylowe mogą powstawać we wtórnej reakcji nukleofilowego łańcucha bocznego białek z aldehydami, jako produktami peroksydacji lipidów, bądź w reakcji z reaktywnymi pochodnymi karbonyłowymi, generowanymi w reakcji cukrów redukujących lub produktów ich utleniania z resztami lizynowymi w białkach [78]. Wreszcie, hiperglikemia poprzez różne mechanizmy zwiększa aktywność szlaków indukujących proces zapalny. Wszystkie procesy prowadzą m. in. do insulinooporności i upośledzenia funkcji wydzielniczej komórek β trzustki [79].

Hiperglikemia powoduje też osłabienie mechanizmów antyoksydacyjnych. Jeszcze zanim rozwinie się pełnoobjawowa cukrzyca, u pacjentów w stanie przedcukrzycowym

dochodzi do zmniejszenia aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz obniżenia tzw. całkowitego statusu antyoksydacyjnego. U osób starszych, u których nie rozwinęła się pełnoobjawowa cukrzyca obniżenie aktywności antyoksydacyjnej może być związane także z wiekiem, jednak badania wskazują, iż największy wpływ na spadek obrony przeciw reaktywnym formom tlenu ma zwiększone stężenie glukozy we krwi. Nawet u młodych osób z cukrzycą typu 1 poziom enzymów antyoksydacyjnych zmniejsza się znamienne w porównaniu do ludzi zdrowych, choć pozostaje na podobnym poziomie niezależnie od występowania bądź braku przewlekłych powikłań cukrzycy [80]. U ludzi młodych zmiany spowodowane przez stres oksydacyjny są widoczne zarówno jako uszkodzenia lipidów jak i uszkodzenia białek, zwłaszcza w grupach chorych, u których doszło do powikłań cukrzycy [81].

Zależne od hiperglikemii mechanizmy zwiększonej produkcji RFT występują w cukrzycy ciążowej, aczkolwiek w mniejszym nasileniu niż w innych typach cukrzycy. Wymienić tu można: glikację, procesy autooksydacyjne cząsteczek glukozy, czy aktywację szlaku poliolowego. Zwiększona produkcja RFT, połączona z osłabieniem obrony antyoksydacyjnej prowadzi do zaburzeń w wydzielaniu i działaniu insuliny. Mimo, że GDM jest stanem przejściowym i zwykle krótkotrwałym, wykazano w niej korelację między stężeniem glukozy we krwi a poziomem markerów stresu oksydacyjnego [70, 82]. Zaobserwowano dwukrotny wzrost uwalniania 8-izoprostanu, jednego z markerów stresu oksydacyjnego, przez łożysko u kobiet z GDM w porównaniu do zdrowych ciężarnych [83]. Co więcej, wykazano, iż w przypadku narażenia łożyska na czynniki indukujące wytwarzanie RFT poziom markerów obrony antyoksydacyjnej ulega obniżeniu [84]. U kobiet z GDM wykazano zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych, wzrost stężenia produktów peroksydacji lipidów i jego korelację ze stężeniem glukozy. Zaobserwowano również, że między 26 a 32 tygodniem ciąży wzrasta poziom malonyldialdehydu (MDA) w osoczu oraz erytrocytach kobiet z GDM, spada natomiast aktywność peroksydazy glutationowej [85, 86]. Rozpatrując poszczególne trymestry ciąży wykazano, iż stężenie wodoronadtlenków lipidów wzrasta w kolejnych trymestrach u kobiet z przedciążową cukrzycą typu 2, typu 1 oraz z GDM, podczas gdy całkowita aktywność antyoksydacyjna osocza w każdej grupie zmniejszała się [87].

Ciąża (stan fizjologiczny) i cukrzyca (choroba metaboliczna) przebiegają ze zwiększeniem generacji RFT i zmianami w mechanizmach przeciwoksydacyjnych. Można zakładać, że współistnienie tych dwóch stanów nie pozostaje bez wpływu na przebieg tych procesów. Celem niniejszej pracy jest ocena nasilenia stresu oksydacyjnego u kobiet w ciąży powikłanej cukrzycą, przebiegającą z umiarkowaną hiperglikemią.

3. Założenia i cel pracy

Stres oksydacyjny ma istotne znaczenie w patomechanizmie cukrzycy typu 2 oraz powstawaniu przewlekłych powikłań cukrzycy. Ze względu na zbliżony patomechanizm cukrzycy typu 2 i cukrzycy ciążowej przypuszcza się, iż u kobiet ciężarnych z zaburzoną gospodarką węglowodanową może dochodzić do zmian w ilości generowanych reaktywnych form tlenu oraz w aktywności obrony antyoksydacyjnej, podobnie jak w innych postaciach cukrzycy, w stopniu zależnym od nasilenia hiperglikemii. Sugeruje się też, że stres oksydacyjny może odgrywać istotną rolę w powstaniu cukrzycy ciążowej.

Celem podjętych badań była ocena zaburzeń równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej u kobiet w ciąży powikłanej cukrzycą przebiegającą z umiarkowaną hiperglikemią, charakteryzowanych przez:

1. Zmiany markerów obrony antyoksydacyjnej, w szczególności stężenia nieenzymatycznych oraz aktywności enzymatycznych antyoksydantów u kobiet z GDM w porównaniu do grupy kontrolnej.
2. Wpływ suplementacji żelaza na zmiany stężenia i aktywności markerów stresu oksydacyjnego.
3. Zależność między wskaźnikami stresu oksydacyjnego i wskaźnikami wyrównania gospodarki węglowodanowej u kobiet z cukrzycą ciążową.
4. Poziom markerów oksydacji białek u kobiet z GDM w porównaniu do grupy kontrolnej.
5. Zależność pomiędzy wskaźnikami stresu oksydacyjnego i wskaźnikami stanu zapalnego u kobiet z GDM w porównaniu do grupy kontrolnej.

4. Materiał i metody

4.1 Charakterystyka badanych grup

Badaniem objęto łącznie 88 pacjentek będących w drugim i trzecim trymestrze ciąży. Kobiety z cukrzycą wikłającą ciążę leczone były ambulatoryjnie w Gabinetach dla Ciężarnych z Cukrzycą Poradni Diabetologicznej Kliniki Chorób Metabolicznych Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Kwalifikacja do grupy badanej odbywała się na podstawie wyników diagnostycznego doustnego testu tolerancji glukozy. Charakterystykę grupy badanej zebrano w Tabeli 2.

Tabela 2. Charakterystyka pacjentek z grupy kobiet chorych na cukrzycę ciążową

Liczba pacjentek w grupie chorych na cukrzycę ciążową = 52	52 (%)	Średnia $\pm$ SD	Min-Max
Ciąża			
Pierwsza	31 (59,6%)		
Druga	14 (26,9%)		
Trzecia i kolejna	7 (13,5%)		
Tydzień ciąży		30 $\pm$ 4	21-39
Wiek (lata)		31 $\pm$ 4	23 - 41
Wzrost (cm)		164,6 $\pm$ 4,8	150 - 175
Waga przed ciążą (kg)		66,5 $\pm$ 13,3	43 - 98
Waga w dniu włączenia do badania (kg)		74,3 $\pm$ 12,1	55-102
Wskaźnik masy ciała (BMI) (kg/m²)		24,3 $\pm$ 4,2	17,2 – 33,3
Czynniki ryzyka wystąpienia GDM			
Obecność minimum jednego czynnika	36 (69,2%)		
Obecność dwóch i więcej czynników	11 (21,1%)		
Wiek powyżej 35 roku życia	7 (13,5%)		
BMI przed ciążą powyżej 27 kg/m ²	9 (17,3%)		
Dodatni wywiad w kierunku cukrzycy w rodzinie	25 (48%)		
Leczenie cukrzycy			
Dieta	28 (53%)		
Dieta i insulina	24 (47%)		

Grupę kontrolną stanowiło 36 zdrowych ciężarnych. Kryterium włączenia do grupy kontrolnej był prawidłowy wynik glikemii w teście przesiewowym obciążenia 50 gramami glukozy. Badanie to wykonywane było rutynowo, zgodnie z zaleceniami Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego z 2009 roku .

Charakterystykę grupy kontrolnej przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Charakterystyka grupy kontrolnej

Liczba osób w grupie referencyjnej = 36	N (%)	Średnia $\pm$ SD	Min-Max
Ciąża			
Pierwsza	13 (37%)		
Druga	17 (46%)		
Trzecia i kolejna	6 (17%)		
Tydzień ciąży		27 $\pm$ 2	22 - 30
Wiek (lata)		30 $\pm$ 3,4	23 – 36
Wzrost (cm)		161,8 $\pm$ 7,2	150- 175
Waga przed ciążą (kg)		61,9 $\pm$ 13,6	45- 100
Waga w dniu włączenia do badania (kg)		69,88 $\pm$ 11,59	62-74
Wskaźnik masy ciała (BMI) (kg/m²)		22,81 $\pm$ 4,48	20,20-22,77

Pacjentki z każdej grupy były kwalifikowane do badania markerów stresu oksydacyjnego, po wykluczeniu stanów zapalnych, chorób sercowo-naczyniowych, infekcji, w tym infekcji dróg rodnych i/lub moczowych oraz innych chorób mogących mieć wpływ na wskaźniki stresu oksydacyjnego i obrony antyoksydacyjnej.

Udział w badaniu był dobrowolny, po uzyskaniu pisemnej zgody pacjentek, a projekt badawczy uzyskał akceptację Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego (KBET/52/B/2009).

4.2 Pobieranie i zabezpieczanie materiału do badań

Krew do badań laboratoryjnych u wszystkich kobiet biorących udział w badaniu pobierano na czczo, w trakcie okresowej, rutynowej kontroli ciężarnych, poprzez nakłucie żyły łokciowej. W grupie kobiet z GDM krew pobierana była w Klinice Chorób Metabolicznych Szpitala Uniwersyteckiego, natomiast w grupie kontrolnej w Zakładzie Diagnostyki Szpitala Uniwersyteckiego. Krew pobierano przy użyciu systemów próżniowych firmy Sarstedt. Krew do oznaczeń w surowicy pobierana była do probówek bez antykoagulantu. Po wytworzeniu skrzepu próbki odwirowywano przez 10 minut z prędkością 4000 obrotów/min, a uzyskaną surowicę porcjowano i zabezpieczano w temperaturze -80 °C.

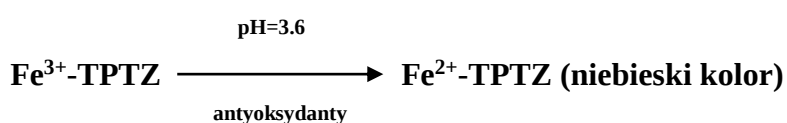
Do badań całkowitego potencjału antyoksydacyjnego, aktywności peroksydazy glutationowej i reduktazy glutationowej oraz stężenia zredukowanego glutationu krew pobierano do probówek zawierających, jako antykoagulant, wersenian dwupotasowy (K₂EDTA) i dokładnie mieszano. Następnie próbki odwirowywano przez 10 minut z prędkością 4000 obrotów/min, a oddzielone osocze porcjowano i zabezpieczano w temperaturze -80 °C. Do oznaczenia stężenia zredukowanego glutationu, z pozostałych po odseparowaniu osocza krwinek czerwonych przygotowywano hemolizat poprzez trzykrotne płukanie krwinek czerwonych w 0,9 % NaCl, czterokrotne (V/V) rozcieńczenie płukanych krwinek wodą destylowaną, zamrożenie, następnie rozmrożenie próbek, odwirowanie przez 10 minut z prędkością 4000 obrotów/min w celu usunięcia zrębów komórkowych oraz ponowne zamrożenie (zabezpieczenie) materiału w temperaturze -80 °C. Okres przechowywania materiału nie przekraczał 12 miesięcy.

4.3 Metodyka badań laboratoryjnych

4.3.1 Oznaczanie całkowitej zdolności redukcyjnej osocza FRAP (*Ferric reducing ability of plasma, ferric reducing antioxidant power*)

Zasada metody:

Całkowita zdolność antyoksydacyjna osocza jest mierzona jako zdolność antyoksydantów drobnocząsteczkowych znajdujących się w osoczu do redukcji jonów żelaza (III), występujących w postaci kompleksu z tripirydylo-triazyną (Fe^{3+} -TPTZ), do jonów żelaza (II):



Kompleks Fe^{2+} -TPTZ charakteryzuje się intensywnie niebieską barwą, i maksimum absorbancji przy długości fali $\lambda = 593$ nm. Intensywność barwy jest wprost proporcjonalna do stężenia jonów żelaza (II), co określa potencjał antyoksydacyjny osocza.

Pomiaru zdolności antyoksydacyjnej osocza dokonywano w oparciu o zmodyfikowaną metodę Benzie I.F.F i wsp [88] z użyciem analizatora biochemicznego MaxMat PL (Maxmat S.A., Montpellier, Francja) w temperaturze 37 °C. Odczynnik roboczy FRAP stanowiła mieszanina wykonana w następującej kolejności mieszania: bufor octanowy, TPTZ oraz FeCl_3 w stosunku 10:1:1. Procedurę analityczną przedstawiono w Tabeli 4.

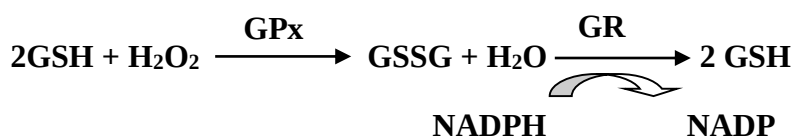
Tabela 4. Procedura analityczna oznaczeń FRAP

FRAP		
	Ślepa odczynnikowa [μl]	Próbka badana[μl]
Próbka badana - osocze	-	5
Woda destylowana	20	15
Odczynnik roboczy FRAP	150	150
Odczyt absorbancji $\lambda=593$, po 6 min.		
Różnicę absorbancji (ΔA) pomiędzy odczytem końcowym próbki badanej (A), a ślepą odczynnikową (A_1) oblicza się dla każdej próbki, a następnie odnosi do krzywej kalibracyjnej. Wyniki wyrażone są w mmol/l.		

4.3.1 Oznaczanie aktywności peroksydazy glutationowej w osoczu

Zasada metody:

Peroksydaza glutationowa (GPx) jest katalizatorem utleniania glutationu (GSH) przez nadtlenek wodoru. W obecności reduktazy glutationowej (GR) i NADPH (obecnych w mieszaninie reakcyjnej) utleniony glutation (GSSG) ulega natychmiastowej konwersji do formy zredukowanej, czemu towarzyszy utlenianie NADPH do NADP^+ , monitorowane spektrofotometrycznie poprzez spadek absorbancji przy długości fali $\lambda = 340 \text{ nm}$. Spadek absorbancji jest proporcjonalny do aktywności peroksydazy glutationowej, a ilość jednostek enzymatycznych obliczona jest w oparciu o wartość molowego współczynnika absorpcji NADPH przy $\lambda = 340 \text{ nm}$ ($6,22 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [90]



Aktywność peroksydazy glutationowej oznaczono na analizatorze biochemicznym MaxMat PL (Maxmat S.A., Montpellier, Francja) zgodnie z procedurą przedstawioną w Tabeli 5.

Tabela 5. Procedura analityczna oznaczeń aktywności peroksydazy glutationowej w osoczu

Aktywność peroksydazy glutationowej		
	Ślepa odczynnikowa[μl]	Osocze [μl]
Przygotowanie wstępne próbki	-	-
Bufor fosforanowy	40	35
NADPH	100	100
GR	25	25
GSH	100	100
NaN_3	25	25
Próbka	-	5
H_2O_2 (rozpoczęcie reakcji)	10	10
Pomiar spadku absorbancji przez kolejne 3 minuty przy długości fali $\lambda = 340 \text{ nm}$.		
Różnica absorbancji (ΔA) pomiędzy odczytem końcowym próbki badanej (A), a ślepą odczynnikową (A_1).		

Obliczanie wyników:

Aktywność peroksydazy glutationowej wyliczana była na podstawie zależności podanej poniżej:

$$U / l = \Delta A / \text{min} \times \text{Współczynnik}$$

$$\text{Współczynnik} = \frac{TV \times 1000}{E \times SV \times P}$$

TV = całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej [μl],

SV = objętość badanej próbki (materiału) [μl],

E = wartość molowego współczynnika absorpcji NADPH przy 340 nm - $6,22 \times 10^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$,

P = długość drogi optycznej [cm] - 0,8.

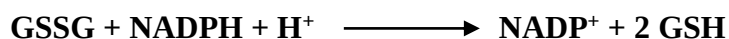
Wyliczenia aktywności GPx dokonywano przy użyciu wzoru:

$$U/l = \Delta A / \text{min} \times 12057,9$$

4.3.2 Oznaczanie aktywność reduktazy glutationowej w osoczu

Zasada metody:

Reduktaza glutationowa jest katalizatorem redukcji utlenionego glutationu (GSSG) do formy zredukowanej GSH. Reakcja przebiega w obecności NADPH, który ulega utlenieniu do NADP^+ . Wielkością mierzona jest spadek absorbancji przy utlenieniu NADPH do NADP^+ mierzony przy długości fali $\lambda = 340 \text{ nm}$ [91].



Aktywność reduktazy glutationowej (GRx) oznaczona została na analizatorze biochemicznym MaxMat PL (Maxmat S. A., Montpelier, Francja) zgodnie z procedurą przedstawioną w Tabeli 6.

Tabela 6. Procedura analityczna oznaczeń aktywności reduktazy glutationowej w osoczu

	Ślepa odczynnikowa [μl]	Osocze [μl]
	Osocze [μl]	
GSSG	100	100
Woda destylowana	25	-
Próbka	-	25
NADPH	20	20
Inkubacja przez 1 minutę.		
Pomiar spadku absorbancji przez kolejne 3 minuty przy długości fali $\lambda = 340 \text{ nm}$.		
Różnica absorbancji (ΔA) pomiędzy odczytem końcowym próbki badanej (A), a ślepą odczynnikową (A_1).		

Obliczanie wyników:

Aktywność reduktazy glutationowej wyliczano na podstawie zależności zamieszczonej poniżej.

$$U/l = \Delta A / \text{min} \times \text{Współczynnik}$$

$$\text{Współczynnik} = \frac{TV \times 1000}{E \times SV \times P}$$

TV = całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej [μl],

SV = objętość badanej próbki (materiału) [μl],

E = wartość molowego współczynnika absorpcji NADPH przy 340 nm- $6,22 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$,

P = długość drogi optycznej [cm] - 0,4 dla osocza; 0,3 dla hemolizatu.

Wyliczenia aktywności GRx dokonywano przy użyciu wzoru:

$$U/l_{\text{osocza}} = \Delta A / \text{min} \times 233l$$

4.3.3 Oznaczanie stężenia zredukowanego glutationu w hemolizacie krwinek czerwonych

Zasada metody:

Metoda oparta jest na trwałej zmianie barwy odpowiednio przygotowanego hemolizatu krwinek czerwonych po dodaniu kwasu 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowego) reagującego ze znajdującymi się w badanym materiale grupami sulfhydrylowymi. Oceny intensywności powstałej barwy dokonywano przez pomiar absorbancji przy długości fali $\lambda = 412 \text{ nm}$ [92].

Stężenie zredukowanego glutationu oznaczano z wykorzystaniem analizatora biochemicznego MaxMat PL (Maxmat S. A., Montpelier, Francja) zgodnie z procedurą przedstawioną w Tabeli 7.

Tabela 7. Procedura analityczna oznaczeń zredukowanego glutationu w hemolizacie krwinek czerwonych

Stężenie zredukowanego glutationu		
	Ślepa [μl]	Badana [μl]
Fosforan sodu	160	160
Próbka badana - hemolizat	-	40
Próbka ślepa	40	-
DTNB	20	20
Odczyt absorbancji po 2 min od dodania DTNB, przy długości fali $\lambda = 412 \text{ nm}$.		
Różnicę absorbancji (ΔA) pomiędzy odczytem końcowym próbki badanej (A), a ślepą odczynnikową (A_1) obliczono dla każdej próbki, a następnie odniesiono do krzywej wzorcowej. Ostateczną wartość wyrażono w $\mu\text{mol/l}$.		

4.3.4 Pozostałe badania biochemiczne i immunochemiczne

Oznaczenia biochemiczne i immunochemiczne zostały wykonane za pomocą analizatora biochemicznego MaxMat PL (Maxmat S. A., Montpelier, Francja), z wykorzystaniem odczynników oraz aplikacji dostarczonych przez firmę P. H. P. U. ALLMED (Kraków). Oznaczenia peptydu C oraz reszt karbonylowych zostały wykonane metodą ELISA. Oznaczenie peptydu C wykonano z użyciem odczynników firmy DRG International, Inc., oznaczenie reszt karbonylowych wykonano z zastosowaniem zestawu OxiSelect™ Protein Carbonyl Spectrophotometric Assay (Cell Biolabs Inn). Do odczytu absorbancji użyto czytnika

mikroplitek EL-800 (Bio-Tek Instruments, INC, USA). Metodykę oznaczeń z przedziałami referencyjnymi przedstawiono w Tabeli 8.

Tabela 8 Badania biochemiczne i immunochemiczne, metodyka oraz przedziały referencyjne

Oznaczenie	Metoda	Zasada metody	Jednostka	Wartości referencyjne
białko C-reaktywne (hsCRP)	Metoda immuno - turbidymetryczna, pomiar punktu końcowego.	Aglutynacja cząstek lateksu opłaskzonego króliczymi przeciwciałami skierowanymi przeciw ludzkiemu CRP	mg/l	0,1-3,1 mg/l
Głukoza	Enzymatyczna, kolorymetryczna	Utlenianie glukozy przez oksydazę glukozową z powstaniem H ₂ O ₂ , następnie H ₂ O ₂ ulega redukcji w reakcji z 4-aminoantypiryną i fenolem, katalizowej przez peroksydazę z powstaniem barwnego kompleksu czerwonego chinonu oraz H ₂ O	mmol/l	3,9-5,6 mmol/l
Fruktozamina	Kolorymetryczna	Glikowane białka surowicy redukują sole błekitu nitrotetrazoliowego (NBT) w środowisku alkalicznym. Szybkość powstawania formazanu jest proporcjonalna do stężenia glikowanych białek w surowicy	μmol/l	205-285 umol/l
Peptyd C	Metoda immunochemiczna kompetytywna	Peptyd C znajdujący się w próbce, współzawodniczy z Koniugatem (biotynylowanym peptydem C) o miejsce wiązania na płytce reakcyjnej, która opłaskczona jest mysimi przeciwciałami IgG skierowanymi przeciwko Peptydowi C. Ilość związanego koniugatu jest odwrotnie proporcjonalna do ilości Peptydu C w badanej próbce.	ng/ml	05-3.2 ng/ml
Reszty karbonylowe	Metoda immunoenzymatyczna	Reszty karbonylowe zawarte w próbce adsorbują do powierzchni płytki reakcyjnej, po czym ulegają derywatyzacji z użyciem dinitrofenylohydrazyną (DNTH). Utworzony związek ulega reakcji z przeciwciałami skierowanymi przeciw DNTH. W kolejnym etapie utworzony kompleks immunologiczny ulega reakcji ze znakowanym przeciwciałem. Ilość reszt karbonylowych w próbce jest określana przez porównanie do krzywej wzorcowej, sporządzonej w oparciu o znane stężenia utlenionego i zredukowanego BSA (Surowicza albumina wołowa - Bovine Serum Albumin) zmieszane w odpowiednich proporcjach.	μg/ml	

4.4 Analiza statystyczna

Normalność rozkładu poszczególnych zmiennych badano za pomocą testu *Shapiro Wilka*. Zmienne o rozkładzie różnym od normalnego poddano transformacji logarytmicznej, co pozwoliło uzyskać rozkład normalny. Wyniki badań w obu grupach opracowano wykorzystując metody statystyki opisowej z uwzględnieniem parametrów rozkładu, takich jak: średnia arytmetyczna $\pm$ SD, mediana (najniższy - najwyższy kwartył). Korelacje między parami zmiennych określono testem Pearsona, używając zmiennych po transformacji. W ocenie różnic między uzyskanymi wynikami użyto testu t dla zmiennych parametrycznych oraz testu U Manna-Whitneya, jeśli zmienne miały charakter nieparametryczny. Za istotne statystycznie uznano wyniki, dla których poziom istotności nie przekraczał 0,05. W analizie statystycznej wykorzystano program Statistica 10.0 (StatSoft Inc.) oraz Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation).

W celu oceny wpływu insulinooporności, wskaźników wyrównania metabolicznego oraz suplementacji żelazem na wskaźniki stresu oksydacyjnego w cukrzycy ciążowej przeprowadzono analizę regresji logistycznej. Wykorzystano modele zgodnie ze schematem przedstawionym w Tabeli 14. Wykorzystano dwa modele regresji. Model I polegał na wykorzystaniu jako zmiennej dychotomicznej mediany wybranego markera stresu oksydacyjnego, zestawiono ją ze wszystkimi wartościami zmiennych objaśniających. W modelu II mediany markerów stresu oksydacyjnego zestawiono ze zmiennymi objaśniającymi, dla których istnieją kliniczne przesłanki możliwości współlistnienia z większym wytwarzaniem reaktywnych form tlenu. Ze względu na uzyskanie znamiennej różnicy między grupą badaną oraz kontrolną dla parametru „Wiek ciąży”, porównanie parametrów stresu oksydacyjnego wykonano także z użyciem analizy regresji logistycznej, nie uwzględniając tej zmiennej.

5. Wyniki

Ciężarne z grupy badanej i kontrolnej nie różniły się między sobą pod względem wieku, ilości przebytych ciąż, wzrostu ani BMI przed ciążą, mimo znamiennej większej masy ciała przed ciążą w grupie badanej. Procent kobiet otrzymujących preparaty żelaza był jednakowy w obu grupach. Pacjentki z cukrzycą ciążową były włączone do badania w istotnie późniejszej ciąży w porównaniu do grupy kontrolnej. Wpływ wieku ciążowego został w analizie porównawczej parametrów stresu oksydacyjnego wyeliminowany przy użyciu analizy regresji logistycznej.

Porównanie cech demograficznych i klinicznych grupy badanej i kontrolnej przedstawiono w Tabeli 9.

Tabela 9. Charakterystyka demograficzna i kliniczna grupy badanej i kontrolnej

Parametr	Grupa kontrolna	Grupa badana	p
Wiek (lata)	29,71 ±3,58	31,41±3,98	0,106
Ciąża	1 (1-2)	2 (1-2)	0,207
Tydzień ciąży	28	33	<0,001
Waga przed ciążą (kg)	55 (52-65)	66,52±13,34	0,008
Wzrost (cm)	161±7,61	164±4,88	0,073
BMI	21,23 (20,20-22,77)	24,09 (21,48-25,95)	0,118
Suplementacja żelazem (%)	33,89	32,50	

Wyniki przedstawiono jako: średnia±SD oraz mediana (najniższy – najwyższy kwartył)

W badanych grupach porównano poziom wybranych markerów stresu oksydacyjnego i obrony antyoksydacyjnej. Porównano zarówno zawartość antyoksydantów nieenzymatycznych, jak i aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Oznaczono poziom glikemii na czczo i określono wyrównanie metaboliczne w dniu włączenia do badania oraz retrospektywnie na podstawie stężenia fruktozaminy. Oznaczono markery oksydacji białek oraz stanu zapalnego. Wyniki porównań wskaźników stresu oksydacyjnego i wyrównania metabolicznego w badanych grupach przedstawiono w Tabeli 10.

Tabela 10. Porównanie wskaźników stresu oksydacyjnego i wyrównania metabolicznego cukrzycy między grupami

Parametr	Grupa kontrolna [mediana (górny-dolny kwartył)]	Cukrzyca ciążowa mediana (górny-dolny kwartył)]	U-Mann Whitney	Regresja logistyczna
FRAP [mmol/l]	0,935 (0,871-1,100)	0,931 (0,780-0,999)	p=0,721	p=0,110
GR _{osocze} [U/l]	57,81 (55,48-65,27)	52,68 (46,38-61,77)	p=0,013	p<0,001
GP _{Xosocze} [U/l]	593,25 (460,61-688,51)	502,81 (397,91-661,98)	p=0,041	p=0,245
Glutation zredukowany [μmol/l]	0,14 (0,11-0,18)	0,12 (0,10-0,16)	p=0,727	p=0,534
Glukoza [mmol/l]	4,60 (4,30-4,90)	4,50 (4,10-5,00)	p=0,763	p=0,892
Fruktozamina [μmol/l]	239,40 (216,00-259,10)	207,45 (192,50-235,15)	p<0,001	p=0,017
Reszty karbonylowe [μg/ml]	1,55 (1,44-1,86)	2,05 (1,21-2,38)	p=0,056	p=0,042
Peptyd C [ng/ml]	2,23 (1,74-1,74)	2,06 (1,62-2,34)	p=0,093	p=0,038
CRP [mg/dl]	2,13 (1,11-4,62)	1,80 (0,99-3,91)	p=0,807	p=0,128

FRAP - całkowity potencjał redukcyjny osocza – zdolność osocza do redukcji żelaza (*ferric reducing ability of plasma*); GR_{osocze} –aktywność reduktazy glutationowej w osoczu; GP_{Xosocze}– aktywność peroksydazy glutationowej w osoczu; Glukoza- stężenie glukozy na czczo; Fruktozamina – stężenie fruktozaminy; Reszty karbonylowe – stężenie reszt karbonylowych; Peptyd C – stężenie peptydu C; CRP- stężenie białka C-reaktywnego;

Nie stwierdzono różnic w poziomie antyoksydantów drobnocząsteczkowych między badanymi grupami, zarówno mierzonych jako całkowita zdolność redukcyjna osocza (FRAP) jak i jako stężenie wewnątrzkomórkowego glutationu. U kobiet z cukrzycą ciążową stwierdzono znamienne mniejszą aktywność reduktazy glutationowej w osoczu. Wykazano spadek aktywności peroksydazy glutationowej w osoczu u kobiet z cukrzycą, choć po wyeliminowaniu wpływu tygodnia ciąży nie zaobserwowano znamienności. Stężenie glukozy na czczo w chwili włączenia do badania nie różniło się między grupami, jednak zaobserwowano znamienne mniejsze stężenie fruktozaminy oraz peptydu C w grupie badanej w porównaniu do kontrolnej. Po wyeliminowaniu wpływu tygodnia ciąży stwierdzono znamienne większe stężenie reszt karbonylowych w surowicy kobiet z GDM. Nie wykazano natomiast różnic w poziomie białka C- reaktywnego.

Wykorzystując korelację Pearsona poszukiwano zależności między stężeniem glukozy badanej na czczo i stężeniem fruktozaminy, a poszczególnymi markerami stresu oksydacyjnego i obrony antyoksydacyjnej. Wykazano związek pomiędzy stężeniem fruktozaminy oraz

aktywnością peroksydazy glutationowej. W przypadku pozostałych wskaźników stresu oksydacyjnego nie zaobserwowano związku ze stężeniami glukozy ani fruktozaminy (Tabela 11).

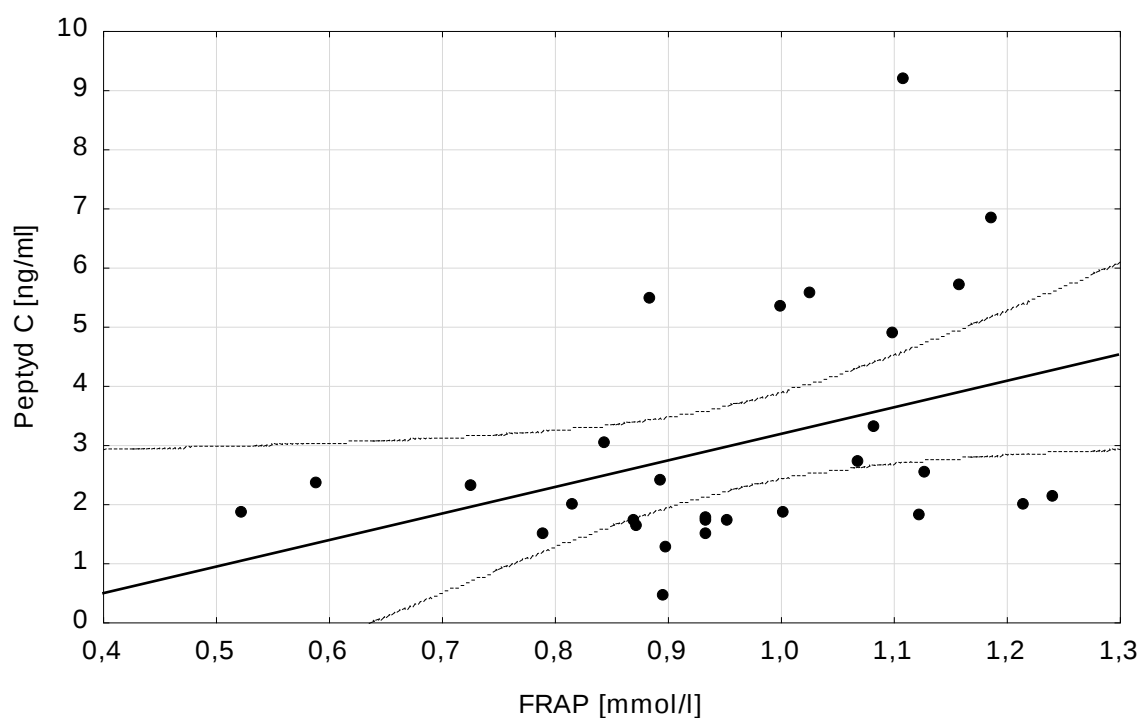
Tabela 11. Ocena korelacji wskaźników stresu oksydacyjnego ze stężeniem glukozy i fruktozaminy w grupie kobiet z cukrzycą ciążową i w grupie kontrolnej

Pierwsza zmienna	Dru ga zmienna	Grupa kontrolna		Grupa badana	
<i>N</i>		36		52	
		r	p	r	p
FRAP _{osocze}	Glukoza	0, 0244	0,896	-0,0436	0, 761
	Fruktozamina	0, 0128	0, 947	-0,1921	0, 173
Reduktaza glutationowa _{osocze}	Glukoza	0, 1692	0, 363	0, 0271	0, 852
	Fruktozamina	- 0,1833	0,332	-0,0851	0,553
Peroksydaza glutationowa _{osocze}	Glukoza	0, 2366	0, 200	-0,1665	0,248
	Fruktozamina	-0,0074	0, 016	0 ,0378	0,392
Glutation zredukowany _{hemolizat}	Glukoza	-0,1344	0, 479	-0,0050	0,973
	Fruktozamina	0, 0551	0, 776	-0,0284	0,846
Grupy karbonylowe _{surowica}	Glukoza	-0,0262	0, 889	-0,0807	0,635
	Fruktozamina	-0,2721	0, 146	0, 1765	0,289

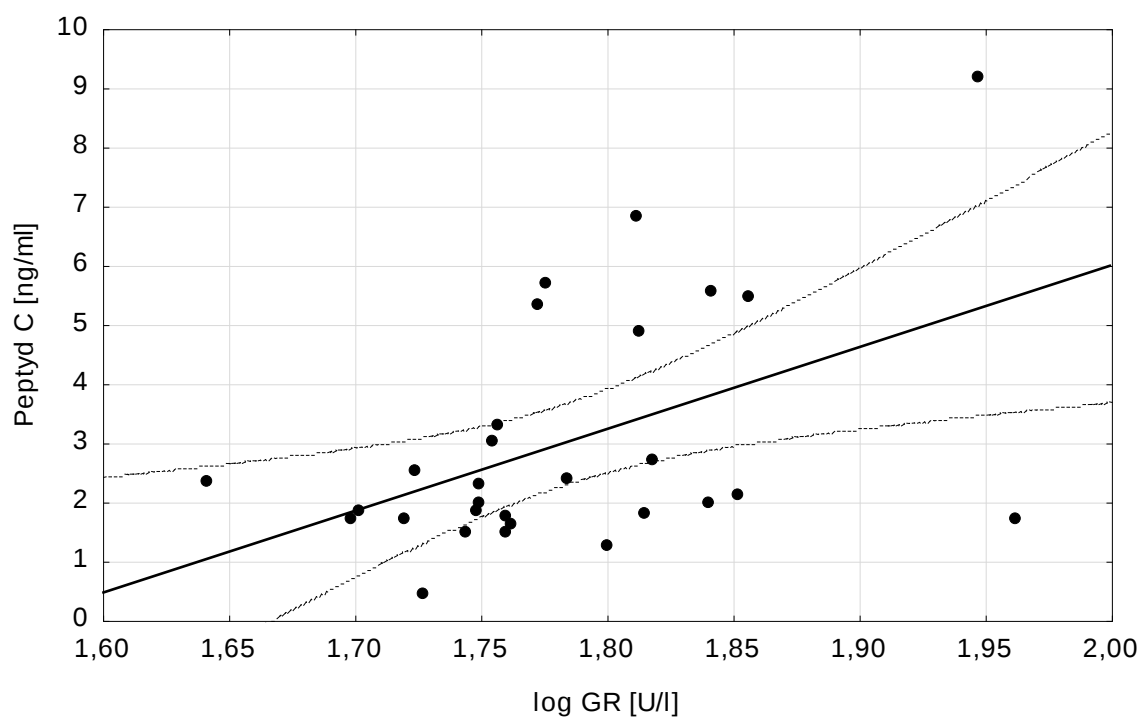
Poszukiwano również współzależności między stężeniem peptydu C a markerami stresu oksydacyjnego i obrony antyoksydacyjnej. Uzyskane wyniki zebrano w Tabeli 12 oraz na Rysunkach 1-3. Stwierdzono znamienne korelację pomiędzy stężeniem peptydu C i FRAP, aktywnością reduktazy glutationowej w osoczu oraz stężeniem zredukowanego glutationu w grupie kontrolnej. W grupie badanej nie stwierdzono żadnych istotnych zależności pomiędzy stężeniem peptydu C, a badanymi markerami stresu oksydacyjnego.

Tabela 12. Ocena korelacji wskaźników stresu oksydacyjnego i stężenia peptydu C w grupie kobiet z cukrzycą ciążową i w grupie kontrolnej.

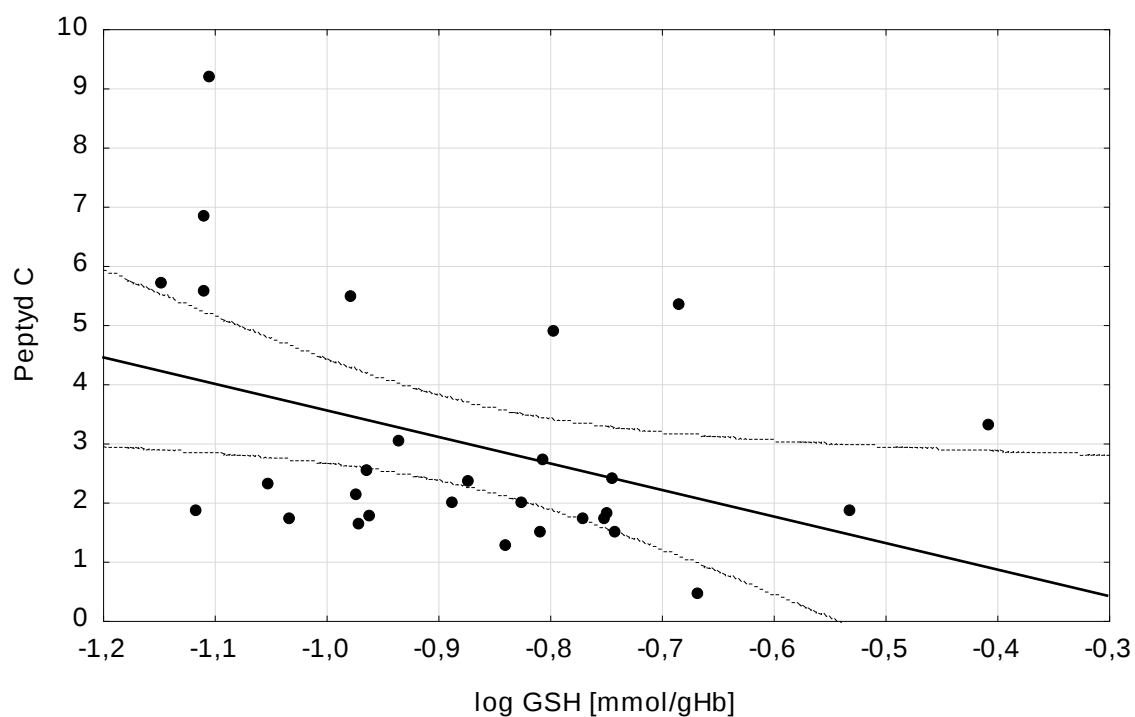
Pierwsza zmienna	Druka zmienna	Grupa kontrolna		Grupa badana	
N		36		52	
		r	p	r	p
FRAP _{osocze}	Peptyd C	0,3890	0,037	0,1646	0,269
Reduktaza glutationowa _{osocze}	Peptyd C	0,4740	0,009	-0,0086	0,954
Peroksydaza glutationowa _{osocze}	Peptyd C	0,3631	0,053	0,1532	0,304
Glutation zredukowany _{hemolizat}	Peptyd C	-0,4029	0,030	0,1241	0,422
Grupy karbonylowe _{surowica}	Peptyd C	0,3075	0,105	0,3075	0,060



Rysunek 1. Współzależność pomiędzy stężeniem Peptydu C [ng/ml] a FRAP [mmol/l] u zdrowych ciężarnych. Współzależność wyrażona jest wzorem: $\text{Peptyd C} = -1,319 + 4,4891 \times \text{FRAP}$ ($r=0,3890$, $p=0,037$)



Rysunek 2 Współzależność pomiędzy stężeniem Peptydu C [ng/ml] a logarytmem GR [U/l] u zdrowych ciężarnych. Współzależność wyrażona jest wzorem: $\text{Peptyd C} = -21,67 + 13,833 \times \log \text{GR}$ ($r=0,4740$, $p=0,009$).



Rysunek 3 Współzależność pomiędzy stężeniem Peptydu C [ng/ml] a logarytmem GR [U/l] u zdrowych ciężarnych. Współzależność wyrażona jest wzorem: $\text{Peptyd C} = -0,9350 - 4,483 \times \log \text{GSH}$ ($r=-0,4029$, $p=0,030$).

Zastosowane modele regresji logistycznej opisano w Rozdziale 3.3. Charakterystykę modeli przedstawiono w Tabeli 13. Uzyskane wyniki analizy regresji w oparciu o przyjęte modele dla obu grup (kontrolnej i badanej) zestawiono w Tabelach 14-17.

Tabela 13. Charakterystyka modeli regresji logistycznej wykorzystanej w analizie obu porównywanych grup.

Model	Zmienna dychotomiczna	Zmienne objaśniające					
Ia	Mediana FRAP	Suplementacja żelaza (tak/nie)	Stężenie glukozy [mmol/l]	Stężenie fruktozaminy $\mu\text{mol/l}$	Stężenie hsCRP [mg/dl]	Stężenie Peptydu C [ng/ml]	
Ib	Mediana aktywności GR w osoczu	Suplementacja żelaza (tak/nie)	Stężenie glukozy [mmol/l]	Stężenie fruktozaminy $\mu\text{mol/l}$	Stężenie hsCRP [mg/dl]	Stężenie Peptydu C [ng/ml]	
Ic	Mediana aktywności PGx w osoczu	Suplementacja żelaza (tak/nie)	Stężenie glukozy [mmol/l]	Stężenie fruktozaminy $\mu\text{mol/l}$	Stężenie hsCRP [mg/dl]	Stężenie Peptydu C [ng/ml]	
Id	Mediana stężenia grup karbonylowych	Suplementacja żelaza (tak/nie)	Stężenie glukozy [mmol/l]	Stężenie fruktozaminy $\mu\text{mol/l}$	Stężenie hsCRP [mg/dl]	Stężenie Peptydu C [ng/ml]	
IIa	Mediana stężenia FRAP	Suplementacja żelaza (tak/nie)	Stężenie glukozy > 5,5 mmol/l	Stężenie fruktozaminy < 251 $\mu\text{mol/l}$	Stężenie hsCRP > 3 [mg/dl]	Stężenie Peptydu C < 2,23 ng/ml /<2,06 ng/ml	
IIb	Mediana aktywności GR w osoczu	Suplementacja żelaza (tak/nie)	Stężenie glukozy > 5,5 mmol/l	Stężenie fruktozaminy < 251 $\mu\text{mol/l}$	Stężenie hsCRP > 3 [mg/dl]	Stężenie Peptydu C < 2,23 ng/ml /<2,06 ng/ml	
IIc	Mediana aktywności PGx w osoczu	Suplementacja żelaza (tak/nie)	Stężenie glukozy > 5,5 mmol/l	Stężenie fruktozaminy < 251 $\mu\text{mol/l}$	Stężenie hsCRP > 3 [mg/dl]	Stężenie Peptydu C < 2,23 ng/ml /<2,06 ng/ml	
IId	Mediana stężenia grup karbonylowych	Suplementacja żelaza (tak/nie)	Stężenie glukozy > 5,5 mmol/l	Stężenie fruktozaminy < 251 $\mu\text{mol/l}$	Stężenie hsCRP > 3 [mg/dl]	Stężenie Peptydu C < 2,23 ng/ml /<2,06 ng/ml	

Tabela 14. Model I regresji logistycznej dla grupy kontrolnej

Zmienna Dychotomiczna	Zmienne objaśniające				
Grupa kontrolna	Suplementacja żelaza(tak/nie)	Stężenie glukozy [mmol/l]	Stężenie fruktozaminy [μmol/l]	Stężenie CRP [mg/dl]	Stężenie Peptydu C [ng/ml]
FRAP < 0,935 [mmol/l]	Chi2= 8,1633; p modelu = 0,1475				
P	0,9880	0,7710	0,3337	0,2939	0,1083
Iloraz szans	1,0182	0,7657	1,0157	1,2968	2,5378
-95% CL	0,0834	0,1143	0,9823	0,7760	0,7624
+95% CL	12,4323	5,1292	1,0503	2,1672	8,4476
Mediana GR _{osocze} < 57 [U/l]	Chi2= 5,0791; p modelu = 0,4063				
P	0,8795	0,8241	0,6615	0,7649	0,1295
Iloraz szans	0,8458	0,8252	0,9936	0,9344	0,5266
95 CL	0,0855	0,1374	0,9642	0,5838	0,2190
95 CL	8,3630	4,9547	1,0240	1,4956	1,2661
Mediana GPx _{osocze} < 593,25 [U/l]	Chi2= 10,750; p modelu = 0,0566				
P	0,1832	0,0679	0,9919	0,2267	0,0612
Iloraz szans	8,8907	0,1154	0,9992	0,7260	1,8159
95 CL	0,2955	0,0099	0,9643	0,4191	0,9377
95 CL	267,53	1,3406	1,0366	1,2575	3,5164
Mediana Reszty karbonylowe >1,55 [μg/ml]	Chi2= 9,3086; p modelu = 0,0974				
P	0,4393	0,2262	0,2732	0,0436	0,9707
Iloraz szans	2,6425	3,3849	0,9820	1,8233	0,9878
95 CL	0,1951	0,4189	0,9488	0,9835	0,4929
95 CL	35,7906	27,3490	1,0163	3,3802	1,9794

Dla żadnej zmiennej dychotomicznej, którą stanowią mediany wybranych markerów stresu oksydacyjnego, w modelu pierwszym dla grupy kontrolnej (Tabela 15) nie znaleziono znamienności. Nie można zatem stwierdzić, że wybrane zmienne objaśniające mają wpływ na badane markery stresu oksydacyjnego,

Tabela 15. Model I regresji logicznej dla grupy badanej.

Zmienna Dychotomiczna	Zmienne objaśniające				
Grupa badana	Suplementacja żelaza(tak/nie)	Stężenie glukozy [mmol/l]	Stężenie fruktozaminy [μmol/l]	Stężenie CRP [mg/dl]	Stężenie Peptydu C [ng/ml]
Mediana FRAP FRAP < 0,915 [mmol/l]	Chi2= 1,1184; p modelu = 0,9525				
P	0,9049	0,9141	0,8042	0,8991	0,3171
Iloraz szans	0,9082	1,1750	0,9977	1,0133	1,7746
-95% CL	0,9792	0,0552	0,9792	0,8188	0,5493
+95% CL	1,0166	24,9960	1,0166	1,2541	5,7328
Mediana GR _{osocze} < 52,68 [U/l]	Chi2= 2,8708; p modelu = 0,7199				
P	0,6876	0,1309	0,9803	0,4679	0,9400
Iloraz szans	1,3977	0,3331	1,0000	1,0829	1,0452
95 CL	0,2545	0,0752	0,9814	0,8651	0,3144
95 CL	7,6770	1,4754	1,0195	1,3557	3,4739
Mediana GPx _{osocze} < 502,81 [U/l]	Chi2= 2,4113; p modelu = 0,7898				
P	0,7940	0,8675	0,7310	0,6466	0,2043
Iloraz szans	0,8053	0,8948	0,9968	0,9521	0,4582
95 CL	0,1477	0,2290	0,9780	0,7651	0,1303
95 CL	4,3913	3,4966	1,0159	1,1850	1,6111
Mediana Reszty karbonylowe >2,05 [μg/ml]	Chi2= 2,5174; p modelu = 0,7739				
P	0,6842	0,5988	0,2598	0,4925	0,6351
Iloraz szans	1,5100	0,6730	1,0167	1,0803	1,3890
95 CL	0,1881	0,1433	0,9864	0,8571	0,3346
95 CL	12,1211	3,1620	1,0480	1,3615	5,7658

Podobnie jak w przypadku grupy kontrolnej, również analiza regresji logistycznej dla grupy badanej (Tabela 16) ze względu na brak istotności modeli, nie

pozwała stwierdzić wpływu suplementacji żelaza, stężenia glukozy na czczo, stężenia fruktozaminy, stężenia CRP i/lub stężenia peptydu C na wybrane zmienne dychotomiczne.

Tabela 16. Model II regresji logistycznej dla grupy kontrolnej.

Zmienna Dychotomiczna	Zmienne objaśniające				
Grupa kontrolna	Suplementacja żelaza(tak/nie)	Stężenie glukozy >5,5 mmol/l	Stężenie fruktozaminy <251[μmol/l]	Stężenie hsCRP >3 [mg/dl]	Stężenie Peptydu C <2,23 [ng/ml]
Mediana FRAP FRAP < 0,935 [mmol/l]	Chi2= 2,9071; p modelu = 0,7143				
P	0,9408	0,9948	0,4605	0,7062	0,7847
Iloraz szans	1,0813	0,5045	1,0113	1,4099	0,7974
-95% CL	0,1221	0,1342	0,9798	0,2130	0,1429
+95% CL	9,5748	3,1719	1,0439	9,3319	4,4480
Mediana GR _{osocze} < 57 [U/l]	Chi2= 3,6071; p modelu = 0,6072				
P	0,5797	0,9992	0,3421	0,4320	0,5646
Iloraz szans	0,5283	0,0570	0,4254	2,0751	1,6242
95 CL	0,0484	0,1242	0,0659	0,3022	0,2832
95 CL	5,7607	3,1917	2,7475	14,2499	9,3117
Mediana GPx _{osocze} < 593,25 [U/l]	Chi2= 2,2028; p modelu = 0,8204				
P	0,0515	0,6641	0,3212	0,2872	0,0418
Iloraz szans	15,7609	0,3781	1,0177	0,3142	0,1259
95 CL	0,8353	0,0036	0,9809	0,0329	0,0153
95 CL	297,3570	39,3103	1,0559	2,9979	1,0396
Mediana Reszty karbonylowe >1,55 [μg/ml]	Chi2= 7,7405; p modelu = 0,1712				
P	0,6525	0,9994	0,1916	0,1690	0,7325
Iloraz szans	1,6316	0,0045	0,9769	3,9131	0,7394
95 CL	0,1711	0,0042	0,9415	0,5001	0,1183
95 CL	15,5571	3,1719	1,0138	30,6158	4,6178

Ograniczając ilość wyników zmiennych objaśniających jedynie do takich, które uważa się za istotne dla rozwoju chorób związanych z występowaniem zaburzeń równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej, nie znaleziono istotnych zależności dla zmiennych dychotomicznej w grupie kontrolnej (Tabela 17).

Tabela 17. Model II regresji logistycznej dla grupy badanej.

Zmienna Dychotomiczna	Zmienne objaśniające				
Grupa badana	Suplementacja żelaza(tak/nie)	Stężenie glukozy >5,5 mmol/l	Stężenie fruktozaminy <251	Stężenie hsCRP>3 [mg/dl]	Stężenie Peptydu C<2,06 [ng/ml]
Mediana FRAP FRAP < 0,915 [mmol/l]	Chi2= 1,9812; p modelu = 0,8517				
P	0,9227	0,9087	0,9251	0,1986	0,4568
Iloraz szans	0,9255	1,1948	0,9166	2,6122	0,5704
-95% CL	0,1808	0,0499	0,1376	0,5669	0,1219
+95% CL	4,7361	28,6142	6,1072	12,0371	2,6688
Mediana GR _{osocze} < 52,68 [U/l]	Chi2= 0,2832; p modelu = 0,9976				
P	0,9781	0,8726	0,9545	0,8920	0,6468
Iloraz szans	1,0217	1,2739	0,9496	0,9070	0,7160
95 CL	0,2070	0,0580	0,1486	0,2085	0,1612
95 CL	5,0408	27,9648	6,0657	3,9450	3,1801
Mediana GP _{xosocze} < 502,81 [U/l]	Chi2= 2,5246; p modelu = 0,7728				
P	0,8656	0,5074	0,7060	0,5389	0,2730
Iloraz szans	0,8713	0,6615	0,7036	1,5743	2,2612
95 CL	0,1646	0,1848	0,1046	0,3476	0,4934
95 CL	4,6096	2,3677	4,7319	7,1298	10,3624
Mediana Reszty karbonylowe >2,05 [µg/ml]	Chi2= 5,4380; p modelu = 0,3648				
P	0,8425	0,6220	0,3004	0,1510	0,1284
Iloraz szans	0,8254	2,2009	0,2493	3,4651	0,2536
95 CL	0,1135	0,0821	0,0158	0,5849	0,0397
95 CL	6,0025	59,0168	3,9286	20,5274	1,6207

Podobnie jak w przypadku modelu II dla grupy kontrolnej, w grupie badanej (Tabela 17) nie znaleziono istotnych powiązań między wyliczonymi wartościami zmiennych dychotomicznych a klinicznie istotnymi wartościami zmiennych objaśniających. Nie da się zatem w żadnym z badanych powyżej przypadków modelu II stwierdzić wpływu wybranych zmiennych objaśniających na wskaźniki stresu oksydacyjnego.

W poszukiwaniu modelu, który wykazałby istotne zależności między badanymi parametrami, dla wybranych modeli i zmiennych przeprowadzono regresję logistyczną wsteczną, polegającą na eliminacji najmniej istotnych zmiennych objaśniających. Modyfikacje modeli zebrano w Tabelach 18-20.

Tabela 18. Modyfikacja modelu I regresji logistycznej - Mediana aktywności GPx w osoczu

Zmienna Dychotomiczna	Zmienne objaśniające			
Grupa kontrolna	Suplementacja żelaza(tak/nie)	Stężenie glukozy [mmol/l]	Stężenie CRP [mg/dl]	Stężenie Peptydu C [ng/ml]
Mediana GPx _{osocze} < 593,25 [U/l]	Chi2= 10,284; p modelu = 0, 03593			
P	0,3065	0,07728	0,2202	0,0328
Iloraz szans	3,4035	0,1339	0,7211	2,0006
95 CL	0,2873	0,01279	0,4159	1,0233
95 CL	40,3210	1,4022	1,2503	3,9109
Grupa kontrolna	Stężenie glukozy [mmol/l]		Stężenie hsCRP [mg/dl]	Stężenie Peptydu C [ng/ml]
Mediana GPx _{osocze} < 593,25 [U/l]	Chi2= 10,256; p modelu = 0, 0165			
P	0,0559		0,2320	0,0197
Iloraz szans	0,1186		0,7360	2,0738
95 CL	0,0112		0,4344	1,0901
95 CL	1,1741		1,2468	3,9452

Regresja logistyczna wsteczna umożliwiła oszacowanie prawdopodobieństwa wpływu wybranych zmiennych objaśniających na obniżenie aktywności peroksydazy glutationowej w osoczu. Wykazano, że najsilniejszą zależność, warunkującą istotność całego modelu, ma stężenie peptydu C. Powiązanie to zaobserwowano jedynie dla grupy kontrolnej w modelu I.

Za pomocą regresji logistycznej wstecznej poszukiwano istotnego modelu dla zmiennych objaśniających mających wpływ na wzrost stężenia reszt karbonylowych.

Tabela 19. Modyfikacja modelu I regresji logistycznej - Mediana stężenia reszt karbonylowych

Zmienna Dychotomiczna	Zmienne objaśniające			
Grupa kontrolna	Suplementacja żelaza(tak/nie)	Stężenie glukozy [mmol/l]	Stężenie fruktozaminy [μmol/l]	Stężenie CRP [mg/dl]
Mediana Reszty karbonylowe >1,55 [μg/ml]	Chi2= 9,3072; p modelu = 0, 05389			
P	0,4355	0,2143	0,2724	0,0433
Iloraz szans	2,6211	3,3537	0,9820	1,8246
95 CL	0,2034	0,4468	0,9490	0,9858
95 CL	33,7808	25,1707	1,0162	3,3774
Grupa kontrolna	Stężenie glukozy [mmol/l]		Stężenie fruktozaminy [μmol/l]	Stężenie hsCRP [mg/dl]
Mediana Reszty karbonylowe >1,55 [μg/ml]	Chi2= 7,0578; p modelu = 0, 07010			
P	0,1894		0,2209	0,0788
Iloraz szans	3,1653		0,9837	1,5106
95 CL	0,5207		0,9568	0,9325
95 CL	19,2396		1,0113	2,4472

Grupa kontrolna	Stężenie glukozy [mmol/l]	Stężenie hsCRP [mg/dl]
Mediana Reszty karbonylowe >1,55 [μg/ml]	Chi2= 5,5904; p modelu = 0, 06112	
P	0,1896	0,0877
Iloraz szans	3,1803	1,4615
95 CL	0,5222	0,9271
95 CL	19,3682	2,3039

Tabela 20. Modyfikacja modelu II regresji logistycznej - Mediana stężenia reszt karbonylowych [µg/ml]

Zmienna Dychotomiczna	Zmienne objaśniające		
Grupa kontrolna	Suplementacja żelaza(tak/nie)	Stężenie fruktozaminy <251 [µmol/l]	Stężenie hsCRP >3 [mg/dl]
Mediana Reszty karbonylowe >1,55 [µg/ml]	Chi2= 7,2490; p modelu = 0, 06439		
P	0,4333	0,1327	0,0709
Iloraz szans	2,4330	3,9626	5,8178
95 CL	0,2339	0,5985	0,7778
95 CL	25,3052	26,2356	43,5133

Brak istotności wszystkich prezentowanych modeli wskazuje na brak wpływu wybranych zmiennych objaśniających na wzrost stężenia reszt karbonylowych.

6. Dyskusja

Cukrzyca występująca w ciąży to jedno z kilku najpoważniejszych jej powikłań. Znaczenie choroby podkreśla fakt, że na przestrzeni ostatnich trzech lat zmieniły się definicje stanów związanych z zaburzeniami stężenia glukozy we krwi w ciąży. Do 2013 roku obowiązywała jedna definicja cukrzycy w ciąży: cukrzyca ciążowa, określana jako wszelkie postacie zaburzenia tolerancji glukozy po raz pierwszy wykryte w ciąży. W tej definicji mieściły się zarówno pacjentki, dla których zmiany metabolizmu glukozy wystąpiły po raz pierwszy w ciąży, jak i takie pacjentki, które cierpiały na niewykrytą przed poczęciem cukrzycę [3]. Obecnie, zgodnie z nowymi kryteriami rozpoznania i klasyfikacji, wprowadzonymi na podstawie wyników dużych badań epidemiologicznych, jak HAPO (Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes) Study [93], w zależności od glikemii na czczo, stężenia glukozy w 2. godzinie OGTT lub na podstawie wartości glikemii przygodnej wyróżnia się dwie formy hiperglikemii stwierdzonej w ciąży: cukrzycę w ciąży (ciężarne, u których z dużym prawdopodobieństwem choroba istniała przed zajściem w ciążę) oraz cukrzycę ciążową, w której glikemia na czczo i w OGTT jest zwiększona, ale wartości stężenia glukozy na czczo są mniejsze od wartości przyjętych jako ogólne kryteria rozpoznania cukrzycy (Tabela 1) [4]. Choć patomechanizm rozwoju cukrzycy ciążowej nie jest jasny, poszukuje się powiązań schorzenia z czynnikami mogącymi mieć wpływ na rozwój zarówno insulinooporności jak i zaburzeń sekrecji insuliny.

Niniejsze badanie miało na celu określenie zmian w procesach oksydacyjnych i antyoksydacyjnych oraz ich związku ze stanem gospodarki węglowodanowej, stanem zapalnym i suplementacją żelaza u kobiet z cukrzycą ciążową w porównaniu do grupy kontrolnej złożonej z ciężarnych bez cukrzycy. Proces diagnostyczny pacjentek i rozpoznanie cukrzycy ciążowej opierały się na rekomendacjach Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego z lat 2009-2012.

Wszystkie badane ciężarne, bez względu na grupę, miały około 30 lat, były średniego wzrostu i w pierwszej bądź drugiej ciąży. W chwili rozpoczęcia badania, u każdej kobiety w ciąży rekomendowane było wykonywanie między 24 a 28 tygodniem ciąży testu przesiewowego obciążenia 50 gramami glukozy z pomiarem

glikemii po godzinie od spożycia glukozy. Test wykonywany był w dogodnym dla ciężarnej terminie, bez wcześniejszego przygotowania pacjentki. Dopiero uzyskanie wyniku powyżej wartości decyzyjnej (140 mg/dl) wskazywało na konieczność wykonania testu diagnostycznego obciążenia 75 gramami glukozy z pomiarem próbek krwi na oznaczenie glikemii na czczo i po dwóch godzinach od obciążenia. Z tego powodu, kobiety z rozpoznaną cukrzycą ciążową były kwalifikowane do badania w starszej ciąży, w porównaniu do grupy kontrolnej, rekrutowanej zaraz po uzyskaniu ujemnego wyniku testu przesiewowego.

Pacjentki z wykrytą hiperglikemią miały również znamienne większą masę ciała oraz BMI przed ciążą, choć średnie dla obu grup mieściły się w zakresie wartości prawidłowych. Większa waga przed ciążą, a tym samym podwyższony wskaźnik BMI przyczyniają się do zwiększenia ryzyka zachorowania na cukrzycę w ciąży oraz sprzyjają występowaniu powikłań okołoporodowych – są uznanym czynnikiem ryzyka hiperglikemii w ciąży [94, 95, 96].

Równowagę oksydacyjno-antyoksydacyjną określano między innymi przez oznaczenia enzymatycznych i nieenzymatycznych antyoksydantów w osoczu oraz hemolizacie krwinek czerwonych. Zaobserwowano spadek aktywności reduktazy oraz peroksydazy glutationowej w osoczu u pacjentek z GDM w porównaniu do zdrowych ciężarnych. Całkowita zdolność antyoksydacyjna osocza, wyrażona za pomocą FRAP, nie różniła się w badanych grupach. Można na tej podstawie wnioskować, że u kobiet z GDM poziom antyoksydantów drobnocząsteczkowych nie zmienia się w tym samym kierunku, co zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Spadek aktywności osoczowych enzymów, świadczy o reakcji na zwiększoną produkcję RFT. Uzyskane w niniejszym badaniu wyniki potwierdzają inne doniesienia, w których nie wykryto zmian w całkowitej zdolności antyoksydacyjnej osocza, mimo zmian w aktywności enzymów, będących markerami stresu oksydacyjnego [97]. Zgodnie z licznymi doniesieniami, aktywności enzymów będących markerami stresu oksydacyjnego ulegają dynamicznym zmianom u kobiet z GDM, a brak jednoznacznego kierunku zmian potwierdza dużą dynamikę procesów oksydacyjno – antyoksydacyjnych w ciąży, odzwierciedlającą konieczność dostosowania mechanizmów antyoksydacyjnych do

zmieniających się warunków zwiększonego narażenia na reaktywne formy tlenu [82, 98, 99, 100, 101].

W prezentowanym badaniu obserwowano znamienne obniżenie aktywności peroksydazy glutationowej u kobiet z GDM. Podobny proces został opisany przez francuskich badaczy, którzy potwierdzili spadek aktywności tego enzymu zarówno u kobiet z GDM jak i u ciężarnych z cukrzycą przedciążową [82]. Sugeruje się, że najsilniejsze zmiany zachodzą w trzecim trymestrze ciąży, a obniżenie aktywności może dotyczyć dwu izoform peroksydazy: osoczowej i wewnątrzkrynkowej [82, 102]. Należy jednak podkreślić, że naukowcy nie są zgodni co do znaczenia tych zmian, a nawet nie obserwują wahań aktywności peroksydazy glutationowej aż do rozwiązania [98].

Podobnych problemów przysparza badaczom ocena zmian aktywności drugiego enzymu istotnego w szlaku przemian glutationu - reduktazy glutationowej. W niniejszym badaniu aktywność reduktazy glutationowej jest u kobiet w ciąży powikłanej cukrzycą zmniejszona. Znamienny spadek obserwowany był również po wyeliminowaniu wpływu tygodnia ciąży na porównywaną aktywność GR. Tymczasem według nielicznych dostępnych danych, nie obserwowano zmian aktywności tego enzymu w grupie kobiet z GDM w porównaniu do grupy kontrolnej [103, 104].

Mimo wahań aktywności enzymów odpowiedzialnych za przemiany glutationu, nie wykazano istotnych różnic w stężeniu zredukowanego glutationu w hemolizacie krwinek czerwonych u kobiet z GDM w porównaniu do zdrowych ciężarnych. Powyższe obserwacje potwierdzone zostały w doniesieniach indyjskich autorów [105]. Inne prace świadczą o tym, że w ciąży powikłanej cukrzycą stężenie GSH może ulec zmianom w stosunku do grupy zdrowych ciężarnych. Poziom zredukowanego glutationu może być wyższy w grupie kobiet z GDM [106], bądź ulegać istotnemu obniżeniu [107, 108]. Zredukowany glutation jest podstawową substancją pełniącą funkcje antyoksydacyjne w ustroju, a jego głównym zadaniem jest eliminacja reaktywnych form tlenu w komórkach. Uzyskanie przez badaczy tak różnych wyników stężenia zredukowanego glutationu można wyjaśnić jego zmiennym wykorzystaniem i odtwarzaniem w warunkach różnego nasilenia genrracji RFT. To samo dotyczy kobiet

z GDM [109]. Niemniej jednak, poziom GSH w erytrocytach, odzwierciedlający jego zawartość w komórkach, jest uważany za wskaźnik stanu obrony antyoksydacyjnej.

Wśród kobiet zakwalifikowanych do badania 33% ciężarnych bez cukrzycy i 32,50% kobiet z GDM miało prowadzoną suplementację preparatami żelaza. W żadnej z grup nie zaobserwowano wpływu suplementacji na poziom wskaźników stresu oksydacyjnego. Ograniczeniem badania był brak możliwości weryfikacji stosowanej przez pacjentki dawki preparatów żelaza, zapotrzebowania na żelazo oraz stosowanej przez pacjentki diety. Naukowcy wykazali, że w fizjologicznej ciąży zachodzi związek między suplementacją a wzrostem markerów obrazujących stopień peroksydacji lipidów. Nie wykazano natomiast zmian aktywności enzymów antyoksydacyjnych, co potwierdza obserwacje w niniejszej pracy [110, 111]. U kobiet z cukrzycą ciążową stosujących suplementację żelazem także obserwowano nie tylko wzrost wskaźników peroksydacji lipidów, ale i uszkodzenia DNA w wyniku działania RFT [112, 113]. Dodatkowo wykazano związek między suplementacją a ryzykiem rozwoju GDM [114, 115].

Zarówno w grupie kontrolnej, jak i u pacjentek z GDM oznaczono glukozę na czczo oraz fruktozaminę w celu oceny wyrównania metabolicznego. Nie stwierdzono różnic w stężeniu glukozy na czczo. Warto podkreślić, że w obu grupach mieściło się ono w przedziale referencyjnym. Stężenie fruktozaminy w grupie kontrolnej było znamienne większe w porównaniu do grupy badanej, jednak dla każdej pacjentki stężenie to również mieściło się w zakresie wartości referencyjnych. Większe średnie stężenie w grupie kontrolnej może być spowodowane schematem diagnostycznym oraz charakterystyką testu, jakim jest oznaczanie stężenia fruktozaminy. Stężenie fruktozaminy zależy zarówno od glikemii w okresie poprzedzającym badanie, jak i od stężenia albuminy stanowiącej 90% glikowanych białek osocza [116]. Towarzysząca ciąży i narastająca z jej wiekiem retencja płynu prowadzi do różnego stopnia zmniejszenia stężenia albuminy w surowicy i wtórnie do spadku stężenia fruktozaminy [117]. Ponieważ pobranie materiału do badań u kobiet chorych odbywało się w starszej ciąży w porównaniu do grupy kontrolnej, przedstawiony mechanizm mógł doprowadzić do znanego zjawiska spadku stężenia fruktozaminy w kolejnych

tygodniach ciąży [118]. Dodatkowo, w momencie pobrania materiału do badań dla potrzeb projektu, pacjentki z grupy badanej były świadome zagrożeń cukrzycą ciążową (miały już wykonany test przesiewowy). Mogły zatem rozpocząć stosowanie diety dla ciężarnych z cukrzycą jeszcze przed klasyfikacją do grupy chorych, która następowała po wykonaniu OGTT. Mogło mieć to wpływ na zmniejszenie glikemii, na co wskazuje prawidłowe stężenie glukozy na czczo u wszystkich badanych, a tym samym do zmniejszenia wydajności procesu glikacji białek osocza. Powyższe czynniki mogły być przyczyną mniejszego stężenia fruktozaminy w surowicy kobiet z grupy badanej.

Poza korelacją między stężeniem fruktozaminy i aktywnością peroksydazy glutationowej w grupie zdrowych ciężarnych, w prezentowanym badaniu nie stwierdzono żadnych zależności pomiędzy wskaźnikami stresu oksydacyjnego i obrony przeciwoksydacyjnej, a stężeniem fruktozaminy i/lub glukozy. Podobny wynik uzyskali angielscy badacze analizując związek między stężeniem fruktozaminy a aktywnością peroksydazy glutationowej w grupie chorych na cukrzycę typu 2 [119]. W przypadku badanych grup, ciężarnych z GDM i kontrolnej, trudno mówić o istotnej hiperglikemii – zarówno glikemia na czczo, jak i stężenie fruktozaminy pozostawały w przedziale wartości referencyjnych. Warto tu podkreślić, że GDM u kobiet z grupy badanej była rozpoznawana na podstawie glikemii w 2. godz OGTT >140 mg/dl, zgodnie z obowiązującymi w trakcie rekrutacji pacjentek kryteriami rozpoznania. U kobiet niebędących w ciąży taka wartość odcięcia służy do rozpoznawania stanu przedcukrzycowego – nieprawidłowej tolerancji glukozy. Wartości glikemii na czczo znamienne korelują ze stężeniem fruktozaminy u pacjentów z cukrzycą typu 2 jak i u kobiet z GDM [118, 120]. Wskazuje się również na związek między zwiększoną glikacją białek a zwiększoną produkcją reaktywnych form tlenu, skutkującą zmianą markerów stresu oksydacyjnego [121]. W badanej grupie kobiet z GDM, w warunkach glikemii bliskiej prawidłowej, nasilenie procesu glikacji białek było podobne jak u osób zdrowych, co odzwierciedlało prawidłowe stężenie fruktozaminy. Glikacja białek, podobnie jak inne wcześniej omówione, zależne od hiperglikemii mechanizmy nie mogły więc być przyczyną wzrostu wytwarzania RFT w badanej grupie w stopniu zaburzającym równowagę oksydacyjno-antyoksydacyjną [118].

Znamiennie mniejsze stężenie peptydu C w grupie kobiet z GDM, stwierdzone w niniejszym badaniu odzwierciedla jeden z patomechanizmów cukrzycy ciążowej, jako że stężenie peptydu C jest miarą produkcji endogennej insuliny. Obserwując zmiany insulinooporności oraz sekrecji insuliny u kobiet z cukrzycą rozpoznaną w kolejnych trymetrach ciąży, stwierdzono znamienny spadek sekrecji insuliny w trakcie ciąży w porównaniu z grupą zdrowych ciężarnych [122, 123, 124]. U zdrowych ciężarnych obserwuje się spadek wrażliwości na insulinę w trzecim trymestrze ciąży. U kobiet, u których rozpoznaje się hiperglikemię wklajającą ciążę, spadek ten jest znamienny w porównaniu do zdrowych ciężarnych, a jego nasilenie jest proporcjonalne do czasu wykrycia zaburzeń. Dodatkowo, zjawisko to nasila się u tych kobiet, które charakteryzują się większymi wartościami BMI przed ciążą, co związane jest m. in. z działaniem TNF α i innych cytokin zapalnych wydzielanych przez adipocyty [123, 124, 125]. W niniejszej pracy nie można było wyliczyć wskaźnika insulinooporności (HOMA-IR), ponieważ pacjentki z GDM były leczone egzogenną insuliną. Ponadto, nie zaleca się stosowania tego wskaźnika u osób z jawną cukrzycą, w tym z GDM. Natomiast u osób z zachowaną rezerwą wydzielniczą komórek β trzustki, podstawowe stężenie insuliny, jak i peptydu C, można uznać za wskaźnik insulinooporności. U zdrowych ciężarnych stwierdzono korelację między stężeniem peptydu C a poziomem markerów stresu oksydacyjnego: całkowitej zdolności redukcyjnej osocza mierzonej za pomocą FRAP, aktywności reduktazy glutationowej w osoczu oraz stężeniem zredukowanego glutationu w hemolizacie krwinek czerwonych. Dodatkowo, wykorzystując modele regresji logistycznej stwierdzono związek między aktywnością peroksydazy glutationowej, a stężeniem peptydu C. Stwierdzone zależności mogą wskazywać na zwiększenie aktywności obrony antyoksydacyjnej wraz ze wzrostem stężenia peptydu C, odzwierciedlającego nasilenie insulinooporności, która wzrasta w ciąży. Podobne zależności u zdrowych ciężarnych potwierdzają inne prace [123]. Powyższych zależności nie wykazano w grupie badanej, prawdopodobnie z powodu mniejszego stężenia peptydu C u kobiet z GDM, nieodzwierciedlającego już wtedy stopnia insulinooporności.

W badanej grupie kobiet z GDM stwierdzono znamiennie większe stężenia reszt karbonylowych, które uważa się za główną składową produktów zaawansowanego

utleniania i glikacji białek (AOPP, advanced oxidation protein products) u chorych na cukrzycę. Nasilone procesy glikacji i oksydacji są ściśle ze sobą powiązane i określane wspólnym mianem procesów glikooksydacji. Najnowsze badania wykazały bezpośredni związek między stresem oksydacyjnym, a glikemią, nawet w wyrównanej cukrzycy. Podobnie, w badanej grupie zwiększone stężenie reszt karbonylowych stwierdzono u kobiet z wyrównaną metabolicznie GDM – prawidłową glikemią na czczo i poziomem fruktozaminy. Przyjmuje się, że większe znaczenie w indukowaniu stresu oksydacyjnego mają gwałtowne, krótkoterminowe zmiany glikemii (poposiłkowe zwiększenie i znaczne wahania dobowe), niż przewlekła, ale stabilna hiperglikemia [126]. Takie wahania glikemii obserwuje się u kobiet w ciąży powikłanej cukrzycą, ponieważ czas od momentu wystąpienia nietolerancji glukozy, przez rozpoznanie zaburzeń metabolizmu glukozy aż po edukację i wdrożenie leczenia jest krótki, a zmiany u ciężarnej przebiegają bardzo dynamicznie [127, 128, 129]. Zaobserwowano, iż mimo wzrostu wskaźników stresu oksydacyjnego, w prawidłowej ciąży nie dochodzi do wzrostu stężenia grup karbonylowych w porównaniu do kobiet bez ciąży [130]. Natomiast dowiedziono, że u kobiet z GDM stężenie produktów zaawansowanej glikacji białek jest większe niż u kobiet bez cukrzycy, a stężenie AOPP wzrasta znacznie jeśli do cukrzycy ciążowej dochodzą komplikacje ciąży takie jak stan przedrzucawkowy [131, 132]. Również stężenie grup karbonylowych oznaczane w osoczu oraz w erytrocytach, jest większe u kobiet w ciąży powikłanej cukrzycą w porównaniu do zdrowych ciężarnych, przy czym większe stężenie obserwuje się u kobiet z GDM niż z cukrzycą typu 1. Może to sugerować większe okołodobowe wahania glikemii u kobiet z GDM, w porównaniu do kobiet, u których przed ciążą powinno się uzyskać wyrównanie metaboliczne [133].

W niniejszym badaniu nie wykazano zwiększonego stężenia markera stanu zapalnego, jakim jest białko C-reaktywne (CRP), w żadnej z badanych grup, w obu stężenie CRP mieściło się w przedziale wartości prawidłowych.. Spostrzeżenia te potwierdzone zostały przez naukowców z Finlandii [134]. CRP jest wskaźnikiem ostrej fazy i, jak wykazały badania u kobiet chorujących na cukrzycę w ciąży, silnie koreluje z BMI przed ciążą. Co więcej, wykazano, że stężenie CRP było większe u tych ciężarnych z otyłością, u których uzyskano prawidłowe wyniki OGTT, a średnie

stężenia CRP były u nich wyższe nawet w porównaniu z chorymi na cukrzycę w ciąży [135]. Autorzy sugerują, że wzrost stężenia CRP w surowicy ciężarnej nie może być wiązany z prawdopodobieństwem wystąpienia GDM. Jednak istnieje związek między stanem zapalnym oraz cukrzycą w ciąży, o czym może świadczyć podwyższenie stężenia cytokin prozapalnych, w tym TNF α . Uważa się, że TNF α silnie koreluje ze wzrostem insulinooporności u kobiet z GDM [136]. Brak wzrostu stężenia CRP w badanej grupie kobiet z GDM jest związany z brakiem u nich głębokich zaburzeń przemian węglowodanów i znacznej hiperglikemii, odpowiedzialnej za aktywację mechanizmów prozapalnych, np. NF- κ B. Ograniczyło to również udział mechanizmów zapalnych w generacji RFT.

Przedmiotem badań przedstawionych w niniejszej pracy była grupa kobiet z cukrzycą ciążową, rozpoznaną w trzecim tryestrze ciąży, na podstawie wyników OGTT, z wykorzystaniem kryteriów diagnostycznych rekomendowanych przez PTD w 2012.. Pacjentki te cechowały się łagodnymi zaburzeniami tolerancji glukozy, a w swoim profilu metabolicznym nie różniły się istotnie od zdrowych ciężarnych stanowiących grupę kontrolną. Pomimo to, w badanej grupie ciężarnych z GDM stwierdzono cechy zaburzenia równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej w postaci zmniejszenia aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz zwiększenia stężenia karbonyli białkowych. Nieprawidłowości te stwierdzono pomimo braku reakcji zapalnej, stwierdzonego na podstawie prawidłowego stężenia CRP w surowicy. Zatem, cukrzyca ciążowa, nawet dobrze wyrównana metabolicznie, może być uznana za stan nasilający stres oksydacyjny. Dalsze badania powinny wykazać, czy po przyjęciu nowych, wyższych punktów odcięcia w OGTT dla rozpoznawania GDM obserwowane będą zaburzenia równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej i jaki będzie ich stopień.

7. Wnioski

1. U kobiet z cukrzycą ciążową nie stwierdzono zmian poziomu nieenzymatycznych antyoksydantów osocza oraz krwinek czerwonych, odzwierciedlanego przez FRAP i stężenie GSH, natomiast wykazano znamienne obniżenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych w surowicy, co wskazuje na zmniejszenie obrony antyoksydacyjnej w GDM, nawet dobrze wyrównanej metabolicznie.
2. U kobiet z GDM stwierdzono znamienne większe stężenia reszt karbonylowych, co wskazuje, że u kobiet w ciąży powikłanej cukrzycą, nawet dobrze wyrównaną metabolicznie, glikooksydacja białek jest bardziej nasiloną, co może powodować dalszą generację RFT, a w konsekwencji zaburzenie równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej.
3. W badanej grupie kobiet z GDM nie stwierdzono istotnego wzrostu stężenia CRP w surowicy, ani jego związku z markerami stresu oksydacyjnego.
4. Związek pomiędzy markerami stresu oksydacyjnego i dążeniem peptydu C w osoczu, stwierdzony jedynie w kontrolnej grupie zdrowych ciężarnych, może wskazywać na wpływ insulinooporności na równowagę oksydacyjno-antyoksydacyjną.
5. Nie wykazano wpływu suplementacji preparatami żelaza na poziom markerów stresu oksydacyjnego w badanych grupach kobiet z GDM i zdrowych ciężarnych.
6. Cukrzyca ciążowa, nawet dobrze wyrównana metabolicznie, przebiega z zakłóceniem równowagi procesów oksydacyjno-antyoksydacyjnych.

8. Piśmiennictwo

1. Wójcikowski, C., Królikowska, B., Konarzewska, J., Kanadys, W., Drozdal, M., Olszewski, J., Łukaszuk, K. .:[The prevalence of gestational diabetes mellitus in Polish population]. *Ginekologia Polska* 2012; 73(10), 811–6.
2. Grudzien U., Panek A., Kozłowska D., Swadzba J. Diagnosis of gestational diabetes mellitus - polish comment to worldwide recommendations. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*; 52 (Special Suppl.): 669
3. Polskie Towarzystwo Diabetologiczne: Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2012 *Diabetologia Kliniczna* 2012, 1 (Suplement A).
4. Polskie Towarzystwo Diabetologiczne: Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2015. *Diabetologia Kliniczna* 2015; 4 (suplement A).
5. Polskie Towarzystwo Diabetologiczne: Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2014 *Diabetologia Kliniczna* 2014; 3 (Suplement A).
6. World Health Organization: Diagnostic Criteria and Classification of Hyperglycaemia First Detected in Pregnancy. WHO/NMH/MND/13.2.
7. Casey B.: Pregnancy Outcomes in Women With Gestational Diabetes Compared With the General Obstetric Population. *Obstetrics & Gynecology* 1997; 90(6), 869–873.
8. Łagoda K., Kobus G., Bachórzewska-Gajewska H.: Wpływ cukrzycy ciążowej na rozwój płodu i noworodka. *Endokrynologia, Otyłość i Zaburzenia Przemiany materii* 2008; 4 (4): 168-173.
9. Langer, O., Yogev, Y., Most, O., & Xenakis, E. M. J. (2005). Gestational diabetes: the consequences of not treating. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 192(4), 989–97.
10. Ryan E.A., O’Sullivan M.J., Skyler J.S.: Insulin action during pregnancy. Studies with the euglycemic clamp technique. *Diabetes* 1985; 34:380-386.
11. Buchanan, T. A., & Xiang, A. H.: Gestational diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Investigation* 2005, 115(3), 485–91.

12. Chu S.Y., Callaghan W.M., Kim S.Y., Schmid C.H., Lau J.L., England L.J., Dietz P.M.: Maternal obesity and risk of gestational diabetes mellitus 2007. *Diabetes Care* 2007; 30:2070-2076.
13. Stanley K., Fraser R., Bruce C.: Physiological changes in insulin resistances in human pregnancy: longitudinal study with the hyperinsulinaemic euglycaemic clamp technique. *An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1998; 105:756-759.
14. Lind T., Billerwicz W.Z., Brown G.A.: Serial study of changes occurring in the oral glucose tolerance test during pregnancy. *An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1973; 80: 1033–1039.
15. Barbour L.A., McCurdy C.E., Hernandez T.L., Kirwan J.P., Catalano P.M., Friedman J.E.: Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30:112-119.
16. Mastorakos G., Valsamakis G., Papatheodorou D.C., Barlas I., Margeli A., Boutsiadis A., Kouskouni E., Vitoratos N., Papadimitriou A., Papassotiriou I., Creatsas G.: The role of adipocytokines in insulin resistance in normal pregnancy: Visfatin concentrations in early pregnancy predict insulin sensitivity. *Clinical Chemistry* 2007; 53:1477-1483.
17. Zhang C., Bao W., Rong Y., Yang H., Bowers K., Yeung E., Kiely M.: Genetic variants and the risk of gestational diabetes mellitus: a systematic review. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 2011; 25(3): 287–299.
18. Chen X., Scholl T.O., Leskiw M.J., Donaldson M.R., Stein T.P.: Association of Glutathione Peroxidase Activity with Insulin Resistance and Dietary Fat Intake during Normal Pregnancy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003; 88(12): 5963–5968.
19. Idovich I.: Superoxide Radical and Superoxide Dismutase. *Accounts of Chemical Research* 1972; 5: 321-326
20. Bigarella C.L., Liang R., Ghaffari S.: Stem cells and the impact of ROS signaling. *Development* 2014; 141(22):4206-18.

21. Halliwell B.: Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *The American journal of medicine*, 1991; 91 (3) 14-22.
22. Turrens J.F.: Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 2003; 552 (2): 335–344.
23. Murphy M.P.: How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal* 2009; 417: 1-13.
24. Korshunov S.S, Skulachev V.P., Starkov A.A.: High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *Federation of European Biochemical Societies* 199; 416 (1): 15-18.
25. Forman H.J., Torres M: Reactive Oxygen Species and Cell Signaling Respiratory Burst in Macrophage Signaling. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2002; 166: 4-8.
26. Annette van der Goes A., Brouwer J., Hoekstra K., Roos D., van den Berg T.K., Dijkstra C.D.: Reactive oxygen species are required for the phagocytosis of myelin by macrophages. *Journal of Neuroimmunology* 1998; 92 (1–2): 67-75.
27. Moslen M.T.: Reactive Oxygen Species in Normal Physiology, Cell Injury and Phagocytosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1994; 366: 17-27.
28. Battelli M.G., Bolognesi A, Polito L.: Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: new emerging roles for a multi-tasking enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2014; 1842(9): 1502-17.
29. Irshad M., Chaudhuri P.S.: Oxidant-antioxidant system: role and significance in human body. *Indian Journal of Experimental Biology* 2002; 40(11): 1233-9..
30. Kelly F.J.: Use of antioxidants in the prevention and treatment of disease. *Journal of the International Federation of Clinical Chemistry* 1998; 10(1):21-3.
31. Crapo A.D., Oury T., Rabouille C., Slot J.W., Chang L-Y.: Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Cell Biology* 1992; 89: 10405-10409.

32. McCord J.M., and Irwin Fridovich I.: Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). The Journal of Biological Chemistry 1969; 244: 6049-6065.
33. Ścibior D., Hanna Czeczot H.: Katalaza – budowa, właściwości, funkcje. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 2006; 60: 170-180.
34. Chen H., Yu M., Li M., Zhao R., Zhu Q., Zhou W., et al.: Polymorphic variations in manganese superoxide dismutase (MnSOD), glutathione peroxidase-1 (GPX1), and catalase (CAT) contribute to elevated plasma triglyceride levels in Chinese patients with type 2 diabetes or diabetic cardiovascular disease. Molecular and Cellular Biochemistry 2012; 363:85-91.
35. Kuhn H., Borchert A.: Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. Free Radical Biology and Medicine, 2002 ; 33: 154-72.
36. Leopold Flohé L., Toppo S., Cozza G., Ursini F.: A Comparison of Thiol Peroxidase Mechanisms. Antioxidants & redox signaling ; 15 (3): 763-780.
37. Prabhakar R., Morokuma K., Musaev D.G.: Peroxynitrite reductase activity of selenoprotein glutathione peroxidase: A computational study. Biochemistry 2006; 45:6967-77.
38. Łukaszewicz-Hussain A.: Rola glutationu i enzymów z nim związanych w proces antyoksydacyjnych organizmu. Medycyna Pracy 2003; 54 (5): 473-479.
39. Bukowska B.: Glutation: Biosynteza, czynniki indukujące, oraz stężenie w wybranych jednostkach chorobowych. Medycyna Pracy 2004; 55 (6): 501-509.
40. Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R., Turner, N. D.: Glutathione metabolism and its implications for health. The Journal of Nutrition 2004; 134(3): 489-492.
41. Sies, H., Stahl, W.: Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. The American journal of clinical nutrition 1995; 62(6): 1315-1321.
42. Boon, A. C., Bulmer, A. C., Coombes, J. S., & Fassett, R. G.: Circulating bilirubin and defense against kidney disease and cardiovascular mortality:

- mechanisms contributing to protection in clinical investigations. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2014; 307(2): F123-F136.
43. Nieto F.J., Iribarren C., Gross M.D., Comstock G.W., Richard G. Cutler R.G.: Uric acid and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis? *Atherosclerosis* 2000; 148 (1): 131-139.
 44. Rodriguez C., Mayo J.C., Sainz R.M., Antolín I., Herrera F., Martín V., Reiter R.J.: Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of Pineal Research* 2004; 36 (1): 1-9.
 45. Meneghini R.: Iron Homeostasis, Oxidative Stress, and DNA Damage. *Free Radical Biology and Medicine* 1997; 23 (5): 783-792.
 46. Toyokuni, S.: Iron and carcinogenesis: from Fenton reaction to target genes. *Redox Report* 2002; 7(4): 189-197.
 47. Eid, C., Hémadi, M., Ha-Duong, N. T., Chahine, J. M. E. H.: Iron uptake and transfer from ceruloplasmin to transferrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 2014; 1840(6), 1771-1781.
 48. Wiseman, H., & Halliwell, B.: Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *The Biochemical journal*; 313, 17-29.
 49. Cerutti, P. A.: Oxy-radicals and cancer. *The Lancet* 1994; 344(8926), 862-863.
 50. Schreck, R., Albermann, K. A. J., & Baeuerle, P. A.: Nuclear factor κ B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radical Research* 1992; 17(4), 221-237.
 51. Burdon, R. H.: Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radical Biology and Medicine* 1995, 18(4), 775-794.
 52. Lakshmi V.S., Padmaja G., Kuppusamy P., Kutala V.K.: Oxidative stress in cardiovascular disease. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 2009; 40:421-440.
 53. Cichoż-Lach H., Michalak A., Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World journal of gastroenterology* 2014; 20: 8082-8091.

54. Small, D. M., Coombes, J. S., Bennett, N., Johnson, D. W., & Gobe, G. C.: Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. *Nephrology* 2012; 17(4): 311-321.
55. Tse, H. N., & Tseng, C. Z. S.: Update on the pathological processes, molecular biology, and clinical utility of N-acetylcysteine in chronic obstructive pulmonary disease. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease* 2014; 9:825.
56. Baynes J.W., Thorpe S.R.: Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48(1): 1-9.
57. Wang, Y., & Walsh, S. W.: Placental mitochondria as a source of oxidative stress in pre-eclampsia. *Placenta* 1998; 19(8): 581-586.
58. Griendling, K. K., Sorescu, D., & Ushio-Fukai, M.: NAD (P) H oxidase role in cardiovascular biology and disease. *Circulation research* 2000; 86(5): 494-501.
59. Eis A.L., Brockman D.E., Pollock J.S., Myatt L.: Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human villous and extravillous trophoblast populations and expression during syncytiotrophoblast formation in vitro. *Placenta* 1995; 16: 113–126.
60. Moncada, S. R. M. J., Palmer, R. M. L., & Higgs, E.: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological reviews* 1991; 43(2): 109-142.
61. Radi, R., Rodriguez, M., Castro, L., Telleri, R.: Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Archives of biochemistry and biophysics* 1994; 308(1): 89-95.
62. Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., & Freeman, B. A. (1991). Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Archives of biochemistry and biophysics* 1991; 288(2): 481-487.
63. Ischiropoulos, H., Zhu, L., Chen, J., Tsai, M., Martin, J. C., Smith, C. D., & Beckman, J. S.: Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1992; 298(2): 431-437.

64. Myatt L., Rosenfield R.B., Eis A.L., Brockman D.E., Greer I., Lyall F.: Nitrotyrosine residues in placenta. Evidence of peroxynitrite formation and action. *Hypertension* 1996; 28: 488-493.
65. Myatt, L., Cui, X.: Oxidative stress in the placenta. *Histochemistry and cell biology* 2004; 122(4): 369-382.
66. Hempstock J., Bao Y.P., Bar-Issac M., Segaren N., Watson A.L., Charnock-Jones D.S., Jauniaux E., Burton G.J.: Intralobular differences in antioxidant enzyme expression and activity reflect the pattern of maternal arterial bloodflow within the human placenta. *Placenta* 2003; 24: 517-523
67. Boskabadi, H., Moeini, M., Tara, F., Tavallaie, S., Saber, H., Nejati, R., ... & Ghayour-Mobarhan, M.: Determination of prooxidant-antioxidant balance during uncomplicated pregnancy using a rapid assay. *Journal of Medical Biochemistry* 2012; 32(3): 227-232.
68. Sánchez-Aranguren, L. C., Prada, C. E., Riaño-Medina, C. E., & Lopez, M. (2014). Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress. *Frontiers in physiology* 2014; 5:1-11.
69. Hubel, C. A.: Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Experimental Biology and Medicine* 1999; 222(3): 222-235.
70. Coughlan, M. T., Vervaaert, P. P., Permezel, M., Georgiou, H. M., & Rice, G. E.: Altered placental oxidative stress status in gestational diabetes mellitus. *Placenta* 2004; 25(1): 78-84.
71. Grossman, E.: Does increased oxidative stress cause hypertension?. *Diabetes care* 2008; 31(Supplement 2): 185-189.
72. Lowell, B. B., & Shulman, G. I.: Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 2005; 307(5708): 384-387.
73. Du, X. L., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I. G., Goldberg, H., Ziyadeh, F., ... & Brownlee, M.: Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000; 97(22): 12222-12226.

74. Brownlee M: The Pathobiology of Diabetic Complications A Unifying Mechanism. *Diabetes* 2005; 54 (6): 1615-1625.
75. Witko-Sarsat, V., Nguyen-Khoa, T., Jungers, P., Drüeke, T. B., & Descamps-Latscha, B.: Advanced oxidation protein products as a novel molecular basis of oxidative stress in uraemia. *Nephrology Dialysis Transplantation* 1999; 14(suppl 1): 76-78.
76. Dalle-Donnea I., Rossib R., Giustarinib D., Milzania A., Colombo R.. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 2003; 329: 23-38.
77. Vlassara, H., & Uribarri, J.: Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: cause, effect, or both?. *Current diabetes reports* 2014; 14(1): 1-10.
78. Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A.: Protein carbonylation in human diseases. *Trends in molecular medicine* 2003; 9(4): 169-176.
79. Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., & Grodsky, G. M.: Are Oxidative Stress– Activated Signaling Pathways Mediators of Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction? *Diabetes* 2003; 52(1): 1-8.
80. Dziągiewska-Gęsiak, S., Wysocka, E., Michalak, S., Nowakowska-Zajdel, E., Kokot, T., & Muc-Wierzoń, M.: Role of lipid peroxidation products, plasma total antioxidant status, and Cu-, Zn-superoxide dismutase activity as biomarkers of oxidative stress in elderly prediabetics. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2014; 2014: 1-9.
81. Kumawat, M., Sharma, T. K., Singh, I., Singh, N., Singh, S. K., Ghalaut, V. S., ... & Vardey, S. K.: Decrease in antioxidant status of plasma and erythrocytes from geriatric population. *Disease markers* 2012; 33(6): 303-308.
82. Peuchant, E., Brun, J. L., Rigalleau, V., Dubourg, L., Thomas, M. J., Daniel, J. Y., ... & Gin, H.: Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 diabetes. *Clinical biochemistry* 2004; 37(4): 293-298.
83. Lappas, M., Permezel, M., & Rice, G. E.: Release of proinflammatory cytokines and 8-isoprostane from placenta, adipose tissue, and skeletal muscle from

- normal pregnant women and women with gestational diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; 89(11): 5627-5633.
84. Coughlan, M. T., Permezel, M., Georgiou, H. M., & Rice, G. E.: Repression of oxidant-induced nuclear factor- κ B activity mediates placental cytokine responses in gestational diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; 89(7): 3585-3594.
 85. Arikan, S., Konukoğlu, D., Arikan, C., Akçay, T., & Davas, I.: Lipid peroxidation and antioxidant status in maternal and cord blood. *Gynecologic and obstetric investigation* 2000; 51(3): 145-149.
 86. Mihailović, M., Cvetković, M., Ljubić, A., Kosanović, M., Nedeljković, S., Jovanović, I., & Pešut, O.: Selenium and malondialdehyde content and glutathione peroxidase activity in maternal and umbilical cord blood and amniotic fluid. *Biological trace element research* 2000; 73(1): 47-54.
 87. Toescu, V., Nuttall, S. L., Martin, U., Nightingale, P., Kendall, M. J., Brydon, P., & Dunne, F.: Changes in plasma lipids and markers of oxidative stress in normal pregnancy and pregnancies complicated by diabetes. *Clinical Science* 2004; 106(1): 93-98.
 88. Benzie I.F.F., Strain J.J.: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 1996; 239(1): 70-76.
 89. Stadie W.C.: A method for the determination of methemoglobin in whole blood. *The Journal of Biological Chemistry* 1920; 41:237-241.
 90. Paglia D.E., Valentine W.N.: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1967; 70(1): 158-168
 91. Goldberg D.M., Spooner R.J.: Glutathione reductase. *Methods in enzymology* 1983; 3: 258-65.
 92. Beutler E., Duron O., Kelly B.M.: Improved method for the determine of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1963; 61(5): 882-888.

93. Jonsdottir, S. S.: Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes. *MCN: The American Journal of Maternal/Child Nursing* 2009; 34(4): 266.
94. Sebire, N. J., Jolly, M., Harris, J. P., Wadsworth, J., Joffe, M., Beard, R. W., ... & Robinson, S.: Maternal obesity and pregnancy outcome: a study of 287,213 pregnancies in London. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity* 2001; 25(8): 1175-1182.
95. Torloni, M. R., Betrán, A. P., Horta, B. L., Nakamura, M. U., Atallah, A. N., Moron, A. F., & Valente, O.: Prepregnancy BMI and the risk of gestational diabetes: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Obesity Reviews* 2009; 10(2): 194-203.
96. Usha Kiran, T. S., Hemmadi, S., Bethel, J., & Evans, J.: Outcome of pregnancy in a woman with an increased body mass index. *BJOG: an international journal of obstetrics & gynaecology* 2005; 112(6): 768-772.
97. Mahmoud, F. F., Dashti, A. A., Abul, H. T., & JumaTH, O. A.: Antioxidant Enzymes in Gestational Diabetes: A Study on a Kuwaiti Population. *Bioenergetics* 2014; 3(117): 2.
98. Coughlan M.T., Vervaart P.P., Permezel M., et al.: Altered placental oxidative stress status in gestational diabetes mellitus. *Placenta* 2004; 25:78–84.
99. Carone, D., Loverro, G., Greco, P., Capuano, F., & Selvaggi, L.: Lipid peroxidation products and antioxidant enzymes in red blood cells during normal and diabetic pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 1993; 51(2): 103-109.
100. Wender-Ozegowska, E., Koźlik, J., Biczysko, R., & Ozegowski, S.: Changes of oxidative stress parameters in diabetic pregnancy. *Free radical research*, 2004; 38(8): 795-803.
101. Chaudhary, L., Tandon, O. P., Vaney, N., & Agarwal, N.: Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in gestational diabetics. *Indian journal of physiology and pharmacology* 2003; 47: 441-446.

102. Orhan, H., Önderoglu, L., Yücel, A., & Sahin, G.: Circulating biomarkers of oxidative stress in complicated pregnancies. *Archives of gynecology and obstetrics* 2003; 267(4): 189-195.
103. Al-Shebly, M. M., & Mansour, M. A. (2012). Evaluation of oxidative stress and antioxidant status in diabetic and hypertensive women during labor. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2012: 1-7.
104. López-Tinoco C., Roca M., García-Valero A., Murri M., Tinahones F.J., Segundo C., Bartha J.L., Aguilar-Diosdado M.: Oxidative stress and antioxidant status in patients with late-onset gestational diabetes mellitus, *Acta Diabetologica* 2013, 50(2):201-208.
105. Sripriya L., Vijayalakshmi M.: Altered lipid profile and antioxidant status of gestational International Journal of Research in Pharmaceutical and Nano Sciences 2013; 2(5): 622- 627.
106. Dey, P., Gupta, P., Acharya, N. K., Rao, S. N., Ray, S., Chakrabarty, S., ... & Rao, A.: Antioxidants and lipid peroxidation in gestational diabetes--a preliminary study. *Indian J Physiol Pharmacol* 2008; 52(2): 149-156.
107. Rajdl, D., Racek, J., Steinerova, A., Novotny, Z., Stozicky, F., Trefil, L., & Siala, K.:m Markers of oxidative stress in diabetic mothers and their infants during delivery. *Physiological research* 2005; 54(4): 429.
108. Jamil, D., Al-Aubaidy, H., Smith, L., & Jelinek, H.: Oxidative DNA Damage in Gestational Diabetes Melitus: Corelation with Antioxidants in an Iraqi Cohort. *International Journal of Biochemistry Research & Review* 2014; 4(5): 410-419.
109. Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., & Casini, A. F.: The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical pharmacology* 2003; 66(8): 1499-1503.
110. Devrim, E., Tarhan, İ., Ergüder, İ. B., & Durak, İ.: Oxidant/antioxidant status of placenta, blood, and cord blood samples from pregnant women supplemented with iron. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 2006; 13(7): 502-505.

111. Lachili, B., Hininger, I., Faure, H., Arnaud, J., Richard, M. J., Favier, A., & Roussel, A. M.: Increased lipid peroxidation in pregnant women after iron and vitamin C supplementation. *Biological trace element research* 2001; 83(2): 103-110.
112. Zhuang T., Han H., Yang Z.: Oxidative Stress and Gestational Diabetes. *Nutrients* 2014; 6(9): 3968-3980.
113. Javadian, P., Alimohamadi, S., Gharedaghi, M. H., & Hantoushzadeh, S. (2014). Gestational diabetes mellitus and iron supplement; Effects on pregnancy outcome. *Acta Medica Iranica*, 52(5), 385-389.
114. Bowers K., Yeung E., Williams M.A., et al.: A prospective study of prepregnancy dietary iron intake and risk for gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2011; 34:1557–63
115. Helin A., Kinnunen T.I., Raitanen J., Ahonen S., Virtanen S.M., Luoto R.: Iron intake, haemoglobin and risk of gestational diabetes: a prospective cohort study. *BMJ Open*. 2012; 25;2(5).
116. Armbruster, D. A.; Fructosamine: structure, analysis, and clinical usefulness. *Clinical Chemistry* 1987; 33(12): 2153-2163.
117. Hønger, P. E.:Albumin metabolism in normal pregnancy. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* 1968; 21(1): 3-9.
118. Li, K., & Yang, H. X.:Value of fructosamine measurement in pregnant women with abnormal glucose tolerance. *Chinese medical journal* 2006; 119(22): 1861-1865.
119. Whiting, P. H., Kalansooriya, A., Holbrook, I., Haddad, F., & Jennings, P. E.: Relationship between chronic glycaemic control and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *British journal of biomedical science* 2008; 65(2): 71-74.
120. Rosediani, M., Azidah, A. K., & Mafauzy, M.: Correlation between fasting plasma glucose, post prandial glucose and glycated haemoglobin and fructosamine. *The Medical journal of Malaysia* 2006; 61(1): 67-71.
121. Cefalu, W. T., Prather, K. L., Chester, D. L., Wheeler, C. J., Biswas, M., & Pernod, M. L.: Total serum glycosylated proteins in detection and monitoring of gestational diabetes. *Diabetes care* 1990; 13(8): 872-875.

122. Bozkurt, L., Göbl, C. S., Pfligl, L., Leitner, K., Bancher-Todesca, D., Luger, A., ... & Kautzky-Willer, A.: Pathophysiological characteristics and impact of obesity in women with early and late manifestation of GDM diagnosed by the IADPSG criteria. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2015;
123. Catalano, P. M., Tyzbir, E. D., Roman, N. M., Amini, S. B., & Sims, E. A.: Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. *American journal of obstetrics and gynecology* 1991; 165(6): 1667-1672.
124. Catalano, P. M., Drago, N. M., & Amini, S. B.: Longitudinal changes in pancreatic β -cell function and metabolic clearance rate of insulin in pregnant women with normal and abnormal glucose tolerance. *Diabetes Care* 1998; 21(3): 403-408.
125. Winkler, G., Cseh, K., Baranyi, É., Melczer, Z., Speer, G., Hajós, P., ... & Karádi, I.: Tumor necrosis factor system in insulin resistance in gestational diabetes. *Diabetes research and clinical practice* 2002; 56(2): 93-99.
126. Choi, S. W., Benzie, I. F., Ma, S. W., Strain, J. J., & Hannigan, B. M.: Acute hyperglycemia and oxidative stress: direct cause and effect?. *Free Radical Biology and Medicine* 2008; 44(7): 1217-1231.
127. Aronson, D.: Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. *Advances in cardiology* 2008; 45: 1.
128. Kalousová, M., Zima, T., Tesař, V., Dusilová-Sulková, S., & Škrha, J.: Advanced glycoxidation end products in chronic diseases—clinical chemistry and genetic background. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2005; 579(1): 37-46.
129. Rytter, E., Vessby, B., Åsgård, R., Johansson, C., Sjödin, A., Abramsson-Zetterberg, L., ... & Basu, S. (2009). Glycaemic status in relation to oxidative stress and inflammation in well-controlled type 2 diabetes subjects. *British journal of nutrition*, 101(10), 1423-1426.
130. Rehema, A., Zilmer, K., Klaar, U., Karro, H., Kullisaar, T., & Zilmer, M.: Ferrous iron administration during pregnancy and adaptational oxidative stress (Pilot study). *Medicina (kaunas)* 2004; 40(6): 547-552.

131. Mihailović, M., Cvetković, M., Ljubić, A., Kosanović, M., Nedeljković, S., Jovanović, I., & Pešut, O.: Selenium and malondialdehyde content and glutathione peroxidase activity in maternal and umbilical cord blood and amniotic fluid. *Biological trace element research* 2000; 73(1): 47-54.
132. Toescu, V., Nuttall, S. L., Martin, U., Nightingale, P., Kendall, M. J., Brydon, P., & Dunne, F.: Changes in plasma lipids and markers of oxidative stress in normal pregnancy and pregnancies complicated by diabetes. *Clinical Science* 2004; 106(1): 93-98.
133. Casey, B. M., Lucas, M. J., McIntire, D. D., & Leveno, K. J.: Pregnancy outcomes in women with gestational diabetes compared with the general obstetric population. *Obstetrics & Gynecology* 1997; 90(6): 869-873.
134. Pöyhönen-Alho, M., Ebeling, P., Saarinen, A., & Kaaja, R.: Decreased variation of inflammatory markers in gestational diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews* 2011; 27(3): 269-276.
135. Retnakaran, R., Hanley, A. J., Raif, N., Connelly, P. W., Sermer, M., & Zinman, B. (2003). C-reactive protein and gestational diabetes: the central role of maternal obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2003; 88(8): 3507-3512.
136. Korkmazer, E., & Solak, N.: Correlation between inflammatory markers and insulin resistance in pregnancy. *Journal of Obstetrics & Gynaecology* 2015; (0): 1-4.

9. Spis Tabel

Tabela 1 Kryteria klasyfikacji i rozpoznania cukrzycy po raz pierwszy wykrytej w ciąży [4]. Do rozpoznania wystarczy uzyskanie jednego wyniku spełniającego kryteria.	8
Tabela 2 Charakterystyka pacjentek z grupy kobiet chorych na cukrzycę ciążową....	20
Tabela 3 Charakterystyka grupy kontrolnej.....	21
Tabela 4. Procedura analityczna oznaczeń FRAP	23
Tabela 5. Procedura analityczna oznaczeń aktywności peroksydazy glutationowej w osoczu	24
Tabela 6. Procedura analityczna oznaczeń aktywności reduktazy glutationowej w osoczu	26
Tabela 7. Procedura analityczna oznaczeń zredukowanego glutationu w hemolizacie krwinek czerwonych	27
Tabela 8 Badania biochemiczne i immunochemiczne, metodyka oraz przedziały referencyjne.....	29
Tabela 9. Charakterystyka demograficzna i kliniczna grupy badanej i kontrolnej.....	31
Tabela 10. Porównanie wskaźników stresu oksydacyjnego i wyrównania metabolicznego cukrzycy między grupami	32
Tabela 11. Ocena korelacji wskaźników stresu oksydacyjnego ze stężeniem glukozy i fruktozaminy w grupie kobiet z cukrzycą ciążową i w grupie kontrolnej.....	33
Tabela 12. Ocena korelacji wskaźników stresu oksydacyjnego i stężenia peptydu C w grupie kobiet z cukrzycą ciążową i w grupie kontrolnej.	34
Tabela 13. Charakterystyka modeli regresji logistycznej wykorzystanej w analizie obu porównywanych grup.....	37
Tabela 14. Model I regresji logistycznej dla grupy kontrolnej	38
Tabela 15. Model I regresji logicznej dla grupy badanej.....	39
Tabela 16. Model II regresji logistycznej dla grupy kontrolnej.....	40
Tabela 17. Model II regresji logistycznej dla grupy badanej.....	41
Tabela 18. Modyfikacja modelu I regresji logistycznej - Mediana aktywności GPx w osoczu	42

Tabela 19. Modyfikacja modelu I regresji logistycznej - Mediana stężenia reszt karbonylowych.....	44
Tabela 20. Modyfikacja modelu II regresji logistycznej - Mediana stężenia reszt karbonylowych [µg/ml]	45

10. Spis Rysunków

Rysunek 1. Współzależność pomiędzy stężeniem Peptydu C [ng/ml] a FRAP [mmol/l] u zdrowych ciężarnych.	34
Rysunek 2 Współzależność pomiędzy stężeniem Peptydu C [ng/ml] a logarytmem GR [U/l] u zdrowych ciężarnych.....	35
Rysunek 3 Współzależność pomiędzy stężeniem Peptydu C [ng/ml] a logarytmem GR [U/l] u zdrowych ciężarnych.....	36

11. Streszczenie

Słowa kluczowe: cukrzyca ciążowa, stres oksydacyjny, reaktywne formy tlenu, antyoksydanty, wyrównanie metaboliczne

Wstęp: Hiperglikemia występująca w ciąży to jedno z kilku głównych powikłań dotyczących kobiety przed porodem. Stres oksydacyjny to stan braku wyrównania między produkcją reaktywnych form tlenu oraz działaniem obrony antyoksydacyjnej. W fizjologicznej ciąży dochodzi do nasilenia przemian tlenowych i zwiększonego generowania reaktywnych form tlenu, głównie w łożysku. Jednocześnie zwiększa się aktywność i stężenie antyoksydantów. Cukrzyca jest stanem, w którym dochodzi do zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu. Hiperglikemia wklajająca ciążę może zatem prowadzić do zaburzenia równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej u ciężarnych.

Cel pracy: Celem pracy była ocena zaburzeń równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej u kobiet w ciąży powikłanej cukrzycą przebiegającą z umiarkowaną hiperglikemią.

Materialy i metody: Oznaczenia parametrów obrony antyoksydacyjnej, wyrównania metabolicznego oraz CRP wykonano u 52 pacjentek z cukrzycą ciążową oraz 36 zdrowych ciężarnych. Oznaczenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej osocza (FRAP), aktywności reduktazy glutationowej (GR), aktywności peroksydazy glutationowej (GPx) w osoczu oraz stężenia zredukowanego glutationu (GSH) w hemolizacie krwinek czerwonych, wykonano spektrofotometrycznie. W surowicy oznaczono: grupy karbonyłowe (metodą immunoenzymatyczną), CRP (metoda immunoturbidymetryczna o wysokiej czułości), fruktozaminę (metodą kolorymetryczną) oraz peptyd- C (immunochemiczną metodą kompetywną).

Wyniki: Pacjentki z grupy badanej były w znamienne starszej ciąży oraz charakteryzowały się większą masą ciała przed ciążą. Aktywności reduktazy i peroksydazy glutationowej w osoczu były znamienne niższe u kobiet z GDM. Stężenie antyoksydantów drobnocząsteczkowych mierzonych za pomocą parametru FRAP oraz zredukowanego glutationu (GSH) nie różniło się między grupami. Stężenie

fruktozaminy oraz peptydu C było niższe w grupie badanej.. Wykazano istotną korelację między aktywnością peroksydazy glutationowej oraz fruktozaminy w grupie kontrolnej. Nie wykazano istotnej zależności między pozostałymi markerami obrony antyoksydacyjnej, a stężeniami fruktozaminy oraz glukozy. Istotny związek wykazano między stężeniem peptydu C oraz FRAP, GR oraz GSH w grupie zdrowych ciężarnych. Wykorzystując regresję logistyczną wykazano istotną zależność między stężeniem peptydu C oraz aktywnością peroksydazy glutationowej. Stężenie reszt karbonylowych było znamienne wyższe u kobiet z GDM, natomiast nie zaobserwowano zmian w stężeniu CRP między grupami. Nie wykazano związku między markerami obrony antyoksydacyjnej a suplementacją żelazem.

Wnioski: Nie zaobserwowano zmian stężenia antyoksydantów drobnocząsteczkowych zewnątrz oraz wewnątrzkomórkowych, natomiast stwierdzono spadek aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Mimo dobrze wyrównanej metabolicznie cukrzycy, u kobiet z GDM stwierdzono zwiększenie stężenia reszt karbonylowych, co świadczy o nasilonym procesie glikooksydacji białek. Nie wykazano związku między stężeniem CRP a markerami stresu oksydacyjnego. Zaobserwowano korelację między stężeniem peptydu C oraz markerami obrony antyoksydacyjnej u zdrowych ciężarnych co może świadczyć o wpływie insulinooporności na równowagę oksydacyjno-antyoksydacyjną. Podsumowując, w dobrze wyrównanej cukrzycy ciążowej dochodzi do zjawiska stresu oksydacyjnego.

12. Abstract

Key words; gestational diabetes, oxidative stress, reactive oxygen species, antioxidants,

Background: Hyperglycemia in pregnancy is one of the major complications affecting women before delivery. Oxidative stress is an imbalance between the production of reactive oxygen species and antioxidant defense. In the physiological pregnancy increased oxygen metabolism and generation of reactive oxygen species occur, especially in placenta. At the same time concentration and activity of antioxidants are increased. Diabetes leads to higher reactive oxygen species production. Hyperglycemia complicating pregnancy can therefore result in the oxidative-antioxidative imbalance in pregnant women.

Objective: The aim of the study was to evaluate the oxidative-antioxidative imbalance in pregnancy complicated by well controlled diabetes.

Materials and methods: Measurements of antioxidant defense markers, glycemic control markers and CRP were performed on a group of 52 diabetic pregnant and 36 healthy pregnant women. Total plasma antioxidant capacity (FRAP), glutathione reductase activity (GR), glutathione peroxidase activity (GPx) in plasma and reduced glutathione in red blood cells hemolysate were measured spectrometrically. Tests performed in serum included carbonyl groups (enzymeimmunoassay), hsCRP (immunoturbidymetric assay), fructosamine (colorymetric assay) and C-peptid (competitive immunoassay).

Results: Diabetic patients were in later weeks of gestation and had higher weight before pregnancy. Glutathione reductase and peroxidase activity in plasma were significantly lower in GDM women. There was no difference in the level of small molecule antioxidants intracellular and extracellular measured as FRAP and GSH. Concentration of serum fructosamine and C-peptid were significantly lower in GDM. The significant correlation between glutathione peroxidase activity and fructosamine concentration in healthy pregnancy was found. We did not observe any other relationships between markers of antioxidant defense and fructosamine or glucose. The significant associations between C-peptid level and FRAP, GR and GSH in healthy pregnant

women were observed. The relationship between C-peptid and activity of glutathione peroxidase was found using logistic regression. Carbonyl groups were elevated in GDM patients. No differences in CRP level between GDM and healthy pregnant women was found. No impact of iron supplementation on markers of oxidative stress in the the studied groups was observed.

Conclusions: We did not observed differences in concentration of small molecule intracellular and extracellular antioxidants between groups, but the antioxidant enzymes activity was decreased. Although patients with GDM were well controlled, increased serum carbonyl groups level was observed, which reflected higher protein glycooxydation. We did not found relationship between serum CRP and markers of oxidative stress. significant correlation between C-peptide and antioxidant markers in healthy pregnancy can indicate influence of insulin resistance on oxidative-antioxidative balance. In summary, in a well controlled gestational diabetes oxidative stress occurs.