

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Ewa Wysocka

Ocena stresu metabolicznego  
u osób ze zwiększonym ryzykiem rozwoju cukrzycy typu 2  
w oparciu o rozszerzony model  
testu doustnego obciążenia glukozą

Poznań 2013

*Tytuł angielski*

Evaluation of the metabolic stress in patients with increased risk of type 2 diabetes mellitus based on an extended model of oral glucose tolerance test

*Recenzja wydawnicza*

Prof. dr hab. med. Lech Torliński

*Korekta wydawnicza*

Magdalena Knapowska-Niziołek

*Skład, łamanie i projekt okładki*

Bartłomiej Wąsiel

© Copyright by Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,  
Poznań 2013

© Copyright by Ewa Wysocka, Poznań 2013

ISBN 978-83-7597-214-6

WYDAWNICTWO NAUKOWE UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO  
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU  
ul. Bukowska 70, 60-812 Poznań  
[www.wydawnictwo.ump.edu.pl](http://www.wydawnictwo.ump.edu.pl)

Ark. wyd. 10,4. Ark. druk. 11,8.

Format B5. Zam. 113/13.

Druk ukończono w czerwcu 2013 r.

# Spis treści

Indeks skrótów i nazw . . . . .	5
1. Wstęp . . . . .	9
1.1. Stany zwiększonego ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2 . . . . .	9
1.2. Stres oksydacyjny . . . . .	16
1.3. Perspektywy <i>prediabetes</i> . . . . .	20
2. Cel pracy . . . . .	23
3. Materiał i metody . . . . .	24
3.1. Osoby badane . . . . .	24
3.2. Metodyka badań . . . . .	25
3.2.1. Test doustnego obciążenia glukozą (OGTT) . . . . .	25
3.2.2. Pobieranie materiału do badania . . . . .	25
3.2.3. Metody oznaczania parametrów gospodarki węglowodanowej i lipidowej, morfologii krwi obwodowej i białka C-reaktywnego . . . . .	26
3.2.4. Metody oceny insulinowrażliwości-insulinooporności . . . . .	28
3.2.5. Metody oceny parametrów stresu oksydacyjnego . . . . .	29
3.2.5.1. Metoda oznaczania stężenia substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w osoczu . . . . .	29
3.2.5.2. Metoda oznaczania całkowitego stanu antyoksydacyjnego (TAS) w osoczu . . . . .	30
3.2.5.3. Metoda oznaczania aktywności dysmutazy ponadtlenkowej SOD-1 w erytrocytach (SOD) . . . . .	30
3.2.6. Badanie ekspresji genu kodującego cytoplazmatyczną dysmutazę ponadtlenkową SOD-1 w PBMC (xSOD) . . . . .	32
3.2.7. Dynamiczna ocena parametrów stresu oksydacyjnego . . . . .	35
3.2.8. Analiza statystyczna . . . . .	35
4. Wyniki . . . . .	37
4.1. Charakterystyka badanych grup . . . . .	37
4.2. Porównania między badanymi grupami . . . . .	51
4.2.1. Parametry gospodarki węglowodanowej i lipidowej . . . . .	51
4.2.2. Wskaźniki insulinowrażliwości-insulinooporności . . . . .	60
4.2.3. Markery stresu oksydacyjnego . . . . .	68
4.3. Ocena korelacji i regresji wielokrotnej . . . . .	89
4.3.1. Ocena wzajemnej korelacji parametrów stresu oksydacyjnego w badanych grupach 1-6 . . . . .	89

4.3.2. Ocena związku parametrów stresu oksydacyjnego z czynnikami ryzyka chorób sercowo-naczyniowych w badanych grupach 1–6 .....	90
4.3.3. Ocena związku parametrów stresu oksydacyjnego z czynnikami ryzyka chorób sercowo-naczyniowych w całej badanej populacji .....	94
4.4. Analiza krzywych ROC .....	98
5. Dyskusja .....	107
6. Wnioski .....	121
7. Piśmiennictwo .....	122
8. Streszczenie .....	135
9. Summary .....	139

## Indeks skrótów i nazw

A	absorbancja
ABTS	2,2'-Azyno-di-3-etylobenzotiazolinosiarczan
ADA	A amerykańskie Towarzystwo Diabetologiczne (ang. <i>American Diabetes Association</i> )
AGEs	końcowe produkty glikacji (ang. <i>advanced glycation end-products</i> )
ALS	stwardnienie zanikowe boczne (ang. <i>amyotrophic lateral sclerosis</i> )
AP-1	czynnik transkrypcyjny (ang. <i>activating protein-1</i> )
AP-2	czynnik transkrypcyjny (ang. <i>activating protein-2</i> )
ARE	nazwa obszaru genu (ang. <i>antioxidant responsive element</i> )
ATP	adenozynotrifosforan
AUC	pole pod krzywą (ang. <i>area under curve</i> )
BMI	wskaźnik masy ciała (ang. <i>body mass index</i> )
CAT	katalaza
CCS	białko opiekuńcze, umieszczające miedź w SOD (ang. <i>copper chaperone for SOD</i> )
cDNA	komplementarny DNA (ang. <i>complementary DNA</i> )
ChSN	choroby sercowo-naczyniowe
Cu	miedź (łac. <i>cuprum</i> )
CV	współczynnik zmienności (ang. <i>coefficient of variation</i> )
DBP	rozkurczowe ciśnienie tętnicze krwi (ang. <i>diastolic blood pressure</i> )
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy
dNTP	deoksynukleotydy
DPP	ang. <i>Diabetes Prevention Program</i>
DTT	1,4-dithio-DL-threitol
EC-SOD	zewnątrzkomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa Cu,Zn-SOD
EDTA	kwas etylenodiaminotetraoctowy, inaczej: kwas wersenowy
Elk 1	czynnik transkrypcyjny
Fe	żelazo (łac. <i>ferrum</i> )
FRAP	ang. <i>ferric reducing/antioxidant power</i>
FSIVGTT	ang. <i>frequently sampled intravenous glucose tolerance test</i>
GAPDH	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego
GDM	cukrzyca ciężarnych (ang. <i>gestational diabetes mellitus</i> )
GIP	glukozozależny polipeptyd insulinotropowy
GLP-1	glukagonopodobny peptyd 1
GLUT-4	transporter glukozy typu 4 (ang. <i>glucose transporter type 4</i> )
GSH	postać zredukowana glutationu

GSSG	postać utleniona glutationu
GPx	peroksydaza glutationu
Hb	hemoglobina
HbA1c	glikowana hemoglobina A1c
HDL	lipoproteina o wysokiej gęstości (ang. <i>high density lipoprotein</i> )
HDL-C	cholesterol frakcji HDL
HOMA-IR	ang. <i>homeostasis model assessment of insulin resistance</i>
hsCRP	białko C-reaktywne mierzone metodą o wysokiej czułości (ang. hs – <i>high sensitivity</i> )
IDF	Międzynarodowa Federacja Cukrzycowa (ang. <i>International Diabetes Federation</i> )
IFG	nieprawidłowa glikemia na czczo (ang. <i>impaired fasting glycemia</i> )
IGT	upośledzona tolerancja glukozy (ang. <i>impaired glucose tolerance</i> )
IκB-α	białko hamujące dla NF-κB (ang. <i>inhibitory protein κB-α</i> )
IS	insulinowrażliwość (ang. <i>insulin sensitivity</i> )
ISI	wskaźnik insulinowrażliwości (ang. <i>insulin sensitivity index</i> )
ISI <sub>Matsuda</sub>	Indeks Matsudy
ISI <sub>0,120</sub>	Indeks Gutt
IR	insulinooporność (ang. <i>insulin resistance</i> )
LDL	lipoproteina o niskiej gęstości (ang. <i>low density lipoprotein</i> )
LDL-C	cholesterol frakcji LDL
MDA	malonylodialdehyd
MPG	średnie stężenie glukozy w osoczu (ang. <i>mean plasma glucose</i> )
mRNA	informacyjny RNA (ang. <i>messengerRNA</i> )
MSI	średnie stężenie insuliny w surowicy (ang. <i>mean serum insulin</i> )
NAD <sup>+</sup>	utleniona forma dinukleotydu nikotynamido-adeninowego
NADH	zredukowana forma dinukleotydu nikotynamido-adeninowego
NADP <sup>+</sup>	utleniona forma fosforanu dinukleotydu nikotynamido-adeninowego
NADPH	zredukowana forma fosforanu dinukleotydu nikotynamido-adeninowego
ncRNA	niekodujący RNA (ang. <i>non-coding RNA</i> )
NF-κB	jądrowy czynnik kappaB
NGT	prawidłowa tolerancja glukozy (ang. <i>normal glucose tolerance</i> )
NGSP	Narodowy Program Standaryzacji Hemoglobiny Glikowanej (ang. <i>National Glycohemoglobin Standardization Program</i> )
OGTT	test doustnego obciążenia glukozą (ang. <i>oral glucose tolerance test</i> )
oligo(dT)	krótka pojedyncza sekwencja deoksytyminy
QUICKI	ang. <i>quantitative insulin sensitivity check index</i>
PBMC	jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (ang. <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )

PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i> )
PPRE	ang. <i>peroxisome proliferator-responsive element</i>
PTD	Polskie Towarzystwo Diabetologiczne
R	współczynnik korelacji Spearmana
RFA	reaktywne formy azotu
RFT	reaktywne formy tlenu
RNA	kwasy rybonukleinowe
RNaza	rybonukleaza
ROC	ang. <i>receiver operating characteristic</i>
RQ PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym z techniką oszacowania początkowej ilości badanego DNA (ang. <i>real-time quantitative PCR</i> )
RT PCR	reakcja odwrotnej transkrypcji (ang. <i>reverse transcription PCR</i> )
SE	błąd standardowy średniej (ang. <i>standard error of mean</i> )
SBP	skurczowe ciśnienie tętnicze krwi (ang. <i>systolic blood pressure</i> )
SO	stres oksydacyjny
SOD	dysmutaza ponadtlenkowa
sod1	gen kodujący enzym SOD-1
sod2	gen kodujący enzym SOD-2
sod3	gen kodujący enzym SOD-3
SOD-1	cytoplazmatyczna dysmutaza ponadtlenkowa Cu,Zn-SOD
SOD-2	mitochondrialna dysmutaza ponadtlenkowa Mn-SOD
SOD-3	zewnątrzkomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa Cu,Zn-SOD
SP1	czynnik transkrypcyjny (ang. <i>specificity protein 1</i> )
TAG	triacyloglicerole
TAS	całkowity stan antyoksydacyjny (ang. <i>total antioxidant status</i> )
TBA	kwasy tiobarbiturowe (ang. <i>thiobarbituric acid</i> )
TBARS	substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym (ang. <i>thiobarbituric acid-reacting substances</i> )
T-C	cholesterol całkowity (ang. <i>total cholesterol</i> )
T2DM	cukrzyca typu 2
TLS	lecniczy styl życia (ang. <i>therapeutic lifestyle</i> )
TMP	1,1,3,3-tetraetoksypropan-4-metyloksypropan
VLDL	lipoproteina o bardzo niskiej gęstości (ang. <i>very low-density lipoprotein</i> )
WBC	liczba białych krwinek (ang. <i>white blood cell</i> )
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i> )
WKT	wolne kwasy tłuszczowe
xSOD	ekspresja genu kodującego SOD-1
XRE	nazwa obszaru genu (ang. <i>xenobiotic responsive element</i> )
YY1	czynnik transkrypcyjny





# 1. Wstęp

Cukrzyca jest jedną z nielicznych chorób, w definicji których umieszcza się przewlekłe powikłania choroby – to one stanowią o chorobowości i śmiertelności, o społecznym wymiarze tego stanu patologicznego [165]. Charakterystycznymi elementami obrazu klinicznego są więc: swoista dla cukrzycy mikroangiopatia (głównie retinopatia i nefropatia cukrzycowa), najczęstsza, choć nieswoista, makroangiopatia sprzyjająca rozwojowi chorób sercowo-naczyniowych (ChSN) (manifestująca się chorobą tętnic wieńcowych, mózgowych i kończyn dolnych), neuropatia cukrzycowa (do której przyczynia się glukotoksyczność i skutki ww. angiopatii) oraz zaćma. Związek uszkodzeń narządowych z przewlekłą hiperglikemią został potwierdzony w badaniach wielośrodkowych [50, 158].

Powszechnie wiadomo, że około 90% przypadków cukrzycy na świecie stanowi cukrzyca typu 2 (T2DM), rozwijająca się wolno, w większości towarzysząca nadmiernej masie ciała, małej aktywności fizycznej i nadmiernemu spożyciu kalorii, zwłaszcza cukrów prostych [93]. T2DM w swojej naturalnej historii poprzedzona jest okresem dysglikemii, już nie prawidłowej, ale jeszcze nie cukrzycowej, nazywanym stanem przedcukrzycowym (ang. *prediabetes*) lub ostatnio – stanem zwiększonego ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2 [9, 10, 177].

W latach 90. ubiegłego stulecia pojedyncze doniesienia o występowaniu przewlekłych powikłań cukrzycowych u pacjentów z rozpoznaniem, na podstawie badań biochemicznych, stanu przedcukrzycowego [1] budziły zdziwienie, ale też stanowiły inspirację do głębszych studiów nad patobiochemią cukrzycy/dysglikemii.

## 1.1. Stany zwiększonego ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2

### *Krótką historią stanów przedcukrzycowych (prediabetes)*

W latach 50. poprzedniego wieku pojęcie „stan przedcukrzycowy” stosowano w położnictwie, głównie retrospektywnie, określając czas poprzedzający rozpoznanie cukrzycy typu 2 u kobiet z niepowodzeniami położniczymi w wywiadzie [116]. Tego samego określenia użyto później dla określenia czasu poprzedzającego rozpoznanie cukrzycy typu 2.

W latach 60. i 70. prowadzono działania z zakresu diagnostyki laboratoryjnej dla sklasyfikowania zaburzeń tolerancji glukozy, co pozwoliło Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) ogłosić w 1980 roku kryteria rozpoznawania cukrzycy

[163] i zmodyfikować je w 1985 r. [164]. Wyodrębniono pewnego rodzaju zaburzenie metabolizmu glukozy – upośledzoną tolerancję glukozy (ang. *impaired glucose tolerance*, IGT), nie przedstawiając jej jednoznacznie jako etapu w rozwoju cukrzycy.

Badania nad epidemiologią cukrzycy typu 2 i jej profilaktyką znajdowały w kolejnych latach zastosowanie w obniżaniu wartości glikemii na czczo służących do rozpoznawania cukrzycy, jak i tych świadczących o normoglikemii. Ponownie zaczęto używać określenia „*prediabetes*”. W 1997 roku Amerykańskie Towarzystwo Diabetologiczne [8], a w 1998 roku Światowa Organizacja Zdrowia [6], poszerzyły stan przedcukrzycowy o kategorię: nieprawidłowa glikemia na czczo (ang. *impaired fasting glycemia*, IFG).

Według danych Międzynarodowej Federacji Cukrzycowej (International Diabetes Federation, IDF) za 2012 rok, 371 mln dorosłych (w wieku 20–79 lat) na świecie miało cukrzycę i liczba ta wzrośnie do ok. 552 mln w 2030 roku. Ogólnoświatową częstość występowania choroby szacuje się na 8,3%. Największą liczbę cukrzyków stanowią osoby między 40. i 59. rokiem życia. Około 50% osób chorujących na cukrzycę, tj. blisko 183 mln ludzi, pozostaje niezdiagnozowana. W Europie częstość występowania cukrzycy wynosi 6,7% i około 38% populacji cukrzyków (blisko 21 mln) pozostaje nierozpoznana. Częstość występowania upośledzonej tolerancji glukozy na świecie w 2012 roku ustalono na 6,3%; 280 mln ludzi prezentowało IGT, a liczba ich wzrośnie do 398 mln w 2030 roku [79].

Dane IDF dla Polski za 2012 r. wskazują na około 10% częstość występowania cukrzycy, co stanowi co najmniej 3 mln dorosłych (20–79 lat) chorujących na cukrzycę, z czego około 1 mln 105 tys. pozostaje niezdiagnozowanych. Częstość występowania IGT szacowano na ok. 18% populacji dorosłych (20–79 lat), co daje 5 mln 257 tys. przypadków upośledzonej tolerancji glukozy [79].

W Polsce od 2010 r. obowiązuje program prewencji i leczenia cukrzycy w ramach „Narodowego programu przeciwdziałania chorobom cywilizacyjnym”. Większość działań skierowana jest do dzieci i młodzieży.

### *Dysglikemia a przewlekłe powikłania cukrzycy*

Kryteria rozpoznania cukrzycy dla glikemii na czczo i glikemii w 120. minucie testu doustnego obciążenia glukozą zostały pierwotnie ustalone w oparciu o stężenia glukozy, przy których narastała częstość rozpoznawania retinopatii cukrzycowej (swoistego powikłania) w badaniach populacyjnych [104]. Nawet jeżeli zgadzamy się, że makroangiopatia, głównie pod postacią choroby niedokrwiennej serca i udaru mózgu, jest główną przyczyną zgonu u pacjentów z T2DM i IGT, stężenia glukozy, przy których częstość tego powikłania narasta, nie są brane pod uwagę w klasyfikacji. Eksperci ubolewają, że z tego powodu

można odnieść wrażenie, iż makroangiopatia cukrzycowa jest mniej istotna niż mikroangiopatyczne konsekwencje choroby [65]. Wyniki badań klinicznych pokazują, że nawet granicznie wysokie stężenia glukozy na czczo są związane ze zwiększoną sztywnością tętnic u osób bez rozpoznania cukrzycy [139], a stan cukrzycowy upośledza właściwości elastyczne tętnic niezależnie od nagromadzenia innych czynników ryzyka miażdżycy [100].

W patobiochemii przewlekłych powikłań cukrzycy rozważa się współdziałanie wielu mechanizmów, spośród których najczęściej w literaturze akcentowane są następujące [11, 16, 85]:

- hiperglikemia,
- nasilone reakcje szlaku polioliowego,
- wzrost aktywności kinazy białkowej C,
- wzmożona glikacja białek (glikosylacja z produkcją i kumulacją końcowych produktów glikacji, ang. *advanced glycation-end products*, AGEs),
- aktywacja prozapalna,
- aktywacja prozakrzepowa (prowadząca do trombofilii cukrzycowej),
- modyfikacja lipoprotein osocza,
- stres oksydacyjny.

U 10% osób z nieprawidłową glikemią na czczo rozpoznano łagodną retinopatię cukrzycową, aczkolwiek w cytowanym badaniu ze Szwecji nie wykonano OGTT dla ostatecznego różnicowania między stanem przedcukrzycowym a cukrzycą [157]. W badaniu amerykańskim – Diabetes Prevention Program – charakterystyczne dla cukrzycy zmiany na dnie oka obserwowano u 7,9% osób z upośledzoną tolerancją glukozy [51]. W populacji azjatyckiej łagodną nieproliferacyjną retinopatię cukrzycową ustalono u 20,9% badanych ze stanem przedcukrzycowym rozpoznany na podstawie OGTT, a wiek, BMI, parametry gospodarki lipidowej i wydolności nerek oraz wydalanie albumin z moczem nie korelowały z retinopatią cukrzycową [35].

W badaniu populacji japońskiej, po wykluczeniu chorób sercowo-naczyniowych, osoby z cukrzycą, stanem przedcukrzycowym i prawidłową tolerancją glukozy prezentowały proteinurię odpowiednio w 11,3, 5,0 i 3,9% [173].

U osób z samoistną neuropatią obwodową (5–14% populacji po 40 r.ż.) w 40% przypadków rozpoznaje się upośledzoną tolerancję glukozy, w porównaniu z 15-procentową częstością występowania IGT w populacji ogólnej [142, 149] i jest to najczęstsze zaburzenie metaboliczne w tej grupie pacjentów [143].

Z badania Diabetes Prevention Program (DPP) wiemy, że tzw. TLS (ang. *therapeutic lifestyle* – leczniczy styl życia), zalecający odpowiednią dietę i wysiłek fizyczny, spowalnia progresję IGT do T2DM – bardziej niż placebo czy stosowanie metforminy. Smith AG i wsp. zastosowali taki sam model postępowania terapeutycznego jak w DPP u wyselekcjonowanych pacjentów z neuropatią związaną z IGT (*IGT Neuropathy*) – inne, częste przyczyny neuropatii obwodowej zostały

wykluczone. Neuropatia rozpoznawana u osób z IGT i we wczesnych okresach cukrzycy w większości jest neuropatią czuciową, bolesną, z dominującym uszkodzeniem drobnych włókien.

W literaturze opisano przypadek występowania przewlekłych powikłań cukrzycy: retinopatii, nefropatii i neuropatii u mężczyzny cztery lata wcześniej sklasyfikowanego jako IFG, następnie z samoistną konwersją do normoglikemii i aktualnie z rozpoznaną upośledzoną tolerancją glukozy [20].

### *Kategorie stanu przedcukrzycowego – miejsce OGTT w rozpoznawaniu stanów zwiększonego ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2*

Aktualnie stosowana klasyfikacja kliniczna opiera się na kryteriach WHO bądź ADA:

- Rekomendacje WHO opierają się na pomiarze glikemii zarówno na czczo jak i w 120. minucie standardowego 75-g OGTT [165], przy braku jawnej (cukrzycowej) hiperglikemii.
- Kryteria ADA promują stosowanie glikemii na czczo, z wykonaniem OGTT przy stwierdzeniu granicznych wartości glikemii na czczo, w rozpoznawaniu i nazewnictwie stanów hiperglikemii [8, 56].

Większość ekspertów zachęca do wykonywania OGTT i jeżeli tylko przestrzegamy zaleceń WHO i dbamy o zachowanie standardowych warunków przeprowadzenia testu, uzyskane wyniki pozwalają w praktyce klinicznej rozpoznać jedną z trzech kategorii: prawidłową tolerancję glukozy, stan przedcukrzycowy i cukrzycę typu 2.

Stanowisko ekspertów Międzynarodowej Federacji Cukrzycowej (*International Diabetes Federation, IDF*) dotyczące kategorii *Prediabetes*, prezentowane na Pierwszym Międzynarodowym Kongresie „Prediabetes and the Metabolic Syndrome” w Berlinie, 13–16 kwietnia 2005 zaproponowało następujące kategorie stanu przedcukrzycowego: izolowaną nieprawidłową glikemię na czczo (izolowana IFG), izolowaną upośledzoną tolerancję glukozy (izolowana IGT), kombinację IFG/IGT (Tabela 3).

### *Schemat postępowania diagnostycznego w stanie zwiększonego ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2 – oznaczanie glikemii*

1. Stwierdzenie granicznych wartości glikemii na czczo (Tabela 1) jest wskazaniem do wykonania testu doustnego obciążenia glukozą [10, 177].
2. Test doustnego obciążenia glukozą (ang. *oral glucose tolerance test, OGTT*) – wskazania i przeciwwskazania [166, 177] (Tabela 2).
3. Interpretacja wyników testu doustnego obciążenia glukozą (OGTT) [9, 166, 177] (Tabela 3).

**Tabela 1.** Kategorie glikemii na czczo (ADA 2013, PTD 2013)

	Norma	Wartości graniczne	Hiperglikemia cukrzycowa
osocze krwi żyłnej	< 100 mg/dl < 5,56 mmol/l	100–125 mg/dl 5,56–6,95 mmol/l	≥ 126 mg/dl ≥ 7,0 mmol/l

**Tabela 2.** Wskazania i przeciwwskazania do testu doustnego obciążenia glukozą (PTD 2013)

Wskazania	Przeciwwskazania względne, 4–6 tygodni	Przeciwwskazania bezwzględne
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Graniczne wartości glikemii na czczo 5,56–6,95 mmol/l (100–125 mg/dl).</li> <li>2. Glukozuria przy prawidłowej glikemii na czczo.</li> <li>3. Diagnostyka cukrzycy ciążowej (GDM).</li> <li>4. Cechy zespołu metabolicznego przy prawidłowej glikemii na czczo.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ciężkie schorzenia ostre i przewlekłe.</li> <li>2. Długotrwałe unieruchomienie.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Zdiagnozowana cukrzyca.</li> <li>2. Niektóre choroby przewodu pokarmowego, np. zespół złego wchłaniania, stan po resekcji żołądka.</li> </ol>

**Tabela 3.** Interpretacja wyników testu doustnego obciążenia glukozą (w osoczu)

	Kategoria	Glikemia w 0. min.	Glikemia w 120. min.
	Prawidłowa tolerancja glukozy	< 100 mg/dl < 5,6 mmol/l	< 140 mg/dl < 7,8 mmol/l
Kategoria IFG	izolowana IFG	100–125 mg/dl 5,6–6,95 mmol/l	< 140 mg/dl < 7,8 mmol/l
Kategoria IGT	izolowana IGT	< 100 mg/dl < 5,6 mmol/l	140–199 mg/dl 7,8–11,05 mmol/l
	IFG/IGT	100–125 mg/dl 5,6–6,95 mmol/l	140–199 mg/dl 7,8–11,05 mmol/l
	Cukrzyca	< 126 mg/dl < 7,0 mmol/l	≥ 200 mg/dl ≥ 11,1 mmol/l

### *Patobiochemia stanów przedcukrzycowych*

#### **Glukoza – wyjątkowe miejsce w metabolizmie człowieka**

Węglowodany dostarczane z dietą są wyjątkowym źródłem kalorii ze względu na swoiste cechy metaboliczne: samowystarczalność w przetwarzaniu zawartej w nich energii (zrównoważony katabolizm w szczawiooctan i acetylo-CoA – podstawowe metabolity cyklu Krebsa) i zdolność do generowania ATP w warunkach beztlenowych [140].

Utrzymywanie we krwi stężenia glukozy około 5 mmol/l (90 mg/dl) ma na celu zapewnienie tkankom zależnym od glukozy ciągłego dostępu do materiału energetycznego.

Po posiłku zawierającym węglowodany, w ciągu 30–60. minut, stężenie glukozy we krwi zwiększa się do około 120–140 mg/dl i tkanki pobierają glukozę z krwi – proces poboru przez tkankę tłuszczową i mięśnie szkieletowe stymuluje insulina. Tkanki preferują utlenianie glukozy (glikoliza) w celu uzyskania energii, a dodatkowo wątroba i mięśnie odkładają glukozę w formie glikogenu. W wątrobie i w tkance tłuszczowej z glukozy mogą również powstawać triacyloglicerole. Większość tkanek wymaga glukozy do produkcji glikoprotein i glikolipidów oraz do syntezy rybozy, składnika nukleotydów. Niektóre komórki w znacznym stopniu (mózg) lub całkowicie (erytrocyt) zależą energetycznie od glukozy [140, 141].

### Insulinooporność

Niewrażliwość tkanek docelowych na insulinę, głównie mięśni szkieletowych, tkanki tłuszczowej i wątroby, oznacza brak właściwej odpowiedzi organizmu (Tabela 4) na ten hormon. Zjawisko to odgrywa zasadniczą rolę w patogenezie cukrzycy typu 2 u osób z nadmierną masą ciała [24]. Zmniejszenie wrażliwości na insulinę można zaobserwować kilka do kilkunastu lat przed wystąpieniem jawnej cukrzycy [155]. Wczesnym przejawem insulinooporności może być zmiana profilu adipokin we krwi [154]. Wśród mechanizmów współwystępujących istotne znaczenie przejawia również stres oksydacyjny [73].

Wśród metod stosowanych do oceny insulinooporności–insulinooporności, wyróżniamy pomiary bezpośrednie – metodą klamry metabolicznej, pośrednie – według modelu minimalnego (ang. *minimal model analysis of frequently sampled intravenous glucose tolerance test*, FSIVGTT) oraz przybliżone wskaźniki insulinooporności–insulinooporności: obliczone z wartości glikemii i insulinemii na czczo (wskaźnik glikemia/insulinemia na czczo, HOMA-IR, QUICKI) i pochodzące z pomiarów w trakcie OGTT (np. indeks Matsudy, indeks Gutt, wskaźnik Stumvoll) [119].

**Tabela 4.** Wybrane efekty metaboliczne działania insuliny

Narząd	Fizjologiczne efekty działania insuliny
wątroba	↑ aktywności kluczowych enzymów glikolizy i glikogenezy, ↓ aktywności enzymów glikogenolizy i glukoneogenezy, ↓ aktywności lipazy wątrobowej (VLDL → LDL), ↑ wnikania aminokwasów, ↓ proteolizy,
mięśnie szkieletowe	↑ liczby GLUT-4, ↑ glikogenezy, ↓ glikogenolizy i glukoneogenezy ↑ glikolizy i ↑ lipogenezy, ↑ wnikania aminokwasów, ↓ proteolizy,
tkanka tłuszczowa	↑ liczby GLUT-4, ↑ glikolizy (↑ lipogenezy), ↓ lipolizy (lipaza triacyloglicerolowa) – ↓ stężenia WKT w osoczu

## IGT i IFG

Stany zwiększonego ryzyka cukrzycy typu 2 stanowią wyzwanie dla klinicystów i badaczy, co obserwujemy wyraźnie od czasu pierwszego światowego kongresu Prediabetes & Metabolic Syndrome w 2005 roku.

Trwa dyskusja nt. sposobów rozpoznawania i nazewnictwa stanów przedcukrzycowych. Określenie IFG (ang. *impaired fasting glycemia*), nieprawidłowa glikemia na czczo, używane jest, gdy dysponujemy tylko glikemią na czczo w zakresie 100–125 mg/dl, choć zdajemy sobie sprawę, że może to wskazywać zarówno na ryzyko cukrzycy jak i wczesny jej etap, oraz dla opisanego konkretnego wyniku OGTT, a przez to kategorii *prediabetes* (Tabela 3). Ekspertki podkreślają, że dla efektywnej prewencji cukrzycy typu 2 potrzebujemy badań wyjaśniających wczesne etapy dysglikemii i sposób ich progresji do T2DM, oddzielnie dla osób z zaburzoną regulacją glikemii na czczo i osób z zaburzeniami glikemii po posiłku [58].

Dostępne publikacje wskazują na różnice pomiędzy kategoriami stanu przedcukrzycowego. Dominującą cechą izolowanego IFG ma być insulinooporność wątrobowa, z upośledzoną supresją glukoneogenezy przez insulinę, podczas gdy izolowana IGT ma charakteryzować się insulinoopornością obwodową, przy podobnym stopniu upośledzonej sekrecji insuliny z komórek beta w obu przypadkach [2, 22]. Zaobserwowano, że IFG charakteryzuje się obniżoną podstawową sekrecją insuliny i upośledzoną pierwszą fazą wydzielania insuliny w odpowiedzi na bodziec glukozowy, natomiast druga faza wydzielania insuliny i insulinooporność obwodowa (głównie mięśniowa) są prawidłowe. Osoby z IGT prezentowały prawidłową podstawową sekrecję insuliny przy upośledzonej pierwszej i drugiej fazie wydzielania insuliny wraz z obniżoną insulinoopornością obwodową [109]. Ważnym elementem patogenezy IFG ma być upośledzone podstawowe wydzielanie insuliny, a w przypadku IGT – upośledzona druga faza odpowiedzi insuliny na bodziec glukozowy [109]. Badania interwencyjne pokazały, że zwiększenie aktywności fizycznej sprzyjało redukcji poposiłkowej (2 godziny) glikemii, a nie wpływało na glikemię na czczo [72]. Færch K i wsp. wykazali, że osoby z wcześniej zidentyfikowaną izolowaną IFG (glikowana hemoglobina HbA1c  $5,54 \pm 0,09\%$ ; średnia  $\pm$  SE) i izolowaną IGT (HbA1c  $5,41 \pm 0,07\%$ ; średnia  $\pm$  SE), przejawiają ten sam stopień dysfunkcji komórek alfa i beta wysp trzustkowych, a jedynie grupa IGT prezentuje insulinooporność obwodową. Dodatkowo u osób z izolowaną IGT obserwowano upośledzenie sekrecji glukozozależnego polipeptydu insulintropowego GIP, a u osób z IFG – podwyższone stężenia glukagonopodobnego peptydu 1 GLP-1 we krwi [57]. Badacze podkreślają potrzebę wyjaśnienia odmienności IFG i IGT, zwłaszcza w aspekcie progresji do cukrzycy, co powinno przyczynić się do zapobieżenia rozwojowi T2DM [125].

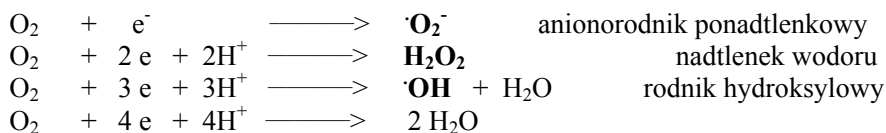
## 1.2. Stres oksydacyjny

Zaburzenie równowagi pomiędzy reakcjami pro-oksydacyjnymi i możliwościami obrony antyoksydacyjnej ugruntowało swoją pozycję m.in. w cukrzycy, chorobach sercowo-naczyniowych, nowotworach czy zapaleniach. Wyniki badań u chorych z jawną patologią – cukrzycą bądź chorobą niedokrwienną serca – pozwalają traktować stres oksydacyjny jako element łączący różne kierunki zaburzeń metabolicznych w ww. chorobach cywilizacyjnych [161].

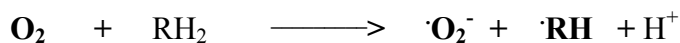
Człowiek jako organizm wykorzystujący tlen w procesach metabolicznych, w tym do produkcji niezbędnej energii, powinien kontrolować wszystkie reakcje z jego udziałem. Określone, adekwatne do potrzeb, stężenia reaktywnych form tlenu (RFT) i reaktywnych form azotu (RFA) są niezbędne w modulowaniu komórkowych szlaków sygnałowych czy w procesach zwalczania chorobotwórczych mikroorganizmów [84], jednak nadmiar tych niezwykle aktywnych cząstek może w konsekwencji doprowadzić do uszkodzenia molekuł, komórek i tkanek.

Spośród możliwych źródeł reaktywnych form tlenu i wolnych rodników u człowieka najczęściej w piśmiennictwie spotykamy [21, 69, 98]:

- mitochondrialny układ transportu elektronów, z którego mogą wydostać się produkty pośrednie, np. anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru czy rodnik hydroksylowy,

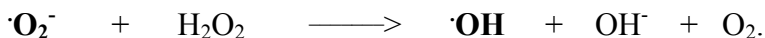


- reakcje katalizowane przez oksydoreduktazy (oksydazy) w ramach normalnego metabolizmu komórki,
- utlenianie związków niskocząsteczkowych ( $\text{RH}_2$ ), np. amin katecholowych, tioli, cukrów redukujących – zwłaszcza glukozy, z wytworzeniem anionorodnika ponadtlenkowego i wolnego rodnika ( $\cdot\text{RH}$ ) utlenianego związku,



- peroksysony w komórce z aktywnością oksydazy ksantynowej i krótkim łańcuchem transportu elektronów,
- proces aktywacji fagocytów z wytworzeniem RFT – funkcja bakterioobójcza neutrocytów wynika m.in. z produkcji anionorodnika ponadtlenkowego – dodatkowo z możliwością przeprowadzenia reakcji Fentona, gdy ma miejsce mobilizacja jonów Fe z ferrytyny w trakcie obniżania pH:





- niedokrwienie i niedotlenowanie tkanek sprzyjające m.in. obniżaniu pH w komórce,
- reakcje przemiany kwasy arachidonowego w błonie komórkowej,
- czynniki fizyczne.

Wolne rodniki tlenowe reagują ze związkami organicznymi i mogą zapoczątkować reakcje łańcuchowe, umieszczając niesparowany elektron na atomie węgla, tlenu lub azotu w cząsteczce modyfikowanego związku. Taka zmiana lipidów, białek czy kwasów nukleinowych może prowadzić do zmiany ich funkcji [117].

Dobrze poznanym procesem w układach biologicznych jest proces peroksydacji lipidów – łańcuchowy proces wolnorodnikowy z wytworzeniem organicznych wolnych rodników i produktów pośrednich, m.in. aldehydów, 4-hydroksyaldehydów, alkanów czy dialdehydu malonowego. Skutkiem modyfikacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w obrębie błon komórkowych może być zmiana ładunku na powierzchni błony i wzrost jej przepuszczalności oraz dezintegracja komórki [17]. Mediatorem uszkodzenia jest najczęściej rodnik hydroksylowy, a podatne na oksydację kwasy tłuszczowe będą rozprzestrzeniać produkty reakcji w formie rodnika wodoronadtlenkowego, nadtlenkowego bądź alkilowego [99].

Potwierdzono znaczenie zwiększonego stężenia produktów peroksydacji lipidów w patobiochemii cukrzycy i jej powikłań [101] oraz w klinicznych postaciach choroby niedokrwiennej serca [95]. Stres oksydacyjny jest niekwestionowanym elementem definicji miażdżycy [78]. Idea prewencji chorób sercowo-naczyniowych i cukrzycy wymaga od badaczy wyjaśnienia roli zaburzeń równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej na wcześniejszych etapach – w stanach zwiększonego ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2.

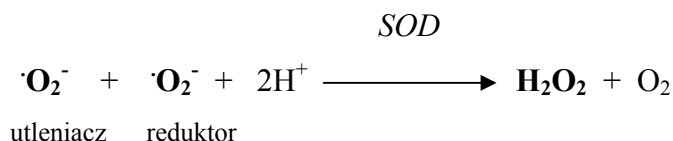
### *Układ antyoksydacyjny*

1. Pierwszą linię obrony stanowią antyoksydanty enzymatyczne przemieniające już istniejące reaktywne formy tlenu (RFT) w mniej szkodliwe cząstki oraz białka ograniczające dostępność jonów metali grup przejściowych do reakcji Fentona – zapobiegające formowaniu kolejnych RFT [86]. Enzymy dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT), peroksydaza glutationu (GPx) są podstawowymi elementami wewnątrzkomórkowego systemu obronnego. Białka osocza o funkcji antyoksydacyjnej to m.in. metaloproteiny: albumina, ceruloplazmina, transferyna.
2. Drugą linię obrony tworzą antyoksydanty przerywające łańcuchowe reakcje wolnorodnikowe, np. witamina E, witamina C, witamina A, kwas moczowy, bilirubina, tlenek azotu.
3. Trzecią linię obrony zapewniają enzymy naprawcze [17].

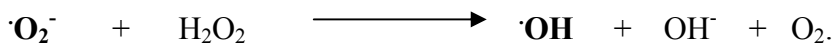
### Dysmutaza ponadtlenkowa

Spośród antyoksydantów enzymatycznych dysmutaza ponadtlenkowa SOD-1 rozpoczyna reakcje unieczynniania reaktywnych form tlenu, przeprowadzając anionorodnik ponadtlenkowy w mniej aktywny nadtlenek wodoru [44, 126].

Katalizuje reakcje dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) do nadtlenu wodoru i molekularnego tlenu:



Enzym ten chroni komórkę nie tylko przed działaniem  $\cdot\text{O}_2^-$ , pośrednio zapobiega również tworzeniu rodnika  $\cdot\text{OH}$  w reakcji Fentona katalizowanej przez metale grup przejściowych ( $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ):



W kolejnych reakcjach ograniczania reaktywności tlenu biorą udział m.in. katalaza:



oraz peroksydaza glutationu:



katalizujące rozkład nadtlenu wodoru.

U ssaków rodzina dysmutaz ponadtlenkowych (SOD, EC 1.15.1.1) obejmuje trzy różne formy: cytoplazmatyczną zawierającą miedź i cynk (Cu,Zn-SOD warunkowana przez gen *sod1*), mitochondrialną zawierającą mangan (Mn-SOD kodowana przez gen *sod2*) i zewnątrzkomórkową (extracellular, EC-SOD, również zawiera Cu i Zn, kodowana przez gen *sod3*) [178]. Pomimo podobnych funkcji enzymy różnią się budową białkową, lokalizacją chromosomową i strukturą genu, wymaganiami kofaktorów i umiejscowieniem w komórce [81]. Numeracja dysmutaz ponadtlenkowych pokazuje kolejność odkrywania i opisywania enzymów: SOD-1 przez McCorda i Fridovicha w 1969 r. [107], SOD-2 przez McCorda w 1976 r. [105] i SOD-3 przez Marklunda w 1982 r. [102].

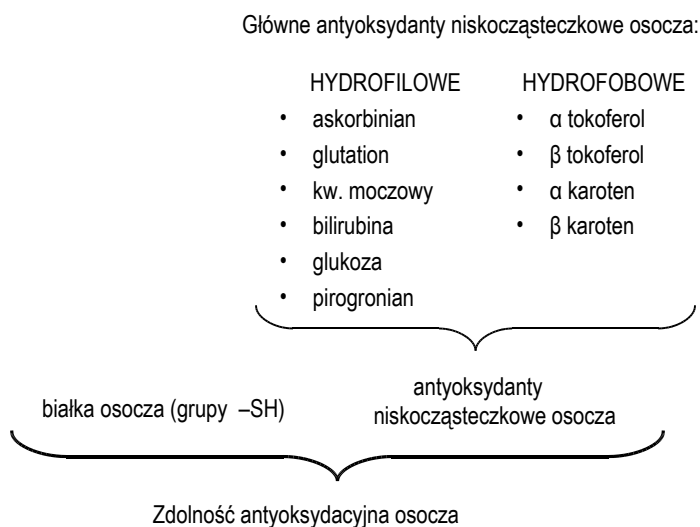
## Całkowity stan antyoksydacyjny

Podczas gdy nauki podstawowe próbują ustalić, jakie składowe osocza odpowiadają za własności antyoksydacyjne (zob. Schemat 1.) oraz jaki jest ich procentowy udział, nauki kliniczne już doceniają rolę stresu oksydacyjnego [18]. W praktyce można spotkać stosowanie antyoksydantów m.in. w ograniczaniu skutków radio- i chemioterapii czy objawowym leczeniu neuropatii, w tym cukrzycowej.

W aktywności przeciwutleniającej osocza/surowicy biorą udział: kwas moczowy (35–65%), białka osocza (10–50%), witamina C (prawie 14%) i witamina E (prawie 7%) [145]. Inni badacze ocenili udział poszczególnych składowych osocza w całkowitym stanie antyoksydacyjnym następująco: grupy -SH 52,9%, kwas moczowy 33,1%, wit. C 4,7%, bilirubina całk. 2,4%, wit. E 1,7%, inne 5,2% [53].

Badacze są zgodni, że ze względu na udział wielu elementów osocza w tworzeniu obrony antyoksydacyjnej i wobec możliwej ich zmienności, w stanach patologicznych o dużym udziale stresu oksydacyjnego bardziej wartościowy jest pomiar sumaryczny [53]. Oznaczenia tych parametrów mogą stanowić ocenę osobniczej podatności na stres tlenowy.

Stres oksydacyjny jest wciąż aktualnym tematem w patobiochemii chorób sercowo-naczyniowych, w tym cukrzycy. Dotąd uważano, że stężenie HDL-C ma znaczenie rokownicze u chorych z nieoptymalnie kontrolowanymi stężeniami LDL-C we krwi. Badacze podnieśli znaczenie lipoproteiny o wysokiej gęstości także u osób z niskimi wartościami LDL-C (< 100 mg/dl), z zaznaczeniem jej właściwości antyoksydacyjnych świadczonych np. w stosunku do śródbłonna [63, 136].



**Schemat 1.** Główne składowe zdolności antyoksydacyjnej osocza, na podstawie [17, 18, 53].

### 1.3. Perspektywy *prediabetes*

Wskaźnik konwersji IGT do T2DM (procent w ciągu roku), zależnej od pochodzenia etnicznego i nagromadzenia czynników ryzyka, jest określany w różnych badaniach prospektywnych między 2,3% i 11% [152]. W niektórych grupach etnicznych, np. u Latynosek z cukrzycą ciążową w wywiadzie, wynosi on 14,3% [26].

W badaniu *Finnish Diabetes Prevention Study* uzyskano wskaźnik konwersji IGT do T2DM 11% oraz szansę jego obniżenia o 58% lub 31%, przy odpowiednio: intensywnej zmianie stylu życia (ang. *intensive lifestyle intervention*) obejmującej interwencję dietetyczną i wysiłek fizyczny lub przy leczeniu metforminą [156]. W kolejnym badaniu interwencyjnym, dotyczącym populacji amerykańskiej, wyliczono 11% wskaźnik konwersji IGT do T2DM w grupie placebo z szansą obniżenia ryzyka o 50% przy leczeniu pioglitazonem [46].

#### *Dysglikemia jako element zespołu metabolicznego*

Tkanka tłuszczowa, zwłaszcza trzewna, nie jest już postrzegana tylko jako magazyn tłuszczu. Otyłość brzuszna cechuje się np. zmianą rozmiaru adipocytów i infiltracją tkanki przez monocyty. Adipokiny, produkowane m.in. przez komórki tłuszczowe i komórki infiltrujące (np. makrofagi), biorą udział w kontroli odżywiania, regulacji wrażliwości na insulinę i metabolizmu węglowodanowo-lipidowego, modulacji procesów zapalnych i krzepnięcia-fibrynolizy, oddziałują na angiogenezę i napięcie naczyniowe [40]. Patobiochemia otyłości jest częścią etiopatogenezy miażdżycy.

Wobec narastającego w świecie problemu otyłości i związanej z tym epidemii cukrzycy typu 2 oraz powikłań sercowo-naczyniowych, w 2005 roku na I Międzynarodowym Kongresie poświęconym zespołowi metabolicznemu i stanom przedcukrzycowym, Międzynarodowa Federacja Cukrzycowa (*International Diabetes Federation*, IDF) zaproponowała definicję zespołu metabolicznego do powszechnego stosowania, tzw. złoty standard [7]. W praktyce klinicznej oznaczało to zalecenie zwracania uwagi na każdą osobę z otyłością centralną, czyli brzuszną (niezbędny element zespołu metabolicznego) i poszukiwania kolejnych czynników ryzyka (kolejnych kryteriów) zawartych w definicji. U każdej osoby spełniającej kryterium podstawowe tj. obwód w talii, powyżej określonej dla danej grupy etnicznej wartości granicznej, rekomendowano poszukiwanie zaburzonych 2 elementów z 4 niżej wymienionych:

- wartość ciśnienia tętniczego krwi
- stężenie triacylogliceroli (TAG) w osoczu na czczo
- stężenie cholesterolu frakcji HDL (HDL-C) w osoczu na czczo

- stężenie glukozy w osoczu na czczo; w przypadku stwierdzenia glikemii 5,6–7,0 mmol/l (100–125 mg/dl) zaleca się przeprowadzenie testu doustnego obciążenia glukozą.

Zespół metaboliczny skupia najbardziej niebezpieczne czynniki ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Szacuje się, że dotyczy on około 1/4 światowej populacji dorosłych. Osoby z zespołem metabolicznym mają 5-krotnie wyższe ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2 (jeżeli nie jest jeszcze rozpoznana), 3-krotnie częściej doświadczają ostrego epizodu wieńcowego lub zawału oraz 2-krotnie częściej umierają z tego powodu, w porównaniu z osobami bez zespołu metabolicznego.

Stanowisko IDF z 2005 roku zawierało również tzw. platynowy standard – dodatkowe kryteria dla celów badań naukowych, pogrupowane w kategorii:

1. nieprawidłowa dystrybucja tkanki tłuszczowej – np. adipokiny,
2. dyslipidemia aterogenna (parametry inne niż  $\uparrow$  stęż. TAG i  $\downarrow$  stęż. HDL-C),
3. dysglikemia – zalecany OGTT,
4. insulinooporność (parametry inne niż zwiększone stężenie glukozy na czczo),
5. zaburzona regulacja naczyniowa (parametry inne niż podwyższone ciśnienie tętnicze),
6. stan prozapalny – np. białko hs-CRP,
7. stan prozakrzepowy,
8. czynniki hormonalne

oraz zachęć dla badaczy do wyjaśniania patobiochemii otyłości i stanów przedcukrzycowych [7].

Według ekspertów IDF ocena dodatkowych elementów pozwoli, w razie potrzeby, zmodyfikować definicję zespołu metabolicznego. Mamy pamiętać, że zespół ten jest zbiorem niekorzystnych zjawisk biochemicznych, prowadzących do zmian czynnościowych i strukturalnych narządów. Zaproponowana w 2005 roku definicja zespołu metabolicznego nie wyczerpała dyskusji nt. określenia kryteriów zespołu metabolicznego i współwystępowania zaburzeń metabolicznych u osób z nadmierną masą ciała. Obecnie otyłość brzuszna jest jednym z równorzędnych elementów definicji tego zespołu, który rozpoznajemy stwierdzając 3 zaburzenia spośród 5 [82].

W literaturze brakuje danych na temat wpływu spożycia dużej ilości glukozy (standardowa ilość 75,0 g w teście doustnego obciążenia glukozą) na zachowanie się biochemicznych markerów otyłości i insulinooporności, parametrów wyrównania metabolicznego oraz wykładników procesu zapalnego i stresu oksydacyjnego we krwi.

Wykorzystując zalecenie lekarskie przeprowadzenia OGTT u osób z hiperglikemią przedcukrzycową bądź normoglikemią na czczo, ale znajdujących się w grupie ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2 (np. otyli), zaplanowano ich kompleksową ocenę, w tym analizę parametrów stresu oksydacyjnego na czczo i w 120. minucie OGTT.

Porównanie kierunków zmian wybranych parametrów między osobami prezentującymi narastające ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2, biorąc pod uwagę BMI i wyniki testu doustnego obciążenia glukozą (prawidłową tolerancję glukozy, stan przedcukrzycowy i świeżą wykrytą cukrzycę), jak też analiza zależności pomiędzy ocenianymi parametrami, przyczynią się do lepszego poznania patobiochemii stanów przedcukrzycowych oraz ustalenia optymalnego postępowania profilaktycznego i leczniczego.

## 2. Cel pracy

Zdarzenia metaboliczne towarzyszące otyłości, prowadzące do ujawnienia czynników ryzyka chorób sercowo naczyniowych, w tym cukrzycy, są szeroko dyskutowane. Wyniki badań prospektywnych, pozwalające prześledzić na przestrzeni lat scenariusz zmian biochemicznych u osób zwiększających masę ciała, byłyby niezwykle cenne.

W pracy podjęto próbę porównania parametrów metabolicznych między osobami prezentującymi narastające ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2, uwzględniając wskaźnik masy ciała BMI i wyniki testu doustnego obciążenia glukozą: prawidłową tolerancję glukozy, stan przedcukrzycowy (nieprawidłowa glikemia na czczo i upośledzona tolerancja glukozy) oraz świeżą wykrytą cukrzycę, co stanowiło „międzyosobniczy” zamiennik badania prospektywnego.

Cele pracy były następujące:

1. Ocena parametrów stresu oksydacyjnego we krwi:
  - stężenia produktów peroksydacji lipidów w osoczu,
  - stężenia całkowitej aktywności antyoksydacyjnej osocza,
  - aktywności cytoplazmatycznej dysmutazy ponadtlenkowej SOD-1 w erytrocytach,
  - ekspresji genu kodującego SOD-1 w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej,w grupach osób tworzących (populacyjny) model narastającego ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2.
2. Wykorzystanie modelu testu doustnego obciążenia glukozą do oceny dynamiki zmian markerów stresu oksydacyjnego w badanych grupach osób, w zależności od wyników oceny tolerancji glukozy.
3. Analiza współdziałania elementów wewnątrzkomórkowej (aktywność dysmutazy ponadtlenkowej SOD-1 w erytrocytach) i zewnątrzkomórkowej (stężenie całkowitego stanu antyoksydacyjnego, TAS, osocza) obrony antyoksydacyjnej, w prewencji stresu oksydacyjnego.
4. Ocena wpływu czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych na parametry stresu oksydacyjnego w badanej populacji.
5. Ocena wartości diagnostycznej wskaźników insulinowrażliwości-insulinooporności u osób ze zwiększonym ryzykiem cukrzycy typu 2.
6. Ocena wartości diagnostycznej parametrów stresu oksydacyjnego w różnicowaniu populacji z narastającym ryzykiem rozwoju cukrzycy typu 2.

## 3. Materiał i metody

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

### 3.1. Osoby badane

Badaniami objęto osoby pochodzenia kaukaskiego, mieszkańców Wielkopolski, z grupy zwiększonego ryzyka wystąpienia cukrzycy typu 2, kierowanych do Poradni Zaburzeń Metabolicznych i Poradni Nadciśnienia Tętniczego Szpitala Klinicznego im. Przemienienia Pańskiego, w okresie od września 2007 r. do czerwca 2011 r.

Podczas badania wstępnego, po przeprowadzeniu kompleksowego badania klinicznego, wykluczono osoby palące, stosujące specjalne diety czy farmakoterapię oraz pacjentów ze schorzeniami ostrymi lub przewlekłymi (m.in. choroba niedokrwienna serca, udar mózgu, przewlekłe choroby zapalne np. choroby nerek i wątroby, choroby autoimmunologiczne, nadczynności i niedoczynności gruczołów dokrewnych), które to czynniki mogłyby wpływać na metabolizm, w tym na równowagę oksydanty–antyoksydanty czy modyfikować odpowiedź immunologiczną ustroju.

W ramach badania przedmiotowego zmierzono wzrost i masę ciała każdej osoby dla obliczenia wskaźnika masy ciała (BMI), obwód talii oraz wartość skurczowego (SBP) i rozkurczowego (DBP) ciśnienia tętniczego krwi, dwukrotnie na ramieniu kończyny górnej lewej po 15-minutowym odpoczynku w pozycji siedzącej (sfigmomanometr MEDEL Palm Pro 91431, Medel, Włochy).

Na czczo wykonano pomiary stężenia glukozy w osoczu, parametrów wydolności wątroby i nerek w surowicy oraz badanie ogólne moczu i morfologii krwi obwodowej. Do dalszych etapów zakwalifikowano osoby z glikemią < 126 mg/dl, bez patologicznych wyników ww. analiz laboratoryjnych.

Na podstawie badania podmiotowego i przedmiotowego, po przeanalizowaniu przeciwwskazań do testu doustnego obciążenia glukozą (OGTT) zgodnie z zaleceniami WHO, do badań zakwalifikowano kobiety i mężczyzn w wieku od 30 do 63 lat. Wszyscy, poinformowani o celu prowadzonych badań, wyrazili na nie zgodę ma piśmie. Każda osoba została poinformowana o konieczności zachowania standardowych warunków przed i w trakcie OGTT [165].

Ostateczną liczebność ustalono dbając o zbliżony rozkład wieku kobiet i mężczyzn w badanych podgrupach, uwzględniając osoby, u których stężenie białka



C-reaktywnego w surowicy, oceniane metodą o wysokiej czułości (hsCRP), nie przekraczało 8 mg/l. Wartości hsCRP powyżej 10 mg/l są uznawane za wykładnik ostrej fazy [49, 153].

Na podstawie uzyskanego wskaźnika masy ciała (BMI) i wyników OGTT [165, 175], populację badaną (n = 140) podzielono na grupy według następującego schematu:

Grupa 1 – prawidłowa tolerancja glukozy (NGT) i prawidłowe BMI 19,0–24,9 kg/m<sup>2</sup> (n = 24)

Grupa 2 – NGT i nadwaga (BMI 25,0–29,9 kg/m<sup>2</sup>) (n = 24)

Grupa 3 – NGT i otyłość (BMI 30,0–39,9 kg/m<sup>2</sup>) (n = 24)

Grupa 4 – nieprawidłowa glikemia na czczo (IFG) i nadwaga/otyłość (n = 22)

Grupa 5 – nieprawidłowa tolerancja glukozy (IGT) i nadwaga/otyłość (n = 24)

Grupa 6 – świeżo rozpoznana cukrzyca typu 2 i nadwaga/otyłość (n = 22).

W ten sposób stworzono model narastającego ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2.

## 3.2. Metodyka badań

### 3.2.1. Test doustnego obciążenia glukozą (OGTT)

Przed testem doustnego obciążenia glukozą poinformowano pacjentów o konieczności zachowania standardowych warunków przeprowadzenia OGTT, wg zaleceń WHO.

Poproszono, by osoby badane nie modyfikowały tuż przed testem stylu życia, tj. nie ograniczały spożycia węglowodanów i nie zwiększały wysiłku fizycznego. Zalecono, by uczestniczący w badaniach przyjmowali około 300 gramów węglowodanów dziennie przez 3 dni poprzedzające test (przynajmniej 150 g/dobę) i utrzymywali swoją dotychczasową aktywność fizyczną; zgłosili się do badania rano, po przespanej nocy, na czczo (8–14 godzin od ostatniego posiłku); wypili roztwór glukozy w ciągu 3–5 minut; w ciągu dwóch godzin, od przyjęcia glukozy do drugiego pobrania krwi, pozostawali w spoczynku oraz nie palili tytoniu.

### 3.2.2. Pobieranie materiału do badania

Krew pobierano dwukrotnie z okolicy zgięcia łokciowego do trzech probówko-strzykawek (zestawy Monovette, Sarstedt, Niemcy), w ilości około 16 ml każdorazowo, dla uzyskania krwi pełnej EDTA, krwi pełnej heparynizowanej oraz surowicy:

- pierwsze pobranie – na czczo, w 0. minucie OGTT, po czym podano do wypicia 75,0 g glukozy (porcje przygotowano w Aptece Akademickiej Uniwersytetu

Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, przy ul. Dąbrowskiego 79) rozpuszczonej w 300 ml wody, w ciągu 3–5 minut, w pozycji siedzącej;

– drugie pobranie – w 120. minucie po spożyciu glukozy.

Z pierwszego pobrania:

1. Krew pełna EDTA posłużyła do oceny morfologii krwi obwodowej, poziomu glikowanej hemoglobiny HbA<sub>1c</sub> oraz do izolacji PBMC (ang. *peripheral blood mononuclear cells*).
2. Część krwi pełnej heparynizowanej przeznaczono na oznaczenie aktywności SOD-1 w erytrocytach, pozostałą ilość odwirowano i oddzielono osocze dla oznaczenia stężenia glukozy (G), cholesterolu całkowitego (T-C), cholesterolu frakcji HDL (HDL-C) i triacylogliceroli (TAG) oraz stężenia całkowitego stanu antyoksydacyjnego (ang. *total antioxidant status*, TAS) i produktów peroksydacji lipidów jako TBARS (ang. *thiobarbituric acid-reacting substances*).
3. Po wykrzepieniu – krew odwirowano i oddzielono surowicę dla oznaczenia stężenia białka C-reaktywnego metodą o wysokiej czułości (hsCRP); część surowicy natychmiast zamrożono w temp. -25°C dla oznaczenia stężenia insuliny.

Z drugiego pobrania:

1. Krew pełna EDTA posłużyła do izolacji PBMC.
2. Część krwi pełnej heparynizowanej przeznaczono na oznaczenie aktywności SOD-1 w erytrocytach, pozostałą ilość odwirowano i oddzielono osocze dla oznaczenia stężenia glukozy oraz stężenia całkowitego stanu antyoksydacyjnego (TAS) i produktów peroksydacji lipidów (TBARS).
3. Po wykrzepieniu – krew odwirowano i surowicę natychmiast zamrożono w temp. -25°C dla oznaczenia stężenia insuliny.

### 3.2.3. Metody oznaczania parametrów gospodarki węglowodanowej i lipidowej, morfologii krwi obwodowej i białka C-reaktywnego

#### *Metoda oznaczania stężenia glukozy*

Stężenie glukozy (G) w trakcie OGTT (G-0' i G-120') w osoczu oceniano metodą enzymatyczną, z heksokinazą i dehydrogenazą glukozo-6-fosforanową, na aparacie Dimension Xpand Plus Systems (Siemens Healthcare Diagnostics). Oznaczenia wykonano w Laboratorium nr 2 Działu Diagnostyki Laboratoryjnej Szpitala Klinicznego *Przemienienia Pańskiego* Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

#### *Metody oznaczania stężenia parametrów lipidowych*

Stężenie cholesterolu całkowitego (T-C) w osoczu oceniano metodą enzymatyczną, z esterazą cholesterolową/oksydazą cholesterolową.

Stężenie cholesterolu frakcji HDL (HDL-C) w osoczu mierzono po skompleksowaniu chylomikronów, lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL) oraz lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) siarczanem dekstranu w obecności siarczanu magnezu, metodą enzymatyczną z esterazą cholesterolową/oksydazą cholesterolową.

Stężenie triacylogliceroli (TAG) w osoczu mierzono metodą enzymatyczną (lipaza/ kinaza glicerolowa/ oksydaza glicerolo-3-fosforanu/ peroksydaza).

Pomiary T-C, HDL-C i TAG wykonano standardowo na aparacie Dimension Xpand Plus Systems (Siemens Healthcare Diagnostics) w Laboratorium nr 2 Działu Diagnostyki Laboratoryjnej Szpitala Klinicznego *Przemienienia Pańskiego* Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Stężenia cholesterolu frakcji LDL (LDL-C) w osoczu wyliczono ze wzoru Friedewalda:

$$LDL [mmol/l]=[T-C]-[HDL-C]-[TAG/2,2]$$

Stężenia cholesterolu frakcji nie-HDL (nieHDL-C) w osoczu wyliczono ze wzoru:

$$nieHDL-C [mmol/l]=[T-C]-[HDL-C]$$

### **Badanie morfologii krwi obwodowej**

Zostało wykonane, według standardowych procedur, w analizatorze hematologicznym Cell-Dyn Ruby firmy Abbott Laboratories (Abbott Park, IL, USA) w Laboratorium nr 2 Działu Diagnostyki Laboratoryjnej Szpitala Klinicznego *Przemienienia Pańskiego* Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

### **Metoda oceny glikowanej hemoglobiny HbA1c**

HbA1c we krwi pełnej mierzono metodą certyfikowaną przez NGSP (*National Glycohemoglobin Standardization Program*) przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) na aparacie D-10 firmy Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Oznaczenia wykonano w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej i Mikrobiologicznej Szpitala Wojewódzkiego w Poznaniu.

### **Metoda oznaczania hsCRP**

Stężenie białka C-reaktywnego w surowicy (hsCRP) zostało zmierzone metodą o wysokiej czułości (ang. *high sensitivity*) – metodą nefelometrii przy użyciu odczynników i aparatu firmy Dade Behring (USA). Oznaczenia wykonano w Za-

kładzie Diagnostyki Laboratoryjnej i Mikrobiologicznej Szpitala Wojewódzkiego w Poznaniu.

### 3.2.4. Metody oceny insulinowrażliwości–insulinooporności

#### Metoda oznaczenia stężenia insuliny w surowicy krwi

Stężenie insuliny mierzono metodą immunoenzymatyczną przy użyciu odczynników firmy BioSource (Nivelles, Belgia) i czytnika mikroplitek Sunrise™ firmy Tecan Group Ltd (Männedorf, Szwajcaria), z czułością analityczną 0,15 mU/l. Współczynniki zmienności (*coefficients of variation, CV*), wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej, wynosiły odpowiednio: 3,3% i 4,0%.

#### Wskaźniki insulinowrażliwości pochodzące z badań dynamicznych

Na podstawie wyników pomiarów stężenia glukozy i insuliny w 0. i 120. minucie testu doustnego obciążenia glikozą, wyliczono wskaźnik  $ISI_{Matsuda}$  [47, 103].

$ISI_{Matsuda}$  – Indeks Matsudy [ $l^2 \cdot mg^{-1} \cdot mU^{-1}$ ] wyrażony był wzorem:

$$ISI_{Matsuda} = 10000 / \sqrt{\{(Ins0' \times G0') \times (G0' + G120') / 2 \times (Ins0' + Ins120') / 2\}}$$

$G0'$  [mg/l] – glikemia w 0. minucie OGTT;

$G120'$  [mg/dl] – glikemia w 120. minucie OGTT;

$Ins0'$  [mU/l] – insulinemia w 0. minucie OGTT;

$Ins120'$  [mU/l] – insulinemia w 120. minucie OGTT.

Na podstawie wyników pomiarów glikemii i insulinemii w 0. i 120. minucie OGTT oraz masy ciała osoby badanej wyliczono wskaźnik  $ISI_{0,120}$  [67].

$ISI_{0,120}$  – Indeks Gutt [ $mg \cdot l^2 \cdot mmol^{-1} \cdot mU^{-1} \cdot min^{-1}$ ] wyrażony był wzorem:

$$ISI_{0,120} = m / MPG / \log MSI, \text{ gdzie:}$$

$m$  – szybkość pobierania glukozy w tkankach obwodowych  
 $= \{75000 \text{ mg} + (G0' - G120') \times (0,19 \times M.C.)\} / 120. \text{ min.}$

$G0'$  [mg/l] – glikemia w 0. minucie OGTT;

$G120'$  [mg/dl] – glikemia w 120. minucie OGTT;

$(0,19 \times M.C.)$  – przestrzeń zajmowana przez glukozę [l],  
M.C. – masa ciała [kg];

MPG – średnie stężenie glukozy w trakcie OGTT  
 $= (G0' + G120') / 2$

$G0'$  [mmol/l] – glikemia w 0. minucie OGTT;

$G120'$  [mmol/dl] – glikemia w 120. minucie OGTT;

MSI – średnie stężenie insuliny w surowicy =  $(Ins0' + Ins120')/2$   
*Ins0'* [mU/l] – insulinemia w 0. minucie OGTT;  
*Ins120'* [mU/l] – insulinemia w 120. minucie OGTT.

$$ISI_{0,120} = \frac{[(75000\text{mg} + (G0' - G120') \times (0,19 \times \text{m.c.})) / 120\text{min}]}{[(G0' + G120') / 2] / [\log \{(Ins0' + Ins120') / 2\}]}$$

Wskaźnik insulinooporności pochodzący z badania podstawowego (rano, na czczo): **HOMA-IR** (ang. *homeostasis model assessment of insulin resistance*) – [mU·mmol<sup>-1</sup>·l<sup>-2</sup>] wyliczono ze wzoru:

$$\text{HOMA-IR} = G-0' \times \text{Ins} / 22.5.$$

*G0'* [mmol/l] – glikemia w 0. minucie OGTT;  
*Ins0'* [mU/l] – insulinemia w 0. minucie OGTT;

### 3.2.5. Metody oceny parametrów stresu oksydacyjnego

#### 3.2.5.1. Metoda oznaczania stężenia substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w osoczu

Metoda oparta jest na reakcji kwasu tiobarbiturowego z dialdehydem malonowym, produktem peroksydacji lipidów [122].

Do próbki z zaznaczoną objętością 4 ml dodawano 0,2 ml badanego osocza heparynizowanego, 0,2 ml 8,1% roztworu soli sodowej kwasu laurylosulfonowego (SDS), 1,5 ml 20% roztworu kwasu octowego o pH 3,5 i 1,5 ml 0,8% roztworu kwasu tiobarbiturowego (TBA). Mieszaninę uzupełniano redestylowaną wodą do objętości 4,0 ml. Próbkę ogrzewano w łaźni wodnej, w temperaturze 95°C przez 60. minut. Po ochłodzeniu przelewano do probówek wirówkowych, poprzednie próbki płukano 1,0 ml redestylowanej wody i materiał dołączano do próbki badanej. Następnie dodawano 5 ml mieszaniny alkoholu butylowego i pirydyny (w stosunku 15:1). Całość mieszano, odwirowywano przy 4000 obr./min. przez 10. minut w temperaturze +4°C. Ostrożnie zbierano górną warstwę i odczytywano absorbancję wobec wody przy długości fali 532 nm.

Do wykreślenia krzywej wzorcowej posłużyły znane stężenia 1,1,3,3-tetraet-hoxypropan-4-metylooksypropanu (TMP) i odpowiadające im absorbancje.

Uzyskano wykres funkcji liniowej ( $y = ax + b$ ), gdzie  $y$  – stężenie TBARS,  $x$  – pomiary absorbancji. Odczytywano absorbancję próbki badanej i z równania funkcji wyliczono  $y$  – stężenie TBARS.

Oznaczenia przeprowadzano przy użyciu odczynników firmy SIGMA (Niemcy) na spektrofotometrze Specord M40 (Niemcy). Współczynniki zmienności

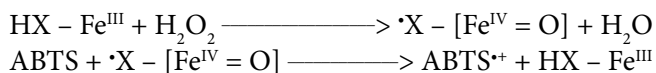
(CV), wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej, dla pomiarów TBARS wynosiły odpowiednio 2,0% i 3,6%.

### 3.2.5.2. Metoda oznaczania całkowitego stanu antyoksydacyjnego (TAS) w osoczu

Oznaczenia wykonywano w osoczu heparynizowanym, uprzednio zamrożonym w temperaturze -20°C nie dłużej niż 14 dni.

#### Zasada metody

Metoda opiera się na reakcji ABTS (2,2'-Azyno-di-[3-etylobenzotiazoliny siarczan]) z peroksydazą (metmioglobina) i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; produktem reakcji jest kationorodnik ABTS<sup>•+</sup>



*HX - Fe<sup>III</sup> - metmioglobina*

*X - [Fe<sup>IV</sup> = O] - ferryłomioglobina*

*ABTS - 2,2'-Azino-di-(3-etylobenzotiazoliny siarczan)*

Względnie trwale niebiesko-zielone zabarwienie roztworu, wywołane utlenianiem ABTS, pozwala na pomiar absorbancji przy długości fali 600 nm. Antyoksydanty obecne w dodanej próbce osocza hamują reakcję; stopień zahamowania reakcji barwnej jest proporcjonalny do stężenia przeciwutleniaczy w badanej próbce. Wzorzec stanowił kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochroman-2-karboksylowy.

Całkowity stan antyoksydacyjny oznaczano metodą kolorymetryczną, stosując zestaw odczynnikowy Randox Total Antioxidant Status (Randox Laboratories Ltd., Wielka Brytania) na spektrofotometrze Statfax<sup>TM</sup> 1904 Plus (Awareness Technology, Inc., USA).

Kontrolę dokładności i powtarzalności prowadzono używając surowic kontrolnych: Randox Total Antioxidant Control. Współczynniki zmienności (CV), wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej, dla pomiarów TAS wynosiły odpowiednio 1,6% i 3,5%.

### 3.2.5.3. Metoda oznaczania aktywności dysmutazy ponadtlenkowej SOD-1 w erytrocytach (SOD)

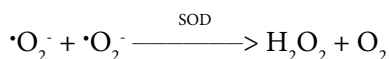
#### Przygotowanie hemolizatu

0,5 ml krwi pełnej heparynizowanej, w próbówce z zaznaczoną objętością 2 ml, wirowano przez 10. minut z szybkością 3000 obrotów/min., po czym usuwano

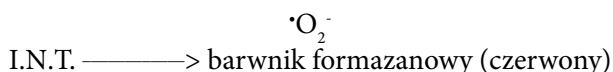
osocze z warstwą kożuszka leukocytno-płytkowego. Do pozostałych krwinek czerwonych dodawano 3 ml 0,9% NaCl i zawiesinę wirowano przez 10. minut z szybkością 3000 obr./min., po czym nadsącz usuwano. Procedurę wykonano czterokrotnie. Przemyte krwinki czerwone uzupełniano zimną redestylowaną wodą do objętości 2 ml. Zawartość probówki zamieszano i pozostawiono w temperaturze +4°C przez 15 minut dla otrzymania hemolizatu. W osobnej probówce przygotowano 5,0 ml 0,01 M buforu fosforanowego o pH 7,0, odciągnięto 0,2 ml tegoż buforu i na to miejsce dodawano 0,2 ml hemolizatu (25-krotne rozcienczenie hemolizatu), otrzymując gotową do oznaczenie próbkę.

### Zasada metody

Enzym dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) przyspiesza reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), w wyniku której powstaje nadtlenek wodoru  $\text{H}_2\text{O}_2$  i tlen cząsteczkowy  $\text{O}_2$ :

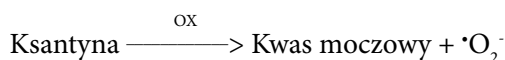


W omawianej metodzie aktywność SOD jest oceniana po stopniu zahamowania niżej wymienionej reakcji, dla której SOD ogranicza dostępność  $\cdot\text{O}_2^-$ :



*I.N.T. – chlorek 2-(4-jodoferyl)-3-(4-nitrofenol)-5-ferylotetrazolium*

Anionorodnik ponadtlenkowy  $\cdot\text{O}_2^-$  do przeprowadzenia ww. procesu generowano w reakcji katalizowanej przez oksydazę ksantynową (OX):



### Wykonanie oznaczenia

Całą procedurę przeprowadzano w temperaturze 37°C. Do 0,05 ml przygotowanego hemolizatu oraz 0,01M. buforu fosforanowego ( $S_1$ ) o pH 7,0 (próba ślepa) i serii rozcienczonego tym buforem standardu ( $S_5, S_4, S_3, S_2$ ) dodawano 1,7 ml mieszaniny zawierającej: 0,05 mM ksantynę, 0,025 mM I.N.T., 0,94 mM EDTA i 50 mM CAPS o pH 10,2. Całość dobrze mieszano. Następnie dodawano 0,25 ml roztworu zawierającego oksydazę ksantynową o aktywności 80 U/l. Zawartość probówki zmieszano i po 30 sekundach odczytywano początkową absorbancję  $A_1$ , a po kolejnych 180 sekundach absorbancję końcową  $A_2$ , uzyskując  $\Delta A/\text{min}$ . Pomiaru dokonywano wobec powietrza, przy długości fali 505 nm w kuwecie o średnicy 1 cm.

### Obliczanie aktywności SOD

$\Delta A\emptyset/\text{min}$ . próby ślepej = 100% stanowiąca wskaźnik niezahamowanej reakcji (bufor fosforanowy nie zawiera SOD),  $\Delta A/\text{min}$ . standardów o znanych stężeniach,  $\Delta AB/\text{min}$ . próbki badanej – posłużyły do obliczenia w jakim procencie w stosunku do próby ślepej reakcja tworzenia barwnika formazonowego została zahamowana:

$$\% \text{ inhibicji} = \Delta AB/\text{min} \times 100\% / \Delta A\emptyset/\text{min}$$

Dla standardu i serii jego rozcieńczeń wykreślano funkcję zależności % inhibicji od  $\log_{10}$  z aktywności SOD ( $\log_{10} [\text{SOD U/ml}]$ ). Uzyskiwano wykresy funkcji o równaniu  $y = ax+b$ , gdzie  $y$  oznacza % inhibicji,  $x - \log_{10} [\text{SOD U/ml}]$ .

Odczytywano  $\Delta AB/\text{min}$  próbki badanej i podstawiając do wzoru obliczano % inhibicji, z równania funkcji wyliczano  $x - \log_{10} [\text{SOD U/ml}]$ . Następnie przez odwrotność logarytmowania uzyskiwano aktywność SOD U/ml hemolizatu. Po uwzględnieniu stężenia hemoglobiny, wynik podano jako aktywność SOD U/g Hb.

W celu kontroli jakości przeprowadzanych oznaczeń stosowano RANSOD Control firmy RANDOX.

Oznaczenia przeprowadzono przy użyciu odczynników firmy Randox Laboratories Ltd. (Crumlin, Co. Antrim, Wielka Brytania) na spektrofotometrze Statfax™ 1904 Plus firmy Awareness Technology Inc. (Palm City, Florida, USA). Współczynniki zmienności (CV) wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej, wynosiły odpowiednio: 1,8% i 2,7%.

### 3.2.6. Badanie ekspresji genu kodującego cytoplazmatyczną dysmutazę ponadtlenkową SOD-1 w PBMC (xSOD)

Badania z zakresu biologii molekularnej zostały przeprowadzone na jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej PBMC (ang. *peripheral blood mononuclear cells*) uzyskanych z krwi obwodowej pobranej na EDTA poprzez wirowanie w gradiencie gęstości Ficollu, a następnie zamrożonych w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  według następującego schematu:

1. izolacja całkowitego RNA, przeprowadzona wg zmodyfikowanej metody Chomczyńskiego-Sacci,
2. reakcja odwrotnej transkrypcji (RT PCR, ang. *Reverse Transcription PCR*)-synteza cDNA (przy użyciu odczynników Roche Diagnostics),
3. ocena ekspresji genu kodującego dysmutazę ponadtlenkową SOD-1, EC (Cu, Zn-SOD) metodą PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem sond hydrolizujących typu TaqMan (Roche Diagnostics).



## Izolacja RNA

Całkowity RNA izolowano według zmodyfikowanej metody Chomczyńskiego i Sacchi [37]. Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMK, ang. *peripheral blood mononuclear cells*) poddano lizie mieszaniną fenolu i izotiocyanianu guanidyny (1ml) (TRI, Sigma-Aldrich, Deisenhofer, Germany). Do prób dodawano następnie chloroform w objętości równej 1/5 objętości odczynnika TRI (200  $\mu$ l). Przygotowane w ten sposób próby wytrząsano i inkubowano na lodzie przez 5 minut. Po inkubacji próby wirowano przez 15 minut w temperaturze 4°C, 15000 x g. W wyniku wirowania próby rozdzielały się na trzy warstwy; (1) fazę wodną (zawierającą RNA), (2) fazę pośrednią (interfazę z cienką warstwą DNA) oraz (3) fazę fenolowo-chloroformową zawierającą białko i struktury subkomórkowe. Do dalszej izolacji pobierano 500  $\mu$ l fazy wodnej i przenoszono do nowych probówek. RNA wytrącano przez dodanie izopropanolu w stosunku objętościowym 1:1. Przygotowane w ten sposób próby umieszczano w zamrażarce w temperaturze -80°C. Po upływie 24 godz. probówki wirowano 15 minut, 4°C, 15000 x g. Po odwirowaniu usuwano supernatant, a powstały osad RNA przemywano dwukrotnie przy użyciu schłodzonego 75% etanolu, wirowano 15 minut, 4°C, 15000 x g, a następnie suszono. Wyszuszony osad RNA rozpuszczano w 10  $\mu$ l wody dejonizowanej, wolnej od RNaz. Tak przygotowany RNA wykorzystywano jako matrycę do syntezy cDNA w procesie odwrotnej transkrypcji, do której użyto 1  $\mu$ g całkowitego RNA.

Do analizy ilościowo-jakościowej prób RNA posłużono się pomiarem spektrofotometrycznym.

## Odwrotna transkrypcja

Reakcje odwrotnej transkrypcji przeprowadzano w 1,5 ml probówkach (Eppendorf). Całą procedurę wykonywano pod komorą laminarną na lodzie. Objętość RNA jaką wzięto do przepisania na cDNA poszczególnych prób przeliczono na 1  $\mu$ g. Do RNA znajdującego się w próbce dodawano 4  $\mu$ l dNTP (2,5 mM każdego dNTP), 1  $\mu$ l oligo(dT)23 (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l) oraz 0,5  $\mu$ l wody dejonizowanej. Probówkę wytrząsano, krótko wirowano i umieszczano na 5 minut w 65°C w termobloku (Eppendorf-thermomixer comfort, Niemcy), w celu denaturacji RNA. Następnie probówkę umieszczano na lodzie na 2 minuty, wirowano, ponownie umieszczano na lodzie i dodawano następujące składniki: 4  $\mu$ l pięciokrotnie stężonego buforu First Strand Buffer (Invitrogen), 2  $\mu$ l DTT 0,1 M (Invitrogen), 0,5  $\mu$ l odwrotnej transkryptazy SuperScript™ II Reverse Transcriptase 200 U/ $\mu$ l (Invitrogen) oraz 0,25  $\mu$ l inhibitora rybonukleaz Rnase OUT 40 U/ $\mu$ l (Invitrogen). Probówkę wytrząsano, a następnie krótko wirowano i umieszczano w termobloku. Syntezę cDNA przeprowadzano przez 50 minut w temperaturze 37°C. Następnie probówki umieszczano na 15 minut w drugim termobloku w 65°C w celu zatrzymania reakcji. Uzyskany cDNA służył jako matryca do reakcji RQ-PCR (ang. *real-time quantitative PCR*).

## Amplifikacja cDNA w czasie rzeczywistym

Poziom ekspresji genu dla SOD-1 został oznaczony techniką RQ-PCR za pomocą aparatu LightCycler 480 Instrument (Roche) oraz oprogramowania LightCycler Software 1.5.

Powstawanie produktów PCR monitorowano poprzez pomiar sygnału fluorescencji emitowanej przez sondy zastosowane w reakcji (Tabela 5). Użycie swoistych sond hydrolizujących (typu *TaqMan*), znakowanych fluorescencyjnie umiejscowionych pomiędzy parą starterów PCR, rozwiązuje problem nieswoistości fluorescencyjnej obecnej przy zastosowaniu barwnika SYBR Green I. W metodzie *TaqMan* wykorzystuje się swoistą dla amplifikowanego fragmentu DNA sondę, wyznakowaną na końcach cząsteczkami fluorochromów. Na końcu 5' sondy znajduje się barwnik reporterowy, a na końcu 3' cząsteczka wygaszająca fluorescencję. Kiedy sonda jest nienaruszona, wygaszacz znajdujący się blisko reportera wygasza jego fluorescencję. Podczas reakcji PCR sonda zostaje zdegradowana dzięki aktywności 5' nukleazowej polimerazy. Rozdział obu fluorochromów umożliwia emisję fluorescencji przez reporter. Wzrost fluorescencji monitorowany jest po każdym zakończonym cyklu elongacyjnym. Poziom fluorescencji jest wprost proporcjonalny do ilości powstającego produktu.

Reakcję RQ-PCR prowadzono na płytkach 96-dołkowych. Do poszczególnych dołków naniesiono odpowiednio po 1  $\mu$ l cDNA, 1  $\mu$ l startera 5'  $\rightarrow$  3' oraz startera 3'  $\rightarrow$  5', a także 1  $\mu$ l sondy komplementarnej do sekwencji danego genu. Do każdego dołka naniesiono wówczas 7  $\mu$ l mieszaniny reakcyjnej, której skład był następujący:

- 5  $\mu$ l LightCycler 480 Probes Master
- 2  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

Reakcja RQ-PCR obejmowała następujące etapy:

- denaturacja wstępna: 95° C, 10. min. (aktywacja polimerazy)
- oznaczenie ilościowe ekspresji genów (50 cykli)
- denaturacja: 95° C, 10 sek. (rozdzielenie nici DNA)
- przyłączanie starterów: 60° C, 30 sek.
- wydłużanie starterów (synteza nici komplementarnej): 72° C, 1sek.
- chłodzenie aparatu.

Wyniki oznaczeń ilościowych badanych cDNA normalizowano względem standardu wewnętrznego, czyli cDNA genu konstytutywnego (ang. *house-keeping gene*), którego ekspresja jest względnie stała i nie podlega regulacji pod wpływem czynników zewnętrznych. Jako standard wewnętrzny zastosowano cDNA genu kodującego dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH, ang. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*). Ekspresja genu dla SOD-1 znormalizowana względem GAPDH ( $xSOD \cdot 10^3$ ), z powodu rozproszenia wyników, została również przedstawiona w formie logarytmu,  $\log(xSOD \cdot 10^3)$ .

**Tabela 5.** Startery i sondy wykorzystane w reakcji RQ-PCR

cDNA	Startery F ( <i>forward</i> ) i R ( <i>reverse</i> )	Gene accession number	Amplikon
SOD-1 sonda 11	F: 5'AGATGACTTGGGCAAAGGTG 3'	ENST00000270142.6	93nt
	R: 5'TATTGGGCGATCCCAATTAC 3'		
GAPDH sonda 23	F: 5'CGTAGCTCAGGCCTCAAGAC 3'	ENST00000229239.5	112nt
	R: 5'GCTGCGGGCTCAATTTATAG 3'		

Badania z zakresu biologii molekularnej zostały wykonane w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

### 3.2.7. Dynamiczna ocena parametrów stresu oksydacyjnego

#### Indeks $R_{75}$

#### Wskaźnik $TAS-R_{75}/TBARS-R_{75}$

Ideę testu doustnego obciążenia glukozą wykorzystano do śledzenia wpływu 75 gramów glukozy na zachowanie się markerów stresu oksydacyjnego we krwi.

Dla oceny zmian aktywności SOD, ekspresji genu SOD-1 czy stężenia badanych parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej w trakcie OGTT, zaproponowałam indeks  $R_{75} = [\text{wartość}-120']/[\text{wartość}-0']$ . Wskaźnik ten przedstawia odpowiedź organizmu na bodziec 75,0 gramów glukozy w zakresie ocenianego parametru.

Stan równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej osocza w trakcie testu doustnego obciążenia glukozą opisano w formie wskaźnika  $TAS-R_{75}/TBARS-R_{75}$ .

### 3.2.8. Analiza statystyczna

Statystyczną ocenę wyników przeprowadzono z wykorzystaniem programów STATISTICA wersja 10.0 (StatSoft Inc., USA) oraz MedCalc wersja 12.6.0. (MedCalc Software bvba, Belgia).

Cechy rozkładu parametrów w badanej populacji i wyodrębnionych grupach badano testem Shapiro-Wilka, nie znajdując cech rozkładu normalnego. Wszystkie analizowane dane przedstawiono w postaci mediany oraz pierwszego i trzeciego kwartyla. Wskaźniki insulinooporności-insulinowrażliwości i parametry stresu oksydacyjnego przedstawiono w formie mediany, pierwszego i trzeciego kwartyla oraz wartości minimalnej i maksymalnej.

Porównanie parametrów między wieloma badanymi grupami wykonywano metodami analizy wariancji testem Kruskala-Wallisa oraz metodą wielokrotnych

porównań, *post hoc*, testem Dunna. Dla zbadania istotności różnicy między dwoma grupami używano testu U Mann-Whitney'a.

Dla sprawdzenia istotności różnic między dwiema zaleźnymi próbami (0. i 120. minuta testu doustnego obciążenia glukozą), użyto testu istotności par Wilcoxon.

Korelację liniową między zmiennymi oceniano w oparciu o współczynnik R Spearmana. Siłę związku między zmiennymi klasyfikowano na podstawie wartości współczynnika korelacji jako nikłą  $R < 0,0$ ; słabą  $0,1 \leq R < 0,3$ ; przeciętną  $0,3 \leq R < 0,5$ ; wysoką  $0,5 \leq R < 0,7$ ; bardzo wysoką  $0,7 \leq R < 0,9$ ; prawie pełną  $0,9 \leq R < 1$  [146]. Przeprowadzono analizy regresji wielokrotnej.

Za istotne przyjęto wyniki analiz statystycznych przy prawdopodobieństwie  $p < 0,05$ .

Przy użyciu programu MedCalc wykreślono krzywe ROC (ang. *receiver operating characteristic*) zależności czułości testu w funkcji {1-swoistość}, z pomiarem pola pod krzywą AUC (ang. *area under curve*). Wyznaczono wartości odcięcia, przy której badany parametr z określoną czułością i swoistością diagnostyczną oraz z największą mocą (najwyższe AUC) różnicuje dwa stany kliniczne. Przy porównaniu osiągow kilku testów (kilku krzywych ROC) w analizie parametrów statystycznych zwrócono uwagę na różnicę pól i jej istotność statystyczną [114].

## 4. Wyniki

Na podstawie uzyskanych wyników testu doustnego obciążenia glukozą (OGTT) i wskaźnika masy ciała (ang. *body mass index*, BMI), uwzględniając osoby prezentujące stężenie hsCRP w surowicy < 8 mg/l, populację badaną podzielono na następujące grupy osób, kobiet i mężczyzn, o zbliżonym rozkładzie wieku:

Grupy normoglikemiczne (prawidłowy wynik OGTT):

- grupa 1 – normoglikemia i prawidłowy BMI,
- grupa 2 – normoglikemia i nadwaga,
- grupa 3 – normoglikemia i otyłość,

Grupy dysglikemiczne (nieprawidłowy wynik OGTT):

- grupa 4 – nieprawidłowa glikemia na czczo (IFG, ang. *impaired fasting glycaemia*) i nadwaga/otyłość,
- grupa 5 – nieprawidłowa tolerancja glukozy (IGT, ang. *impaired glucose tolerance*) i nadwaga/otyłość,
- grupa 6 – świeżo rozpoznana cukrzyca typu 2 (T2DM) i nadwaga/otyłość.

Szczegółowe dane kliniczno-laboratoryjne, stanowiące podstawę kwalifikowania osób do poszczególnych grup, przedstawiono w tabeli 6.

### 4.1. Charakterystyka badanych grup

Charakterystykę każdej badanej grupy (1, 2, 3, 4, 5 i 6) przedstawiono z podziałem na kobiety i mężczyzn (Tabele 7–12):

- w tabelach 7–12: dane kliniczne, parametry stanu zapalnego, wykładniki gospodarki węglowodanowej i lipidowej, wskaźniki insulinowrażliwości–insulinooporności;
- w tabelach 13–18: parametry stresu oksydacyjnego.

W każdej badanej grupie porównano oceniane parametry między kobietami i mężczyznami (Tabele 7–12, Tabele 13–18) i nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic, za wyjątkiem obwodu talii i stężenia cholesterolu frakcji HDL (HDL-C) – co pozostaje w zgodzie z literaturowymi opisami zdrowych populacji. W grupie 1 i 2 obserwowano niższy obwód talii i wyższe stężenie HDL-C u kobiet, w grupie 4 obserwowano wyższe stężenie HDL-C u kobiet. Pozostałe grupy osób (otyli z NGT, grupa IFG, grupa IGT i grupa T2DM) nie prezentowały

typowego dla płci rozkładu cech antropometrycznych i różnic w stężeniu HDL-C (otyli z NGT, grupa IGT i grupa T2DM). Wobec powyższego kolejne analizy statystyczne przeprowadzono w grupach 1–6 bez względu na płeć.

Porównanie parametrów stresu oksydacyjnego w trakcie testu doustnego obciążenia glukozą, tj. w 0. i 120. min OGTT, w każdej badanej grupie oraz w całej populacji  $n = 140$ , przedstawiono w tabeli 23 (zob. strona 56).

Różnice między aktywnością SOD na czczo i w 120. minucie OGTT zaobserwowano w grupach: 1, 2, 6. Ekspresja genu dla SOD w trakcie testu różniła się w grupie 1 i 2 oraz całej badanej populacji. Stężenia całkowitego stanu antyoksydacyjnego w trakcie OGTT różniły się w grupach 1, 3, 5, 6 i całej badanej populacji. Stężenie produktów peroksydacji lipidów (TBARS) różniło się między 0. i 120. minutą OGTT w grupach 3–6 i całej badanej populacji.

**Tabela 6.** Kryteria podziału populacji badanej na grupy w zależności od wyniku testu doustnego obciążenia glukozą OGTT i wskaźnika masy ciała BMI. Grupy normoglikemiczne (prawidłowy wynik OGTT): grupa 1 – normoglikemia i prawidłowy BMI ( $BMI < 25,0$   $kg/m^2$ ), grupa 2 – normoglikemia i nadwaga ( $BMI 25,0–29,9$   $kg/m^2$ ), grupa 3 – normoglikemia i otyłość ( $BMI 30,0–39,9$   $kg/m^2$ ), Grupy dysglikemiczne (nieprawidłowy wynik OGTT): grupa 4 – nieprawidłowa glikemia na czczo (IFG, ang. *impaired fasting glycaemia*) i nadwaga/otyłość ( $BMI 25,0–39,9$   $kg/m^2$ ), grupa 5 – nieprawidłowa tolerancja glukozy (IGT, ang. *impaired glucose tolerance*) i nadwaga/otyłość ( $BMI 25,0–39,9$   $kg/m^2$ ), grupa 6 – świeżo rozpoznana cukrzyca typu 2 (T2DM) i nadwaga/otyłość ( $BMI 25,0–39,9$   $kg/m^2$ ). Wyniki przedstawiono jako medianę oraz pierwszy-trzeci kwartył

		Grupy normoglikemiczne			Grupy dysglikemiczne		
OGTT	G-0' [mmol/l]	4,71 4,37–4,94	5,14 5,00–5,30	5,23 5,13–5,46	6,39 6,17–6,61	5,90 5,50–6,04	6,69 6,48–6,79
	G-120' [mmol/l]	5,02 4,71–5,39	5,64 5,34–6,28	6,86 6,23–7,22	7,16 6,29–7,49	8,98 8,23–9,43	13,08 11,89–13,88
Wynik OGTT		prawidłowy	prawidłowy	prawidłowy	IFG	IGT	T2DM
BMI [ $kg/m^2$ ]		23,7 22,5–24,1	27,5 26,7–28,3	33,2 31,4–36,1	32,7 29,2–34,1	33,8 30,5–36,6	34,0 29,1–36,3
Kategoria BMI		prawidłowy	nadwaga	otyłość	nadwaga/ otyłość	nadwaga/ otyłość	nadwaga/ otyłość
Podział badanej populacji		Grupa 1	Grupa 2	Grupa 3	Grupa 4	Grupa 5	Grupa 6

Objaśnienia: BMI – wskaźnik masy ciała (ang. *body mass index*); OGTT – test doustnego obciążenia glukozą (ang. *oral glucose tolerance test*); G-0' i G-120' – glikemia w 0. i 120. minucie OGTT.

**Tabela 7.** Charakterystyka opisowa **grupy 1** (wyniki przedstawiono jako medianę oraz pierwszy-trzeci kwartył) oraz porównanie kobiet i mężczyzn testem U Mann-Whitney'a (różnice istotne statystycznie, gdy  $p < 0,05$ ; ns – nieistotne statystycznie)

Grupa 1		wszyscy	kobiety	mężczyźni
n		24	12	12
wiek [lata]		53,50 46,0–57,0	53,5 47,0–57,0	53,5 44,0–57,0
talia [cm]		81,5 75,0–88,0	76,0 73,0–80,0	88,0 84,0–92,0
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]		23,7 22,5–24,1	23,7 22,0–24,0	23,2 22,4–24,2
SBP [mmHg]		120,0 115,0–123,0	120,0 115,0–123,0	120,0 115,0–123,0
DBP [mmHg]		78,0 70,0–80,0	78,0 73,0–82,0	78,0 70,0–80,0
WBC [ $\times 10^9/l$ ]		5,97 5,10–6,56	6,14 5,40–6,64	5,61 5,02–6,47
hsCRP [mg/l]		1,30 0,99–1,63	1,34 1,12–1,76	1,20 0,94–1,56
OGTT	G-0' [mmol/l]	4,71 4,37–4,94	4,58 4,37–4,83	4,76 4,31–4,97
	G-120' [mmol/l]	5,02 4,71–5,39	5,16 4,20–5,43	4,89 4,76–5,25
Ins-0' [mU/l]		7,59 7,25–8,42	7,62 7,42–8,32	7,45 6,93–8,43
Ins-120' [mU/l]		10,62 9,77–13,29	10,33 9,77–12,24	10,68 8,77–17,37
ISI <sub>0,120</sub>		57,88 53,75–63,35	58,21 55,21–62,51	57,88 48,60–64,93
ISI <sub>Matsuda</sub>		12,73 11,17–14,78	12,92 11,62–13,68	12,73 9,46–15,04
HOMA-IR		1,54 1,45–1,85	1,54 1,48–1,78	1,57 1,37–1,86
HbA <sub>1c</sub> [% Hb]		5,30 5,20–5,40	5,30 5,20–5,40	5,30 5,20–5,60
T-C [mmol/l]		4,43 3,88–5,01	4,47 3,75–4,94	4,25 3,89–5,02
HDL-C [mmol/l]		1,50 1,42–1,70	1,63 1,51–1,81	1,44 1,39–1,50
TAG [mmol/l]		0,95 0,75–1,06	0,91 0,70–1,01	1,05 0,80–1,09
LDL-C [mmol/l]		2,29 1,91–3,02	2,22 1,80–2,86	2,31 2,01–3,19
nie HDL-C [mmol/l]		2,68 2,33–3,49	2,66 2,19–3,35	2,75 2,48–3,63

**Tabela 8.** Charakterystyka opisowa **grupy 2** (wyniki przedstawiono jako medianę oraz pierwszy-trzeci kwartył) oraz porównanie kobiet i mężczyzn testem U Mann-Whitney'a (różnice istotne statystycznie, gdy  $p < 0,05$ ; ns – nieistotne statystycznie)

Grupa 2		wszyscy	kobiety	mężczyźni
n		24	12	12
wiek [lata]		53,0 40,0–57,0	53,0 42,0–57,0	53,0 40,0–57,0
talia [cm]		94,0 89,0–98,0	89,0 84,0–93,0	97,0 94,5–99,5
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]		27,5 26,7–28,3	27,5 26,5–28,2	27,4 27,0–28,5
SBP [mmHg]		129,0 120,0–132,5	130,0 123,0–133,0	128,0 120,0–135,0
DBP [mmHg]		80,0 75,0–81,0	80,0 78,0–82,0	78,0 73,0–81,0
WBC [ $\times 10^9/l$ ]		6,36 5,68–6,88	6,19 5,68–7,18	6,49 5,71–6,69
hsCRP [mg/l]		2,12 1,02–2,77	1,70 0,91–2,93	2,23 1,62–2,70
OGTT	G-0' [mmol/l]	5,14 5,00–5,30	5,05 5,00–5,26	5,20 5,00–5,37
	G-120' [mmol/l]	5,64 5,34–6,28	5,60 5,15–5,98	5,87 5,47–6,31
Ins-0' [mU/l]		10,83 8,72–15,70	10,85 8,706–16,25	10,71 8,72–14,89
Ins-120' [mU/l]		26,09 20,72–35,74	27,63 21,36–37,07	25,12 19,49–31,74
ISI <sub>0,120</sub>		38,30 35,37–41,99	37,78 35,99–41,99	39,32 34,77–42,44
ISI <sub>Matsuda</sub>		5,83 5,05–7,47	5,66 5,14–6,66	5,99 4,96–7,88
HOMA-IR		2,42 1,96–3,55	2,46 1,96–3,64	2,42 1,96–3,41
HbA <sub>1c</sub> [% Hb]		5,30 5,20–5,40	5,30 5,20–5,30	5,30 5,20–5,45
T-C [mmol/l]		5,11 4,78–5,75	5,11 4,93–5,65	5,13 4,64–5,78
HDL-C [mmol/l]		1,43 1,26–1,71	1,58 1,45–1,78	1,26 1,09–1,36
TAG [mmol/l]		1,17 0,96–1,59	1,01 0,80–1,25	1,56 1,09–1,67
LDL-C [mmol/l]		3,02 2,72–3,77	2,99 2,72–3,619	3,15 2,64–3,89
nie HDL-C [mmol/l]		3,62 3,11–4,34	3,46 3,11–4,02	3,77 3,29–4,63



**Tabela 9.** Charakterystyka opisowa **grupy 3** (wyniki przedstawiono jako medianę oraz pierwszy-trzeci kwartył) oraz porównanie kobiet i mężczyzn testem U Mann-Whitney'a (różnice istotne statystycznie, gdy  $p < 0,05$ ; ns – nieistotne statystycznie)

Grupa 3		wszyscy	kobiety	mężczyźni
n		24	12	12
wiek [lata]		53,0 46,0–57,0	53,0 46,0–59,0	53,0 47,0–55,0
talia [cm]		102,5 97,5–117,0	100,0 92,0–119,0	104,0 100,0–117,0
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]		33,2 31,4–36,1	33,2 31,6–36,7	33,2 31,2–35,8
SBP [mmHg]		130,0 125,0 – 135,0	130,0 126,0–135,0	130,0 125,0–135,0
DBP [mmHg]		80,0 78,0–85,0	83,0 76,0–85,0	80,0 78,0–84,0
WBC [ $\times 10^9/l$ ]		6,77 5,96–7,76	6,63 6,04–8,00	6,77 5,75–7,76
hsCRP [mg/l]		2,10 1,11–4,04	1,44 0,91–4,03	2,45 1,94–4,30
OGTT	G-0' [mmol/l]	5,23 5,13–5,46	5,21 5,15–5,46	5,29 5,10–5,47
	G-120' [mmol/l]	6,86 6,23–7,22	6,81 6,39–6,94	6,91 6,23–7,34
Ins-0' [mU/l]		12,60 10,53–15,88	11,47 9,86–15,65	13,04 10,56–15,88
Ins-120' [mU/l]		37,11 29,16–59,89	36,52 31,36–53,98	47,72 23,75–63,31
ISI <sub>0,120</sub>		31,42 28,340–34,84	31,42 29,73–34,71	31,81 27,82–35,30
ISI <sub>Matsuda</sub>		4,42 3,44–5,33	4,42 3,57–5,15	4,30 2,79–5,53
HOMA-IR		2,91 2,35–3,66	2,69 2,30–3,71	2,98 2,46–3,66
HbA <sub>1c</sub> [% Hb]		5,60 5,50–5,70	5,60 5,50–5,70	5,60 5,50–5,70
T-C [mmol/l]		5,76 4,99–6,13	5,91 4,62–6,36	5,48 5,09–5,94
HDL-C [mmol/l]		1,13 1,05–1,29	1,26 1,10–1,45	1,09 1,04–1,14
TAG [mmol/l]		1,67 1,43–2,38	1,59 1,19–2,33	1,75 1,55–2,38
LDL-C [mmol/l]		3,71 3,04–4,11	3,86 2,79–4,28	3,55 3,16–3,94
nie HDL-C [mmol/l]		4,63 3,89–4,99	4,80 3,27–5,22	4,41 4,01–4,87

**Tabela 10.** Charakterystyka opisowa **grupy 4** (wyniki przedstawiono jako medianę oraz pierwszy-trzeci kwartył) oraz porównanie kobiet i mężczyzn testem U Mann-Whitney'a (różnice istotne statystycznie, gdy  $p < 0,05$ ; ns – nieistotne statystycznie)

Grupa 4		wszyscy	kobiety	mężczyźni
n		22	11	11
wiek [lata]		52,0 46,0–58,0	52,0 47,0–60,0	52,0 47,0–60,0
talia [cm]		110,0 106,0 – 114,0	108,0 100,0–115,0	110,0 108,0–114,0
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]		32,7 29,2–34,1	32,9 29,2–34,1	32,5 28,4–36,1
SBP [mmHg]		135,0 130,0 – 140,0	130,0 120,0–146,0	140,0 130,0–140,0
DBP [mmHg]		81,0 80,0–90,0	80,0 80,0–90,0	90,0 80,0–90,0
WBC [ $\times 10^9/l$ ]		7,37 6,14–8,13	6,44 5,76–8,03	7,45 7,11–8,53
hsCRP [mg/l]		3,19 2,54–3,76	2,84 1,50–4,26	3,50 2,67–3,76
OGTT	G-0' [mmol/l]	6,39 6,17–6,61	6,25 6,15–6,59	6,48 6,33–6,62
	G-120' [mmol/l]	7,16 6,29–7,49	7,15 6,56–7,40	7,17 5,61–7,63
Ins-0' [mU/l]		13,46 10,54–15,71	12,63 9,65–15,24	13,84 10,54–16,85
Ins-120' [mU/l]		38,15 26,39–57,34	35,21 24,88–57,87	51,64 31,33–61,79
ISI <sub>0,120</sub>		28,90 25,68–32,73	29,74 26,20–31,72	27,02 25,03–32,67
ISI <sub>Matsuda</sub>		3,66 3,02–4,48	3,95 3,15–4,91	3,34 2,69–4,42
HOMA-IR		3,77 3,13–4,44	3,45 2,87–4,27	3,92 3,13–4,95
HbA <sub>1c</sub> [% Hb]		5,80 5,70–5,90	5,80 5,60–5,80	5,80 5,70–5,90
T-C [mmol/l]		5,52 4,95–6,20	5,78 4,95–6,28	5,28 4,84–6,20
HDL-C [mmol/l]		1,24 1,14–1,43	1,39 1,25–1,51	1,14 1,06–1,19
TAG [mmol/l]		1,81 1,41–2,30	1,69 1,22–2,14	2,15 1,51–2,36
LDL-C [mmol/l]		3,38 2,89–3,83	3,43 2,95–4,09	3,35 2,79–3,64
nie HDL-C [mmol/l]		4,25 3,73–4,80	4,43 3,44–4,80	4,20 3,73–5,34

**Tabela 11.** Charakterystyka opisowa grupy 5 (wyniki przedstawiono jako medianę oraz pierwszy-trzeci kwartył) oraz porównanie kobiet i mężczyzn testem U Mann-Whitney'a (różnice istotne statystycznie, gdy  $p < 0,05$ ; ns – nieistotne statystycznie)

Grupa 5		wszyscy	kobiety	mężczyźni
n		24	12	12
wiek [lata]		52,0 46,0–58,0	52,5 46,0–57,0	52,0 46,0–57,5
talía [cm]		105,0 99,5–110,0	101,5 95,0–109,0	107,0 101,0–112,0
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]		33,8 30,5–36,6	34,8 30,6–35,2	32,8 30,5–37,8
SBP [mmHg]		130,0 125,0–140,0	128,0 123,0–138,0	130,0 130,0–145,0
DBP [mmHg]		80,0 75,0–88,0	79,0 74,0–85,0	80,0 77,5–90,0
WBC [ $\times 10^9/l$ ]		7,03 6,60–8,10	7,06 6,45–8,10	7,03 6,66–8,06
hsCRP [mg/l]		3,32 1,98–4,49	3,40 2,68–4,15	2,84 1,09–4,72
OGTT	G-0' [mmol/l]	5,90 5,50–6,04	5,94 5,43–6,13	5,80 5,51–5,99
	G-120' [mmol/l]	8,98 8,23–9,43	8,92 8,23–9,49	8,98 8,37–9,38
Ins-0' [mU/l]		16,76 12,24–19,21	16,76 12,63–17,41	17,25 12,22–21,00
Ins-120' [mU/l]		75,94 59,19–95,07	75,94 55,19–97,66	76,18 62,94–95,07
ISI <sub>0,120</sub>		22,62 20,32–23,30	22,78 20,08–23,23	22,01 20,32–23,37
ISI <sub>Matsuda</sub>		2,31 1,84–2,62	2,40 1,84–2,74	2,31 1,79–2,56
HOMA-IR		4,44 3,20–5,21	4,32 3,32–4,98	4,67 3,14–5,21
HbA <sub>1c</sub> [% Hb]		6,00 5,80–6,10	5,85 5,65–6,15	6,05 5,95–6,10
T-C [mmol/l]		5,57 5,00–6,34	5,57 4,97–6,47	5,50 5,00–6,13
HDL-C [mmol/l]		1,15 0,99–1,32	1,19 1,11–1,55	1,10 0,95–1,27
TAG [mmol/l]		1,97 1,49–2,35	2,30 1,62–2,44	1,68 1,26–2,14
LDL-C [mmol/l]		3,57 3,17–4,05	3,38 2,88–4,04	3,70 3,39–4,18
nie HDL-C [mmol/l]		4,51 3,94–4,89	4,54 3,74–4,90	4,34 4,00–5,14

**Tabela 12.** Charakterystyka opisowa grupy 6 (wyniki przedstawiono jako medianę oraz pierwszy-trzeci kwartył) oraz porównanie kobiet i mężczyzn testem U Mann-Whitney'a (różnice istotne statystycznie, gdy  $p < 0,05$ ; ns – nieistotne statystycznie)

Grupa 6		wszyscy	kobiety	mężczyźni
n		22	11	11
wiek [lata]		53,0 44,0–58,0	53,0 44,0–59,0	53,0 44,0–58,0
talía [cm]		111,0 102,0–122,0	112,0 102,0–128,0	110,0 98,0–122,0
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]		34,0 29,1–36,3	33,8 29,1–35,3	35,6 29,1–37,3
SBP [mmHg]		130,0 125,0 – 140,0	140,0 125,0–148,0	130,0 125,0–135,0
DBP [mmHg]		85,0 80,0–90,0	85,0 78,0–90,0	85,0 80,0–85,0
WBC [ $\times 10^9/l$ ]		7,22 6,16–7,68	7,19 6,00–7,95	7,31 6,45–7,59
hsCRP [mg/l]		3,75 2,33–5,20	4,26 1,66–5,20	3,59 2,78–5,80
OGTT	G-0' [mmol/l]	6,69 6,48–6,79	6,57 6,48–6,77	6,71 6,24–6,82
	G-120' [mmol/l]	13,08 11,89–13,88	13,33 11,62–13,97	12,83 11,92–13,88
Ins-0' [mU/l]		15,41 10,12–17,62	15,44 10,56–17,62	15,38 10,06–17,81
Ins-120' [mU/l]		40,16 32,23–65,47	43,38 37,47–77,18	36,02 25,60–65,47
ISI <sub>0,120</sub>		18,52 16,65–20,89	17,68 16,51–19,62	18,82 16,65–21,94
ISI <sub>Matsuda</sub>		2,27 2,00–3,15	2,15 1,80–3,15	2,81 2,05–3,24
HOMA-IR		4,23 3,06–5,23	4,72 3,12–5,23	4,18 3,05–5,40
HbA <sub>1c</sub> [% Hb]		6,80 6,40–7,00	6,80 6,40–7,00	6,80 6,30–7,00
T-C [mmol/l]		5,93 5,04–6,57	5,95 5,29–6,90	5,79 4,58–6,57
HDL-C [mmol/l]		1,12 0,91–1,33	1,21 0,91–1,36	1,12 0,85–1,31
TAG [mmol/l]		2,31 1,78–3,05	2,29 1,23–2,83	2,39 1,78–3,09
LDL-C [mmol/l]		3,79 2,67–4,30	3,85 2,95–4,39	2,87 2,39–4,11
nie HDL-C [mmol/l]		4,75 3,80–5,36	4,92 3,89–5,99	4,57 3,79–5,36

**Tabela 13. Grupa 1** – Porównanie parametrów stresu oksydacyjnego ze względu na płeć (testem U Mann-Whitney’a): aktywności SOD-1 w erytrocytach (SOD), ekspresji genu SOD-1 w PBMC (xSOD), logarytmu wartości xSOD (log xSOD), stężenia całkowitego stanu antyoksydacyjnego (TAS) osocza i stężenia produktów peroksydacji lipidów (TBARS) w osoczu – wartości uzyskane w trakcie testu doustnego obciążenia glukozą (OGTT) w 0. minucie (0’) i w 120. minucie (120’), wskaźnika TAS-0’/TBARS-0’ oraz wskaźników zmiany w trakcie OGTT: indeks  $R_{75} = [120']/[0']$  i  $TAS-R_{75}/TBARS-R_{75}$ . Dane przedstawiono jako medianę oraz pierwszy-trzeci kwartył; różnica istotna statystycznie, gdy wartość  $p < 0,05$ ; ns – różnica nieistotna statystycznie

	Grupa 1	wszyscy	kobiety	mężczyźni	p
	n	24	12	12	
OGTT	SOD-0' [U/gHGB]	1258 1164–1365	1289 1211–1376	1212 1097–1349	ns
	SOD-120' [U/gHGB]	1433 1368–1738	1411 1373–1668	1572 1348–1737	ns
	SOD- $R_{75}$	1,18 1,06–1,31	1,15 1,06–1,20	1,28 1,11–1,36	ns
OGTT	xSOD-0' [ $\times 10^3$ ]	15,45 8,05–20,95	16,25 10,61–20,30	11,88 5,79–20,95	ns
	xSOD-120' [ $\times 10^3$ ]	37,80 21,05–56,20	39,85 22,70–60,90	35,95 20,60–56,20	ns
	xSOD- $R_{75}$	2,69 2,02–4,16	2,42 1,98–3,38	2,86 2,36–4,70	ns
OGTT	log xSOD-0'	9,65 8,99–9,95	9,70 9,27–9,91	9,34 8,66–9,95	ns
	log xSOD-120'	10,54 9,95–10,93	10,59 10,02–11,00	10,49 9,93–10,93	ns
	(log xSOD)- $R_{75}$	1,10 1,07–1,15	1,09 1,07–1,13	1,11 1,09–1,17	ns
OGTT	TAS-0' [mmol/l]	1,28 1,25–1,35	1,28 1,26–1,35	1,29 1,19–1,37	ns
	TAS-120' [mmol/l]	1,37 1,26–1,43	1,37 1,26–1,41	1,36 1,27–1,49	ns
	TAS- $R_{75}$	1,03 1,00–1,08	1,03 1,00–1,05	1,02 1,00–1,18	ns
OGTT	TBARS-0' [ $\mu\text{mol/l}$ ]	2,95 2,36–4,10	3,57 2,50–4,29	2,88 2,23–3,67	ns
	TBARS-120' [ $\mu\text{mol/l}$ ]	2,98 2,42–4,12	3,16 2,72–4,55	2,93 2,15–4,01	ns
	TBARS- $R_{75}$	1,02 0,95–1,13	1,04 0,98–1,14	1,00 0,93–1,08	ns
	TAS-0'/TBARS-0'	0,40 0,32–0,58	0,36 0,30–0,54	0,46 0,35–0,58	
	TAS- $R_{75}$ /TBARS- $R_{75}$	1,026 0,91–1,11	1,00 0,89–1,09	1,09 0,94–1,16	ns

**Tabela 14. Grupa 2** – Porównanie parametrów stresu oksydacyjnego ze względu na płeć (testem U Mann-Whitney’a): aktywności SOD-1 w erytrocytach (SOD), ekspresji genu SOD-1 w PBMC (xSOD), logarytmu wartości xSOD (log xSOD), stężenia całkowitego stanu antyoksydacyjnego (TAS) osocza i stężenia produktów peroksydacji lipidów (TBARS) w osoczu – wartości uzyskane w trakcie testu doustnego obciążenia glukozą (OGTT) w 0. minucie (0’) i w 120. minucie (120’), wskaźnika TAS-0’/TBARS-0’ oraz wskaźników zmiany w trakcie OGTT: indeks  $R_{75} = [120’]/[0’]$  i  $TAS-R_{75}/TBARS-R_{75}$ . Dane przedstawiono jako medianę oraz pierwszy-trzeci kwartył; różnica istotna statystycznie, gdy wartość  $p < 0,05$ ; ns – różnica nieistotna statystycznie

	Grupa 2	wszyscy	kobiety	mężczyźni	p
	n	24	12	12	
OGTT	SOD-0’ [U/gHGB]	1389 1296–1464	1415 1322–1467	1370 1219–1443	ns
	SOD-120’ [U/gHGB]	1578 1514–1656	1558 1492–1626	1591 1514–1712	ns
	SOD- $R_{75}$	1,14 1,09–1,24	1,13 1,06–1,18	1,22 1,12–1,30	ns
OGTT	xSOD-0’ [ $\times 10^3$ ]	25,10 11,50–37,70	26,95 13,90–37,70	22,45 9,99–39,15	ns
	xSOD-120’ [ $\times 10^3$ ]	124,0 64,65–159,0	71,25 60,50–152,5	134,0 104,0–161,0	ns
	xSOD- $R_{75}$	3,59 2,27–7,15	2,68 2,02–5,01	6,07 2,82–12,12	ns
OGTT	log xSOD-0’	10,13 9,35–10,54	10,20 9,54–10,54	10,00 9,21–10,57	ns
	log xSOD-120’	11,23 11,08–11,97	11,17 11,01–11,93	11,81 11,53–11,97	ns
	(log xSOD)- $R_{75}$	1,12 1,08–1,20	1,11 1,07–1,16	1,17 1,10–1,27	ns
OGTT	TAS-0’ [mmol/l]	1,39 1,22–1,49	1,40 1,27–1,49	1,37 1,18–1,48	ns
	TAS-120’ [mmol/l]	1,37 1,30–1,55	1,40 1,32–1,55	1,33 1,18–1,55	ns
	TAS- $R_{75}$	1,02 0,95–1,11	1,07 0,97–1,16	0,99 0,94–1,08	ns
OGTT	TBARS-0’ [ $\mu\text{mol/l}$ ]	3,02 2,47–4,64	3,03 2,63–4,64	3,02 2,27–4,34	ns
	TBARS-120’ [ $\mu\text{mol/l}$ ]	3,01 2,43–4,20	3,10 2,55–4,13	2,91 2,20–4,91	ns
	TBARS- $R_{75}$	0,96 0,91–1,11	0,92 0,89–1,04	1,06 0,91–1,15	ns
	TAS-0’/TBARS-0’	0,48 0,27–0,53	0,48 0,27–0,53	0,46 0,31–0,61	ns
	TAS- $R_{75}$ /TBARS- $R_{75}$	1,07 0,89–1,20	1,13 0,99–1,29	1,00 0,86–1,17	ns

**Tabela 15. Grupa 3** – Porównanie parametrów stresu oksydacyjnego ze względu na płeć (testem U Mann-Whitney’a): aktywności SOD-1 w erytrocytach (SOD), ekspresji genu SOD-1 w PBMC (xSOD), logarytmu wartości xSOD (log xSOD), stężenia całkowitego stanu antyoksydacyjnego (TAS) osocza i stężenia produktów peroksydacji lipidów (TBARS) w osoczu – wartości uzyskane w trakcie testu doustnego obciążenia glukozą (OGTT) w 0. minucie (0’) i w 120. minucie (120’), wskaźnika TAS-0’/TBARS-0’ oraz wskaźników zmiany w trakcie OGTT: indeks  $R_{75} = [120']/[0']$  i  $TAS-R_{75}/TBARS-R_{75}$ . Dane przedstawiono jako medianę oraz pierwszy-trzeci kwartył; różnica istotna statystycznie, gdy wartość  $p < 0,05$ ; ns – różnica nieistotna statystycznie

	Grupa 3	wszyscy	kobiety	mężczyźni	p
	n	24	12	12	
OGTT	SOD-0' [U/gHGB]	1485 1245–1690	1521 1325–1690	1403 1150–1654	ns
	SOD-120' [U/gHGB]	1460 1293–1764	1513 1223–1793	1434 1334–1727	ns
	SOD- $R_{75}$	1,03 0,90–1,16	0,97 0,84–1,06	1,13 0,93–1,19	ns
OGTT	xSOD-0' [ $\times 10^3$ ]	29,95 16,65–75,00	46,90 21,75–75,00	29,25 8,01–73,9	ns
	xSOD-120' [ $\times 10^3$ ]	45,20 21,55–222,0	52,60 13,74–187,5	44,25 22,30–222,0	ns
	xSOD- $R_{75}$	1,68 0,75–2,83	1,34 0,45–2,30	2,10 0,96–4,02	ns
OGTT	log xSOD-0'	10,31 9,69–11,20	10,75 9,99–11,20	10,28 8,98–11,17	ns
	log xSOD-120'	10,72 9,98–12,31	10,86 9,38–12,10	10,70 10,01–12,31	ns
	(log xSOD)- $R_{75}$	1,05 0,97–1,09	1,03 0,92–1,08	1,07 0,99–1,14	ns
OGTT	TAS-0' [mmol/l]	1,45 1,33–1,56	1,37 1,30–1,57	1,51 1,37–1,56	ns
	TAS-120' [mmol/l]	1,37 1,29–1,50	1,34 1,26–1,55	1,42 1,35–1,50	ns
	TAS- $R_{75}$	0,97 0,90–1,00	0,97 0,94–1,00	0,97 0,88–0,99	ns
OGTT	TBARS-0' [ $\mu\text{mol/l}$ ]	5,64 5,18–6,23	5,51 4,83–6,51	5,74 5,43–6,09	ns
	TBARS-120' [ $\mu\text{mol/l}$ ]	6,22 5,44–6,73	5,71 5,44–7,08	6,37 5,71–6,73	ns
	TBARS- $R_{75}$	1,09 1,02–1,18	1,06 1,01–1,21	1,11 1,06–1,16	ns
	TAS-0'/TBARS-0'	0,26 0,22–0,31	0,25 0,21–0,32	0,26 0,24–0,31	ns
	TAS- $R_{75}$ /TBARS- $R_{75}$	0,85 0,77–0,96	0,88 0,78–0,99	0,84 0,77–0,92	ns

**Tabela 16. Grupa 4** – Porównanie parametrów stresu oksydacyjnego ze względu na płeć (testem U Mann-Whitney’a): aktywności SOD-1 w erytrocytach (SOD), ekspresji genu SOD-1 w PBMC (xSOD), logarytmu wartości xSOD (log xSOD), stężenia całkowitego stanu antyoksydacyjnego (TAS) osocza i stężenia produktów peroksydacji lipidów (TBARS) w osoczu – wartości uzyskane w trakcie testu doustnego obciążenia glukozą (OGTT) w 0. minucie (0’) i w 120. minucie (120’), wskaźnika TAS-0’/TBARS-0’ oraz wskaźników zmiany w trakcie OGTT: indeks  $R_{75} = [120’]/[0’]$  i  $TAS-R_{75}/TBARS-R_{75}$ . Dane przedstawiono jako medianę oraz pierwszy-trzeci kwartył; różnica istotna statystycznie, gdy wartość  $p < 0,05$ ; ns – różnica nieistotna statystycznie

	Grupa 4	wszyscy	kobiety	mężczyźni	p
	n	22	11	11	
OGTT	SOD-0’ [U/gHGB]	1309 1216–1514	1295 1228–1362	1502 1213–1553	ns
	SOD-120’ [U/gHGB]	1327 1012–1509	1244 955–1488	1429 1012 – 1650	ns
	SOD- $R_{75}$	0,99 0,78–1,18	1,01 0,81–1,18	0,97 0,67–1,23	ns
OGTT	xSOD-0’ [ $\times 10^3$ ]	18,05 8,00–40,50	12,60 6,93–22,0	31,10 8,00–51,10	ns
	xSOD-120’ [ $\times 10^3$ ]	17,95 3,89–48,90	11,40 3,10–45,30	29,30 4,09–74,60	ns
	xSOD- $R_{75}$	0,93 0,33–2,66	1,14 0,19–5,00	0,72 0,33–2,66	ns
OGTT	log xSOD-0’	9,80 8,99–10,61	9,44 8,84–10,00	10,35 8,99–10,84	ns
	log xSOD-120’	9,77 8,27–10,80	9,34 8,04–10,72	10,28 8,31–11,22	ns
	(log xSOD)- $R_{75}$	0,99 0,88–1,09	1,01 0,83–1,18	0,97 0,88–1,09	ns
OGTT	TAS-0’ [mmol/l]	1,54 1,44–1,59	1,58 1,47–1,61	1,47 1,39–1,58	ns
	TAS-120’ [mmol/l]	1,40 1,34–1,72	1,41 1,33–1,72	1,37 1,34–1,67	ns
	TAS- $R_{75}$	0,99 0,93–1,05	0,98 0,88–1,12	0,99 0,94–1,05	ns
OGTT	TBARS-0’ [ $\mu\text{mol/l}$ ]	6,42 5,21–7,79	6,17 4,80–7,80	6,48 5,68–7,79	ns
	TBARS-120’ [ $\mu\text{mol/l}$ ]	7,41 5,48–8,14	6,63 4,83–7,70	7,55 6,77–8,30	ns
	TBARS- $R_{75}$	1,05 1,00–1,16	1,02 0,95–1,08	1,07 1,01–1,19	ns
	TAS-0’/TBARS-0’	0,24 0,22–0,31	0,25 0,20–0,34	0,23 0,17–0,26	ns
	TAS- $R_{75}$ /TBARS- $R_{75}$	0,93 0,81–1,02	0,95 0,81–1,04	0,93 0,81–1,01	ns



**Tabela 17. Grupa 5** – Porównanie parametrów stresu oksydacyjnego ze względu na płeć (testem U Mann-Whitney’a): aktywności SOD-1 w erytrocytach (SOD), ekspresji genu SOD-1 w PBMC (xSOD), logarytmu wartości xSOD (log xSOD), stężenia całkowitego stanu antyoksydacyjnego (TAS) osocza i stężenia produktów peroksydacji lipidów (TBARS) w osoczu – wartości uzyskane w trakcie testu doustnego obciążenia glukozą (OGTT) w 0. minucie (0’) i w 120. minucie (120’), wskaźnika TAS-0’/TBARS-0’ oraz wskaźników zmiany w trakcie OGTT: indeks  $R_{75} = [120’]/[0’]$  i TAS- $R_{75}$ /TBARS- $R_{75}$ . Dane przedstawiono jako medianę oraz pierwszy-trzeci kwartył; różnica istotna statystycznie, gdy wartość  $p < 0,05$ ; ns – różnica nieistotna statystycznie

	Grupa 5	wszyscy	kobiety	mężczyźni	p
	n	24	12	12	
OGTT	SOD-0' [U/gHGB]	1577 1434–1859	1510 1443–1881	1654 1422–1859	ns
	SOD-120' [U/gHGB]	1510 1304–1791	1489 1330–1772	1542 1218–1791	ns
	SOD- $R_{75}$	0,95 0,81–1,08	0,95 0,81–1,03	0,91 0,79–1,08	ns
OGTT	xSOD-0' [ $\times 10^3$ ]	64,55 37,35–131,0	52,85 34,70–120,0	93,10 40,30–136,5	ns
	xSOD-120' [ $\times 10^3$ ]	69,3 22,85–138,5	47,10 14,16–145,5	82,35 35,55–135,5	ns
	xSOD- $R_{75}$	0,80 0,25–1,97	0,64 0,19–1,68	0,82 0,43–1,99	ns
OGTT	log xSOD-0'	11,07 10,53–11,78	10,87 10,45–11,70	11,42 10,60–11,82	ns
	log xSOD-120'	11,15 10,04–11,84	10,66 9,36–11,88	11,31 10,42–11,81	ns
	(log xSOD)- $R_{75}$	0,98 0,87–1,06	0,96 0,85–1,04	0,98 0,93–1,06	ns
OGTT	TAS-0' [mmol/l]	1,51 1,37–1,68	1,59 1,45–1,69	1,46 1,34–1,58	ns
	TAS-120' [mmol/l]	1,28 1,21–1,42	1,28 1,19–1,51	1,30 1,22–1,39	ns
	TAS- $R_{75}$	0,88 0,82–0,95	0,87 0,81–0,94	0,91 0,84–1,00	ns
OGTT	TBARS-0' [ $\mu\text{mol/l}$ ]	7,01 6,23–8,81	7,26 6,00–8,25	6,90 6,23–9,10	ns
	TBARS-120' [ $\mu\text{mol/l}$ ]	8,06 6,59–8,89	8,08 6,29–9,83	7,70 7,04–8,84	ns
	TBARS- $R_{75}$	1,06 0,99–1,22	1,06 1,02–1,30	1,07 0,99–1,15	ns
	TAS-0'/TBARS-0'	0,21 0,18–0,25	0,21 0,18–0,26	0,21 0,16–0,24	ns
	TAS- $R_{75}$ /TBARS- $R_{75}$	0,81 0,70–0,95	0,78 0,67–0,87	0,84 0,73–0,98	ns

**Tabela 18. Grupa 6** – Porównanie parametrów stresu oksydacyjnego ze względu na płeć (testem U Mann-Whitney’a): aktywności SOD-1 w erytrocytach (SOD), ekspresji genu SOD-1 w PBMC (xSOD), logarytmu wartości xSOD (log xSOD), stężenia całkowitego stanu antyoksydacyjnego (TAS) osocza i stężenia produktów peroksydacji lipidów (TBARS) w osoczu – wartości uzyskane w trakcie testu doustnego obciążenia glukozą (OGTT) w 0. minucie (0’) i w 120. minucie (120’), wskaźnika TAS-0’/TBARS-0’ oraz wskaźników zmiany w trakcie OGTT: indeks  $R_{75} = [120’]/[0’]$  i  $TAS-R_{75}/TBARS-R_{75}$ . Dane przedstawiono jako medianę oraz pierwszy-trzeci kwartył; różnica istotna statystycznie, gdy wartość  $p < 0,05$ ; ns – różnica nieistotna statystycznie

	Grupa 6	wszyscy	kobiety	mężczyźni	p
	n	22	11	11	
OGTT	SOD-0’ [U/gHGB]	1187 1045–1279	1211 1045–1299	1178 1007–1270	ns
	SOD-120’ [U/gHGB]	966,4 897,2–1150	971,2 884,8 – 1204	931,9 897,2 – 1116	ns
	SOD- $R_{75}$	0,86 0,70–0,99	0,84 0,62–1,13	0,95 0,70–0,99	ns
OGTT	xSOD-0’ [ $\times 10^3$ ]	4,20 2,70–8,82	4,25 2,70–12,00	4,15 1,74–8,82	ns
	xSOD-120’ [ $\times 10^3$ ]	3,06 1,46–4,25	1,55 1,29–7,22	3,46 1,80–4,15	ns
	xSOD- $R_{75}$	0,53 0,37–1,00	0,51 0,32–1,57	0,69 0,44–1,00	ns
OGTT	log xSOD-0’	8,34 7,90–9,08	8,35 7,90–9,39	8,33 7,46–9,08	ns
	log xSOD-120’	8,03 7,29–8,35	7,35 7,16–8,88	8,15 7,50–8,33	ns
	(log xSOD)- $R_{75}$	0,93 0,88–1,00	0,92 0,86–1,06	0,95 0,91–1,00	ns
OGTT	TAS-0’ [mmol/l]	1,20 1,11–1,27	1,20 1,10–1,27	1,20 1,12–1,29	ns
	TAS-120’ [mmol/l]	1,02 0,96–1,10	1,02 0,93–1,10	1,05 1,02–1,16	ns
	TAS- $R_{75}$	0,86 0,81–0,92	0,86 0,79–0,92	0,86 0,81–0,92	ns
OGTT	TBARS-0’ [ $\mu\text{mol/l}$ ]	7,03 5,70–9,60	8,40 5,70–10,44	6,58 5,51–9,36	ns
	TBARS-120’ [ $\mu\text{mol/l}$ ]	8,69 6,63–11,44	9,61 6,53–11,64	8,25 6,63–9,43	ns
	TBARS- $R_{75}$	1,13 1,08–1,25	1,16 1,08–1,26	1,13 1,06–1,22	ns
	TAS-0’/TBARS-0’	0,16 0,12–0,22	0,14 0,11–0,22	0,19 0,12–0,22	ns
	TAS- $R_{75}$ /TBARS- $R_{75}$	0,73 0,68–0,79	0,74 0,67–0,79	0,72 0,68–0,79	ns

## 4.2. Porównania między badanymi grupami

Kliniczno-laboratoryjna charakterystyka porównawcza badanych grup 1–6 została przedstawiona w tabelach 19–22.

Badane osoby nie różniły się między sobą wiekiem. Różnica w zakresie BMI i glikemii wynikała z przyjętych założeń pracy. Konsekwencją przyjętego podziału, ze względu na BMI (prawidłowe, nadwaga, otyłość) i wynik doustnego testu obciążenia glukozą (normoglikemia, stany przedcukrzycowe, świeżo rozpoznana cukrzyca typu 2), były różnice w zakresie: obwodu talii i wartości HbA1c.

Mimo że do badania kwalifikowano tylko osoby z prawidłową, tj. w zakresie wartości referencyjnych, liczbą leukocytów (WBC) w morfologii krwi obwodowej i stężeniem hsCRP < 8 mg/l, badane grupy różniły się pod względem tych parametrów. Wszystkie osoby z dysglikemią, tj. grupy 4, 5 i 6 – każda, prezentowały wyższą liczbę WBC w porównaniu z grupą 1 (Rycina 1). Grupy 4, 5 i 6 ujawniły wyższe stężenia hsCRP w porównaniu z grupą 1, ponadto grupa 6 – w porównaniu z grupą 2 (Rycina 2). Powyższe wyniki potwierdzają udział procesu zapalnego w patobiochemii ryzyka sercowo-naczyniowego, przy współwystępowaniu nie tylko cukrzycy, ale również stanu przedcukrzycowego.

### 4.2.1. Parametry gospodarki węglowodanowej i lipidowej

#### *HbA1c*

Badane grupy różniły się między sobą wartościami HbA1c (Rycina 3), przy czym nie obserwowano różnic pomiędzy grupami normoglikemicznymi 1, 2 i 3. Każda z grup dysglikemicznych 4, 5, 6 prezentowała wyższe wartości parametru w porównaniu z grupą 1 i 2 oraz grupy 5 i 6 – w porównaniu z grupą 3. Największą różnicę obserwowano między grupą 6 a poszczególnymi grupami normoglikemicznymi 1, 2, 3 oraz między grupą 5 i grupami normoglikemicznymi 1, 2 – co potwierdza słuszność wprowadzenia przez ADA parametru HbA1c do kryteriów rozpoznawania cukrzycy i stanów przedcukrzycowych. Z drugiej strony wyniki porównania wielokrotnego pokazują brak istotnej statystycznie różnicy w gromadzeniu końcowych produktów glikacji białek, tu: HbA1c, u normoglikemicznych osób z otyłością (grupa 3) i u osób IFG z nadmierną masą ciała (grupa 4). Podobne skutki metaboliczne w zakresie glikacji białek zostały zaobserwowane przy porównaniu dwóch stanów przedcukrzycowych: IFG (grupa 4) i IGT (grupa 5). Przedstawione zależności pokazują, jak niewiele może dzielić osoby otyłe od rozpoznania stanu przedcukrzycowego, oraz sugerują (usprawiedliwiają) podobne traktowanie IFG i IGT w zakresie możliwych konsekwencji metabolicznych.

**Tabela 19.** Charakterystyka badanych grup – parametry kliniczne i laboratoryjne stanowiące podstawę podziału na grupy badane. Grupy normoglikemiczne (prawidłowy wynik OGTT): grupa 1 – normoglikemia i prawidłowy BMI (BMI < 25,0 kg/m<sup>2</sup>), grupa 2 – normoglikemia i nadwaga (BMI 25,0–29,9 kg/m<sup>2</sup>), grupa 3 – normoglikemia i otyłość (BMI 30,0–39,9 kg/m<sup>2</sup>). Grupy dysglikemiczne (nieprawidłowy wynik OGTT): grupa 4 – nieprawidłowa glikemia na czczo (IFG, ang. *impaired fasting glycaemia*) i nadwaga/otyłość (BMI 25,0–39,9 kg/m<sup>2</sup>), grupa 5 – nieprawidłowa tolerancja glukozy (IGT, ang. *impaired glucose tolerance*) i nadwaga/otyłość (BMI 25,0–39,9 kg/m<sup>2</sup>), grupa 6 – świeżo rozpoznana cukrzyca typu 2 (T2DM) i nadwaga/otyłość (BMI 25,0–39,9 kg/m<sup>2</sup>). Wyniki przedstawiono jako medianę oraz pierwszy-trzeci kwartyl

	Grupy normoglikemiczne						Grupy dysglikemiczne					
	Grupa 1	Grupa 2	Grupa 3	Grupa 4	Grupa 5	Grupa 6	Grupa 1	Grupa 2	Grupa 3	Grupa 4	Grupa 5	Grupa 6
n (♀ / ♂)	24 (12 / 12)	24 (12 / 12)	24 (12 / 12)	22 (11 / 11)	24 (12 / 12)	22 (11 / 11)	53,50 (46,0–57,0)	53,0 (40,0–57,0)	53,0 (46,0–57,0)	52,0 (46,0–58,0)	52,0 (46,0–58,0)	53,0 (44,0–58,0)
wiek [lata]	81,5 (75,0–88,0)	94,0 (89,0–98,0)	102,5 (97,5–117,0)	110,0 (106,0–114,0)	105,0 (99,5–110,0)	111,0 (102,0–122,0)						
talia [cm]	23,7 (22,5–24,1)	27,5 (26,7–28,3)	33,2 (31,4–36,1)	32,7 (29,2–34,1)	33,8 (30,5–36,6)	34,0 (29,1–36,3)						
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	120,0 (115,0–123,0)	129,0 (120,0–132,5)	130,0 (125,0–135,0)	135,0 (130,0–140,0)	130,0 (125,0–140,0)	130,0 (125,0–140,0)						
SBP [mmHg]	78,0 (70,0–80,0)	80,0 (75,0–81,0)	80,0 (78,0–85,0)	81,0 (80,0–90,0)	80,0 (75,0–88,0)	85,0 (80,0–90,0)						
DBP [mmHg]	5,97 (5,10–6,56)	6,36 (5,68–6,88)	6,77 (5,96–7,76)	7,37 (6,14–8,13)	7,03 (6,60–8,10)	7,22 (6,16–7,68)						
WBC [ $\times 10^9/l$ ]	1,30 (0,99–1,63)	2,12 (1,02–2,77)	2,10 (1,11–4,04)	3,19 (2,54–3,76)	3,32 (1,98–4,49)	3,75 (2,33–5,20)						
hsCRP [mg/l]	4,71 (4,37–4,94)	5,14 (5,00–5,30)	5,23 (5,13–5,46)	6,39 (6,17–6,61)	5,90 (5,50–6,04)	6,69 (6,48–6,79)						
F <sub>0</sub> G-0' [mmol/l]	5,02 (4,71–5,39)	5,64 (5,34–6,28)	6,86 (6,23–7,22)	7,16 (6,29–7,49)	8,98 (8,23–9,43)	13,08 (11,89–13,88)						
U <sub>0</sub> HbA <sub>1c</sub> [% Hb]	5,30 (5,20–5,40)	5,30 (5,20–5,40)	5,60 (5,50–5,70)	5,80 (5,70–5,90)	6,00 (5,80–6,10)	6,80 (6,40–7,00)						

Objaśnienia: n – liczebność; ♀ – kobiety, ♂ – mężczyźni; BMI- wskaźnik masy ciała (ang. *body mass index*); SBP – skurczowe ciśnienie tętnicze; DBP – rozkurczowe ciśnienie tętnicze; WBC – leukocyty krwi obwodowej; CRP – białko C-reaktywne; OGTT – test doustnego obciążenia glukozą (ang. *oral glucose tolerance test*); G-0' i G-120' – glikemia w 0. i 120. minucie OGTT; HbA<sub>1c</sub> – glikowana hemoglobina A<sub>1c</sub>.

**Tabela 20.** Charakterystyka badanych grup – parametry gospodarki węglowodanowej, inne niż glikemia w trakcie OGTT, oraz profil lipidowy. Grupy normoglikemiczne: grupa 1 – normoglikemia i prawidłowy BMI (BMI < 25,0 kg/m<sup>2</sup>), grupa 2 – normoglikemia i nadwaga (BMI 25,0–29,9 kg/m<sup>2</sup>), grupa 3 – normoglikemia i otyłość (BMI 30,0–39,9 kg/m<sup>2</sup>). Grupy dysglikemiczne: grupa 4 – nieprawidłowa glikemia na czczo (IFG) i nadwaga/otyłość (BMI 25,0–39,9 kg/m<sup>2</sup>), grupa 5 – nieprawidłowa tolerancja glukozy (IGT) i nadwaga/otyłość (BMI 25,0–39,9 kg/m<sup>2</sup>), grupa 6 – świeżo rozpoznana cukrzyca T2DM i nadwaga/otyłość (BMI 25,0–39,9 kg/m<sup>2</sup>). Wyniki przedstawiono jako medianę oraz pierwszy-trzeci kwartył

	Grupy normoglikemiczne						Grupy dysglikemiczne					
	Grupa 1	Grupa 2	Grupa 3	Grupa 4	Grupa 5	Grupa 6	Grupa 1	Grupa 2	Grupa 3	Grupa 4	Grupa 5	Grupa 6
n (♀ / ♂)	24 (12 / 12)	24 (12 / 12)	24 (12 / 12)	22 (11 / 11)	24 (12 / 12)	22 (11 / 11)	24 (12 / 12)	24 (12 / 12)	24 (12 / 12)	24 (12 / 12)	24 (12 / 12)	22 (11 / 11)
Ins-0' [mU/l]	7,59 (7,25–8,42)	10,83 (8,72–15,70)	12,60 (10,53–15,88)	13,46 (10,54–15,71)	16,76 (12,24–19,21)	15,41 (10,12–17,62)	10,62 (9,77–13,29)	26,09 (20,72–35,74)	37,11 (29,16–59,89)	38,15 (26,39–57,34)	75,94 (59,19–95,07)	40,16 (32,23–65,47)
Ins-120' [mU/l]	57,88 (53,75–63,35)	38,30 (35,37–41,99)	31,42 (28,340–34,84)	28,90 (25,68–32,73)	22,62 (20,32–23,30)	18,52 (16,65–20,89)	12,73 (11,17–14,78)	5,83 (5,05–7,47)	4,42 (3,44–5,33)	3,66 (3,02–4,48)	2,31 (1,84–2,62)	2,27 (2,00–3,15)
ISI <sub>0,120</sub>	1,54 (1,45–1,85)	2,42 (1,96–3,55)	2,91 (2,35–3,66)	3,77 (3,13–4,44)	4,44 (3,20–5,21)	4,23 (3,06–5,23)	5,30 (5,20–5,40)	5,60 (5,50–5,70)	5,80 (5,70–5,90)	6,00 (5,80–6,10)	6,80 (6,40–7,00)	5,93 (5,04–6,57)
HbA <sub>1c</sub> [% Hb]	4,43 (3,88–5,01)	5,11 (4,78–5,75)	5,76 (4,99–6,13)	5,52 (4,95–6,20)	5,57 (5,00–6,34)	5,93 (5,04–6,57)	1,44 (1,27–1,66)	1,43 (1,26–1,71)	1,13 (1,05–1,29)	1,24 (1,14–1,43)	1,15 (0,99–1,32)	1,12 (0,91–1,33)
T-C [mmol/l]	0,95 (0,75–1,06)	1,17 (0,96–1,59)	1,67 (1,43–2,38)	1,81 (1,41–2,30)	1,97 (1,49–2,35)	2,31 (1,78–3,05)	2,63 (2,04–3,21)	3,02 (2,72–3,77)	3,71 (3,04–4,11)	3,38 (2,89–3,83)	3,57 (3,17–4,05)	3,79 (2,67–4,30)
LDL-C [mmol/l]	2,68 (2,33–3,49)	3,62 (3,11–4,34)	4,63 (3,89–4,99)	4,25 (3,73–4,80)	4,51 (3,94–4,89)	4,75 (3,80–5,36)						

Objaśnienia: n – liczebność; ♀ – kobiety, ♂ – mężczyźni; Ins-0' i Ins-120' – insulिनemia w 0. i 120. minucie OGTT; ISI<sub>0,120</sub> – wskaźnik insulिनow-  
 raźliwości, indeks Gutt (mg·l<sup>-1</sup>·mmol<sup>-1</sup>·mU<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>); ISI<sub>Matsuda</sub> – wskaźnik insulिनowraźliwości, indeks Matsuda (l<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>·mU<sup>-1</sup>); HOMA-IR (ang. ho-  
 meostasis model assessment of insulin resistance) – wskaźnik insulिनoporności (mU·mmol<sup>-1</sup>·l<sup>-2</sup>); HbA<sub>1c</sub> – glikowana hemoglobina A<sub>1c</sub>; T-C – cho-  
 lesterol całkowity; HDL-C – cholesterol frakcji HDL; TAG – triacyloglicerole; LDL-C – cholesterol frakcji LDL; nieHDL-C = [T-C] – [HDL-C].

**Tabela 21.** Charakterystyka badanych grup – dysmutaza ponadtlenkowa: aktywność SOD-1 w erytrocytach (SOD), ekspresja genu SOD-1 w PBMC (xSOD) i logarytm wartości ekspresji genu SOD-1 (log xSOD); wartości uzyskane w trakcie testu doustnego obciążenia glukozą (OGTT) w 0. minucie (0') i w 120. minucie (120') oraz wskaźnik zmiany w trakcie OGTT: indeks  $R_{75} = [120']/[0']$

	Grupy normoglikemiczne						
	Grupa 1	Grupa 2	Grupa 3	Grupa 4	Grupa 5	Grupa 6	
F50	SOD-0' [U/gHGB]	1258 1164-1365	1389 1296-1464	1485 1245-1690	1309 1216-1514	1577 1434-1859	1187 1045-1279
	SOD-120' [U/gHGB]	1433 1368-1738	1578 1514-1656	1460 1293-1764	1327 1012-1509	1510 1304-1791	966,4 897,2-1150
F50	SOD- $R_{75}$	1,18 1,06-1,31	1,14 1,09-1,24	1,03 0,90-1,16	0,99 0,78-1,18	0,95 0,81-1,08	0,86 0,70-0,99
	xSOD-0' [ $\times 10^3$ ]	15,45 8,05-20,95	25,10 11,50-37,70	29,95 16,65-75,00	18,05 8,00-40,50	64,55 37,35-131,0	4,20 2,70-8,82
F50	xSOD-120' [ $\times 10^3$ ]	37,80 21,05-56,20	124,0 64,65-159,0	45,20 21,55-222,0	17,95 3,89-48,90	69,3 22,85-138,5	3,06 1,46-4,25
	xSOD- $R_{75}$	2,69 2,02-4,16	3,59 2,27-7,15	1,68 0,75-2,83	0,93 0,33-2,66	0,80 0,25-1,97	0,53 0,37-1,00
F50	log xSOD-0'	9,65 8,99-9,95	10,13 9,35-10,54	10,31 9,69-11,20	9,80 8,99-10,61	11,07 10,53-11,78	8,34 7,90-9,08
	log xSOD-120'	10,54 9,95-10,93	11,23 11,08-11,97	10,72 9,98-12,31	9,77 8,27-10,80	11,15 10,04-11,84	8,03 7,29-8,35
	log xSOD- $R_{75}$	1,10 1,07-1,15	1,12 1,08-1,20	1,05 0,97-1,09	0,99 0,88-1,09	0,98 0,87-1,06	0,93 0,88-1,00

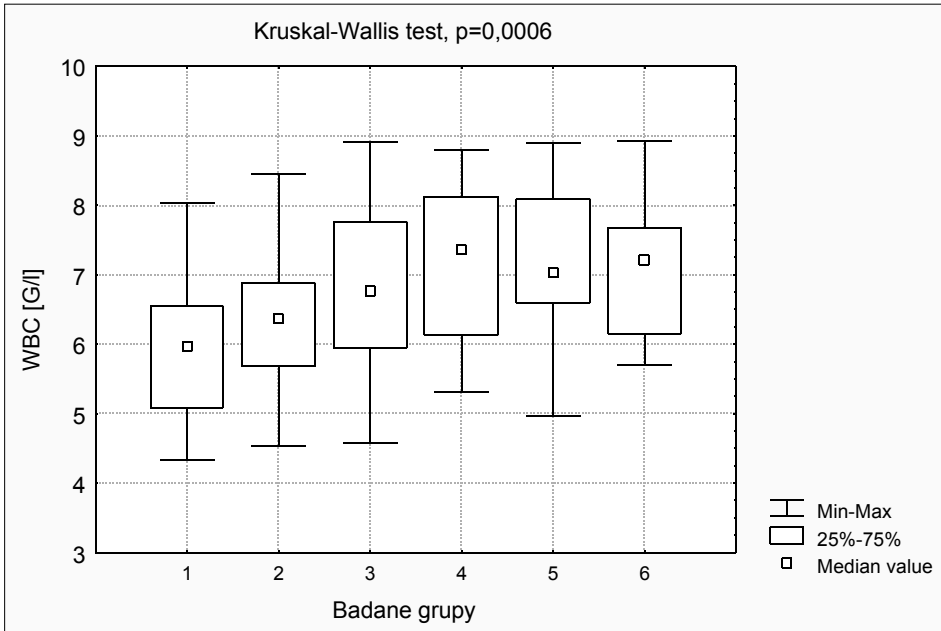
**Tabela 22.** Charakterystyka badanych grup – stężenie całkowitego stanu antyoksydacyjnego (TAS) osocza i stężenie produktów peroksydacji lipidów (TBARS) w osoczu; wartości uzyskane w trakcie testu doustnego obciążenia glukozą (OGTT) w 0. minucie (0') i w 120. minucie (120'), wskaźnik TAS-0'/TBARS-0' oraz wskaźniki zmiany w trakcie OGTT: indeks  $R_{-75} = [120']/[0']$  i wskaźnik  $TAS-R_{-75}/TBARS-R_{-75}$

	Grupy normoglikemiczne						
	Grupa 1	Grupa 2	Grupa 3	Grupa 4	Grupa 5	Grupa 6	
F50	TAS-0' [mmol/l]	1,28 1,25–1,35	1,39 1,22–1,49	1,45 1,33–1,56	1,54 1,44–1,59	1,51 1,37–1,68	1,20 1,11–1,27
	TAS-120' [mmol/l]	1,37 1,26–1,43	1,37 1,30–1,55	1,37 1,29–1,50	1,40 1,34–1,72	1,28 1,21–1,42	1,02 0,96–1,10
F50	TAS-R <sub>75</sub>	1,03 1,00–1,08	1,02 0,95–1,11	0,97 0,90–1,00	0,99 0,93–1,05	0,88 0,82–0,95	0,86 0,81–0,92
	TBARS-0' [μmol/l]	2,95 2,36–4,10	3,02 2,47–4,64	5,64 5,18–6,23	6,42 5,21–7,79	7,01 6,23–8,81	7,03 5,70–9,60
F50	TBARS-120' [μmol/l]	2,98 2,42–4,12	3,01 2,43–4,20	6,22 5,44–6,73	7,41 5,48–8,14	8,06 6,59–8,89	8,69 6,63–11,44
	TBARS-R <sub>75</sub>	1,02 0,95–1,13	0,96 0,91–1,11	1,09 1,02–1,18	1,05 1,00–1,16	1,06 0,99–1,22	1,13 1,08–1,25
F50	TAS-0'/TBARS-0'	0,40 0,32–0,58	0,48 0,27–0,53	0,26 0,22–0,31	0,24 0,22–0,31	0,21 0,18–0,25	0,16 0,12–0,22
	TAS-R <sub>75</sub> /TBARS-R <sub>75</sub>	1,026 0,91–1,11	1,07 0,89–1,20	0,85 0,77–0,96	0,93 0,81–1,02	0,81 0,70–0,95	0,73 0,68–0,79

**Tabela 23.** Porównanie parametrów stresu oksydacyjnego w trakcie testu doustnego obciążenia glukozą – w tabeli podano poziom istotności p. Zmienne w trakcie testu doustnego obciążenia glukozą (OGTT) w 0. minucie (0') i w 120. minucie (120'): SOD – aktywność SOD-1 w erytrocytach; xSOD – ekspresja genu dla SOD-1 w PBMC; log xSOD – logarytm wartości xSOD; TAS – stężenie całkowitego stanu antyoksydacyjnego; TBARS – stężenie produktów peroksydacji lipidów w osoczu

	OGTT	Wszyscy	Grupa 1	Grupa 2	Grupa 3	Grupa 4	Grupa 5	Grupa 6
	0'							
	120'							
	SOD-0'	0,2109	< 0,0001	< 0,0001	0,7751	0,3896	0,0919	0,0061
	xSOD-0'	0,0013	< 0,0001	< 0,0001	0,2301	0,8583	0,2301	0,1080
	log xSOD-0'	0,0269	< 0,0001	< 0,0001	0,3458	0,3896	0,1374	0,0666
	TAS-0'	0,0003	0,0015	0,2414	0,0119	0,5267	0,0002	< 0,0001
	TBARS-0'	< 0,0001	0,3758	0,9317	0,0002	0,0081	0,0025	< 0,0001

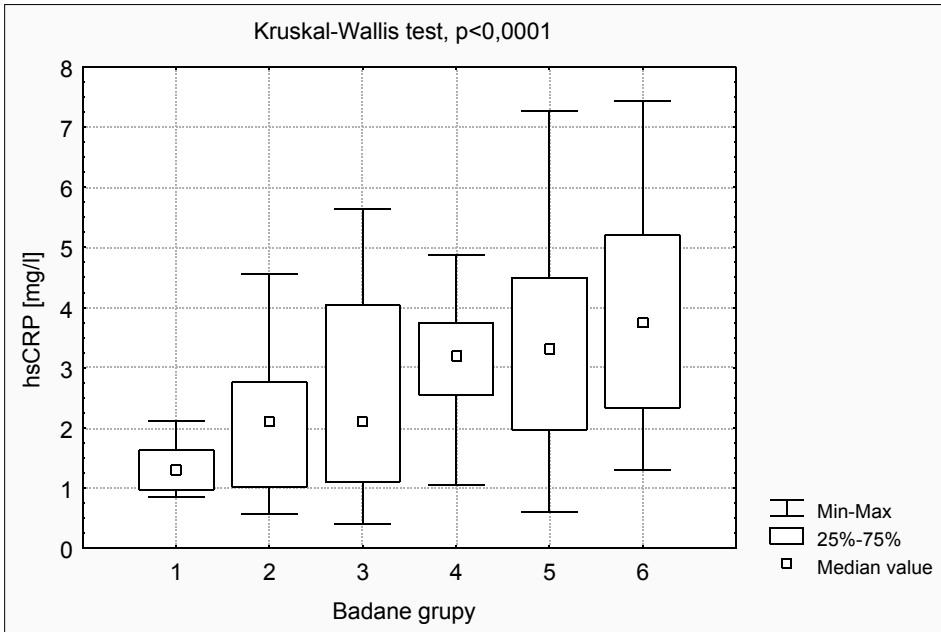




WBC: test Kruskala-Wallis,  $p = 0,0006$ ;  
wartość  $p$  dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		1,0000	0,2152	<b>0,0071</b>	<b>0,0070</b>	<b>0,0125</b>
2	1,0000		1,0000	0,2177	0,2294	0,3299
3	0,2152	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000
4	<b>0,0071</b>	0,2177	1,0000		1,0000	1,0000
5	<b>0,0070</b>	0,2294	1,0000	1,0000		1,0000
6	<b>0,0125</b>	0,3299	1,0000	1,0000	1,0000	

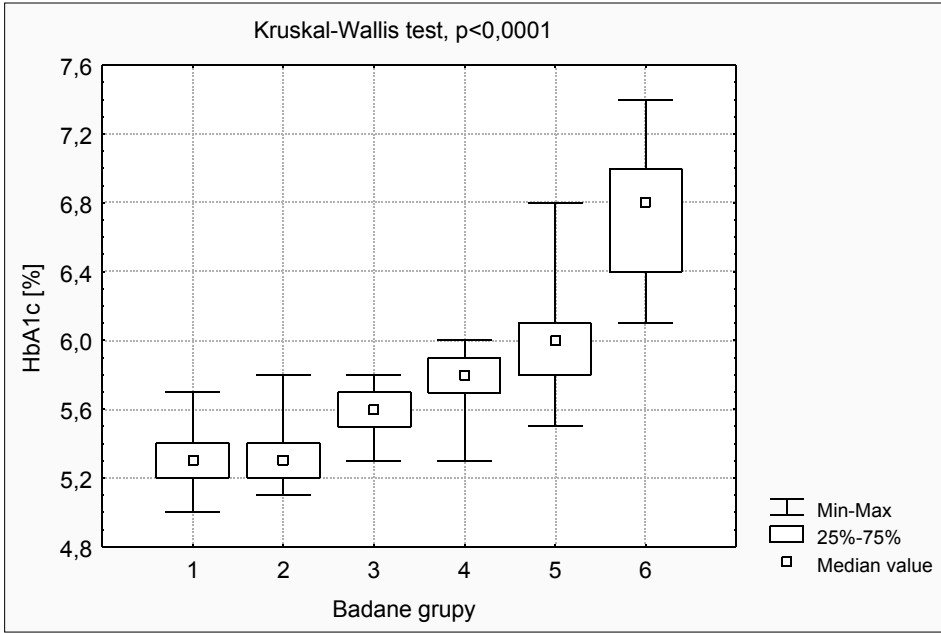
**Rycina 1.** Porównanie liczby WBC między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallis (rycina) z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).



hsCRP: test Kruskala-Wallisa,  $p < 0,0001$ ;  
wartość  $p$  dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		0,6597	0,0502	<b>0,0001</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0000</b>
2	0,6597		1,0000	0,2098	0,2719	<b>0,0146</b>
3	0,0502	1,0000		1,0000	1,0000	0,2467
4	<b>0,0001</b>	0,2098	1,0000		1,0000	1,0000
5	<b>0,0002</b>	0,2719	1,0000	1,0000		1,0000
6	<b>0,0000</b>	<b>0,0146</b>	0,2463	1,0000	1,0000	

**Rycina 2.** Porównanie stężenia hsCRP między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallisa (rycina) z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).



HbA<sub>1c</sub>: test Kruskala-Wallisa,  $p < 0,0001$ ;  
wartość  $p$  dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		1,0000	0,0540	<b>0,0001</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
2	1,0000		0,1203	<b>0,0002</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
3	0,0540	0,1203		1,0000	<b>0,0220</b>	<b>0,0000</b>
4	<b>0,0001</b>	<b>0,0002</b>	1,0000		1,0000	<b>0,0028</b>
5	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0220</b>	1,0000		0,1773
6	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0028</b>	0,1773	

**Rycina 3.** HbA<sub>1c</sub>. Porównanie wartości HbA<sub>1c</sub> między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallisa (rycina) z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).

## Gospodarka lipidowa

Badane grupy różniły się między sobą stężeniem **T-C** (Rycina 4): grupy 3, 4, 5, i 6 ujawniły wyższe stężenie cholesterolu całkowitego w porównaniu z grupą 1. Natomiast grupy 2, 3, 4, 5 i 6 nie różniły się między sobą stężeniem T-C w osoczu.

Badane grupy różniły się między sobą stężeniem **TAG** (Rycina 5): grupy 3, 4, 5 i 6 prezentowały wyższe stężenia triacylogliceroli w porównaniu z grupą 1 oraz w porównaniu z grupą 2. Grupy 3, 4, 5 i 6 nie różniły się między sobą stężeniem TAG w osoczu.

Badane grupy różniły się między sobą stężeniem **HDL-C** (Rycina 6): grupy 3, 4, 5 i 6 ujawniły niższe stężenie cholesterolu frakcji HDL w porównaniu z grupą 1 oraz grupy 3, 5 i 6 – w porównaniu z grupą 2. Grupy 3, 4, 5 i 6 nie różniły się między sobą stężeniem HDL-C w osoczu.

Badane grupy różniły się między sobą stężeniem **LDL-C** (Rycina 7): grupy 3, 4, 5 i 6 prezentowały wyższe stężenie cholesterolu frakcji LDL w porównaniu z grupą 1. Grupy 2, 3, 4, 5 i 6 nie różniły się między sobą stężeniem LDL-C w osoczu.

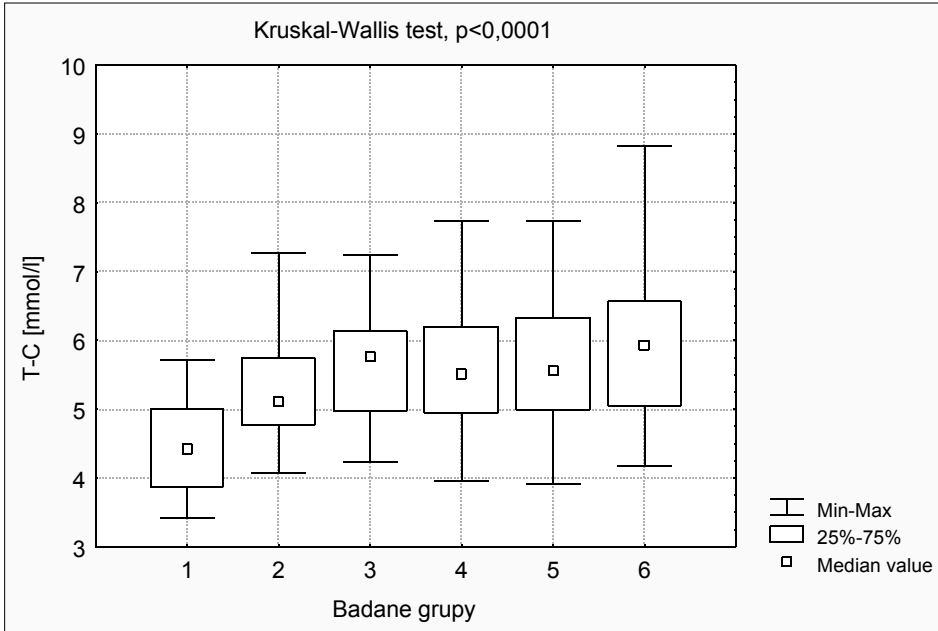
Badane grupy różniły się między sobą stężeniem **nieHDL-C** (Rycina 8): grupy 3, 4, 5 i 6 prezentowały wyższe stężenie cholesterolu nieHDL w porównaniu z grupą 1. Natomiast grupy 2, 3, 4, 5 i 6 nie różniły się między sobą stężeniem nieHDL-C.

### 4.2.2. Wskaźniki insulinowrażliwości–insulinooporności

Przeprowadzenie testu doustnego obciążenia glukozą pozwoliło obliczyć dynamiczne wskaźniki insulinowrażliwości ISI:  $ISI_{0,120}$  – tzw. indeks Gutt (od nazwiska badaczki Miriam Gutt) i  $ISI_{Matsuda}$  wg badacza Masafumi Matsuda, oprócz często stosowanego (gdyż opierającego się jedynie na wynikach badań jednopunktowych – glikemii i insulinemii na czczo) wskaźnika insulinooporności HOMA-IR.

Badane grupy różniły się między sobą wskaźnikiem insulinooporności HOMA-IR (Rycina 9): grupy 2, 3, 4, 5 i 6 prezentowały wyższe wartości HOMA-IR w porównaniu z grupą 1 a grupy 4, 5 i 6 – w porównaniu z grupą 2. Ponadto grupa 5 ujawniła wyższe wartości wskaźnika niż grupa 3. Brak różnic między grupami dysglikemicznymi 4, 5 i 6 potwierdza niską użyteczność HOMA-IR do różnicowania klinicznych postaci zaburzeń glikemii, w przeciwieństwie do znaczenia diagnostycznego w rozpoznawaniu insulinooporności wynikającej z nadmiernej masy ciała, zwłaszcza gdy towarzyszy jej dysglikemia (ogólnie – bez podziału na stan przedcukrzycowy i cukrzycę).

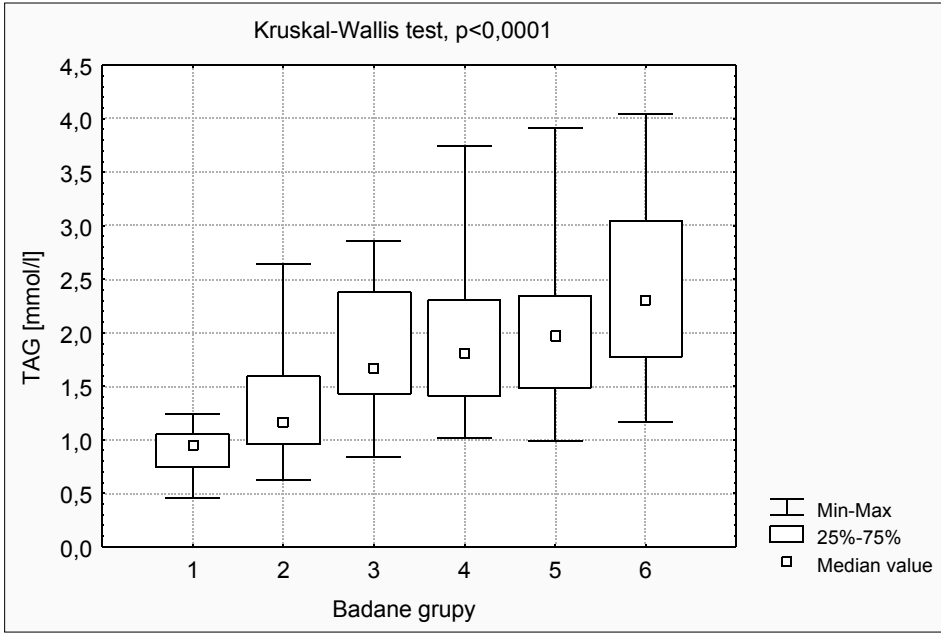
Wszystkie grupy ujawniły obniżanie się wskaźnika Matsudy (Rycina 10): grupy 3, 4, 5 i 6 prezentowały niższe wartości w porównaniu z grupą 1, grupy 4, 5



T-C: test Kruskala-Wallisa,  $p < 0,0001$ ;  
wartość  $p$  dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		0,0504	<b>0,0002</b>	<b>0,0004</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,0000</b>
2	0,0504		1,0000	1,0000	1,0000	0,7027
3	<b>0,0002</b>	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000
4	<b>0,0004</b>	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000
5	<b>0,0001</b>	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000
6	<b>0,0000</b>	0,7027	1,0000	1,0000	1,0000	

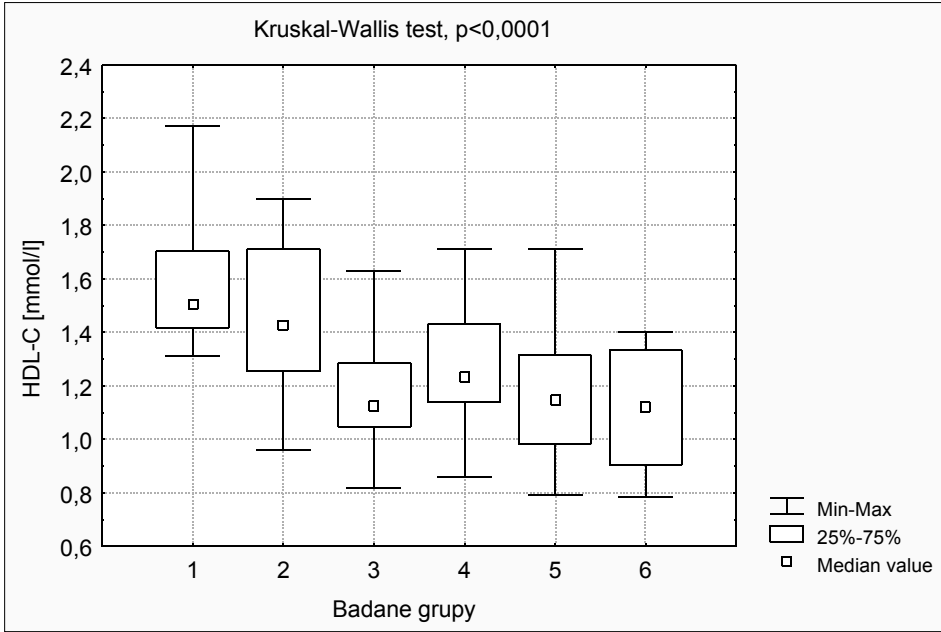
**Rycina 4.** Porównanie stężenia cholesterolu całkowitego w surowicy (T-C) między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallisa (rycina) z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).



TAG: test Kruskala-Wallisa,  $p < 0,0001$ ;  
wartość p dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		0,4911	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
2	0,4911		<b>0,0455</b>	<b>0,0223</b>	<b>0,0037</b>	<b>0,0000</b>
3	<b>0,0000</b>	<b>0,0455</b>		1,0000	1,0000	0,7769
4	<b>0,0000</b>	<b>0,0223</b>	1,0000		1,0000	1,0000
5	<b>0,0000</b>	<b>0,0037</b>	1,0000	1,0000		1,0000
6	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	0,7769	1,0000	1,0000	

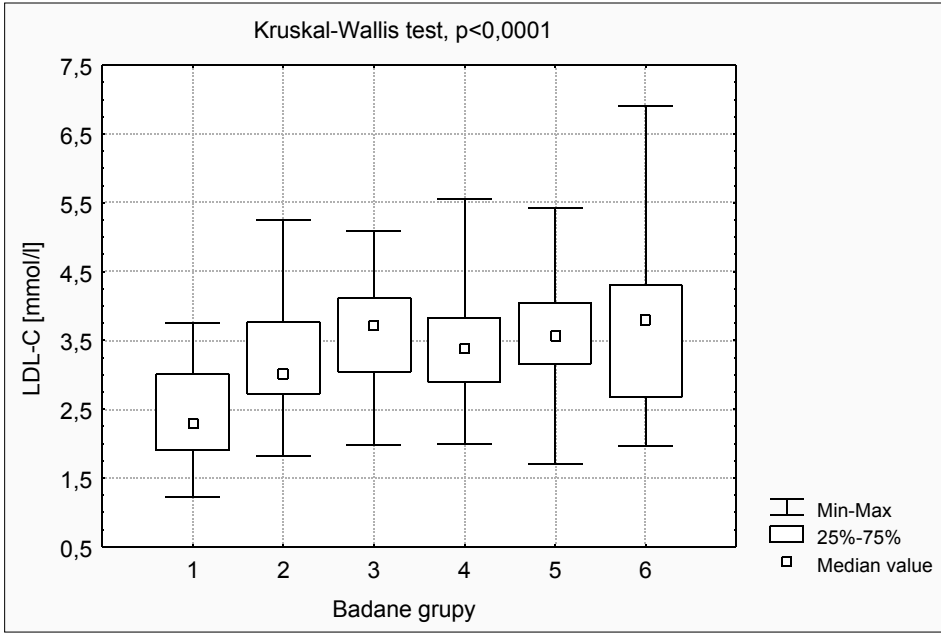
**Rycina 5.** Porównanie stężenia triacylogliceroli (TAG) między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallisa (rycina) z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).



HDL-C: test Kruskala-Wallisa,  $p < 0,0001$ ;  
wartość p dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		1,0000	<b>0,0000</b>	<b>0,0043</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
2	1,0000		<b>0,0194</b>	0,9173	<b>0,0329</b>	<b>0,0021</b>
3	<b>0,0000</b>	<b>0,0194</b>		1,0000	1,0000	1,0000
4	<b>0,0043</b>	0,9173	1,0000		1,0000	0,8701
5	<b>0,0000</b>	<b>0,0329</b>	1,0000	1,0000		1,0000
6	<b>0,0000</b>	<b>0,0021</b>	1,0000	0,8701	1,0000	

**Rycina 6.** Porównanie stężenia cholesterolu frakcji HDL (HDL-C) między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallisa (rycina) z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).

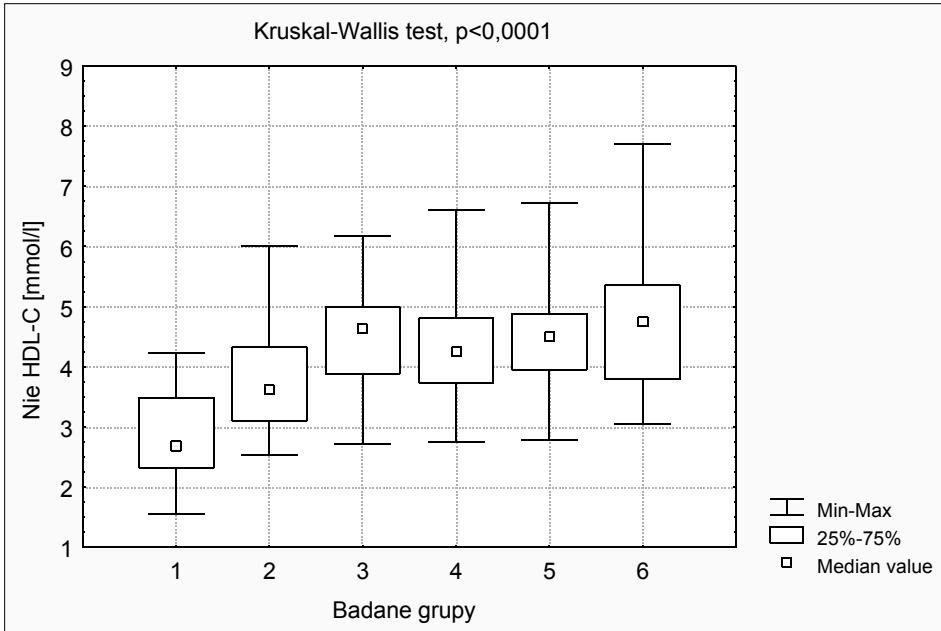


LDL-C: test Kruskala-Wallisa,  $p < 0,0001$ ;  
wartość p dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		0,0696	<b>0,0001</b>	<b>0,0040</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,0008</b>
2	0,0696		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
3	<b>0,0001</b>	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000
4	<b>0,0040</b>	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000
5	<b>0,0001</b>	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000
6	<b>0,0008</b>	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	

**Rycina 7.** Porównanie stężenia cholesterolu frakcji LDL (LDL-C) między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallisa (rycina) z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).

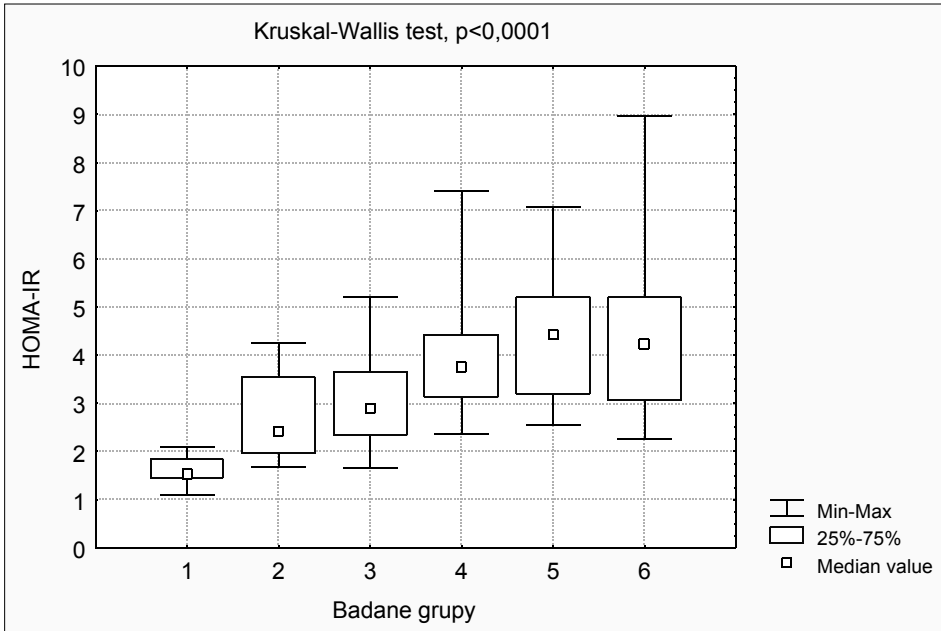




nieHDL-C: test Kruskala-Wallisa,  $p < 0,0001$ ;  
wartość  $p$  dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		0,0609	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
2	0,0609		0,2825	1,0000	0,2174	0,0772
3	<b>0,0000</b>	0,2825		1,0000	1,0000	1,0000
4	<b>0,0000</b>	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000
5	<b>0,0000</b>	0,2174	1,0000	1,0000		1,0000
6	<b>0,0000</b>	0,0772	1,0000	1,0000	1,0000	

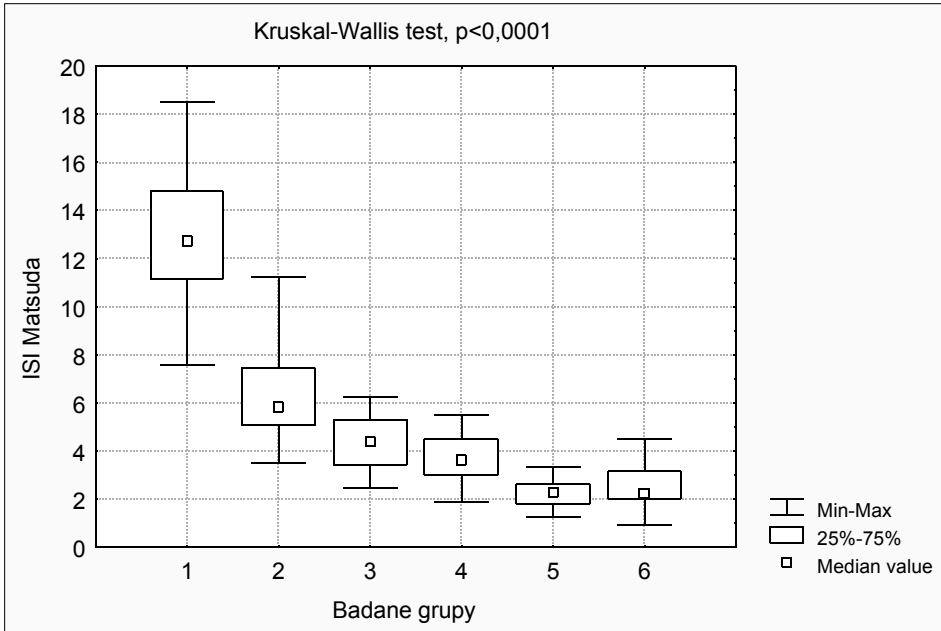
**Rycina 8.** Porównanie stężenia nieHDL-C między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallisa (rycina) z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).



HOMA-IR: test Kruskala-Wallisa,  $p < 0,0001$ ;  
wartość  $p$  dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		<b>0,0067</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
2	<b>0,0067</b>		1,0000	<b>0,0481</b>	<b>0,0016</b>	<b>0,0046</b>
3	<b>0,0001</b>	1,0000		0,5912	<b>0,0460</b>	0,0967
4	<b>0,0000</b>	<b>0,0481</b>	0,5912		1,0000	1,0000
5	<b>0,0000</b>	<b>0,0016</b>	<b>0,0460</b>	1,0000		1,0000
6	<b>0,0000</b>	<b>0,0046</b>	0,0967	1,0000	1,0000	

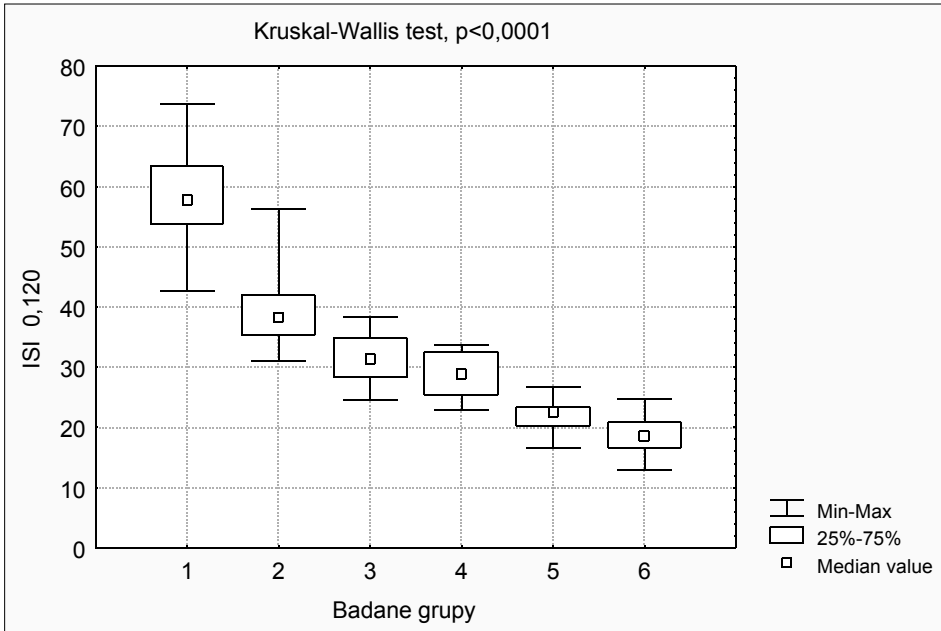
**Rycina 9.** Porównanie wskaźnika HOMA-IR między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallisa (rycina) z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).



$ISI_{Matsuda}$ : test Kruskala-Wallisa,  $p < 0,0001$ ;  
 wartość  $p$  dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		0,1745	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
2	0,1745		0,4782	<b>0,0383</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
3	<b>0,0000</b>	0,4782		1,0000	<b>0,0008</b>	<b>0,0091</b>
4	<b>0,0000</b>	<b>0,0383</b>	1,0000		<b>0,0351</b>	0,2102
5	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0008</b>	<b>0,0351</b>		1,0000
6	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0091</b>	0,2102	1,0000	

**Rycina 10.** Porównanie  $ISI_{Matsuda}$  (indeks Matsudy) między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallisa (rycina) z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).



ISI<sub>0,120</sub>: test Kruskala-Wallisa,  $p < 0,0001$ ;  
wartość  $p$  dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		0,5224	<b>0,0002</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
2	0,5224		0,3477	<b>0,0145</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
3	<b>0,0002</b>	0,3477		1,0000	<b>0,0020</b>	<b>0,0000</b>
4	<b>0,0000</b>	<b>0,0145</b>	1,0000		0,1191	<b>0,0017</b>
5	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0020</b>	0,1191		1,0000
6	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0017</b>	1,0000	

**Rycina 11.** Porównanie ISI<sub>0,120</sub> (indeks Gutt) między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallisa (rycina) z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).

i 6 – w porównaniu z grupą 2, grupy 5 i 6 ujawniły niższe wartości wskaźnika insulinowrażliwości niż grupa 3, a grupa 5 – niższe niż grupa 4. Spośród kobiet i mężczyzn ze stanem przedcukrzycowym osoby z IGT prezentowały mniejszą insulinowrażliwość niż osoby z IFG. W badanej populacji nie stwierdzono różnic między grupą 5 i 6 – co pokazuje, że i ten parametr nie różnicuje świeżo rozpoznanej cukrzycy typu 2 od stanu przedcukrzycowego.

Badane grupy prezentowały zmniejszanie się wartości  $ISI_{0,120}$  (Rycina 11): grupy 3, 4, 5 i 6 – w odniesieniu do grupy 1, grupy 4, 5, 6 – w porównaniu z grupą 2, grupy 5 i 6 – w porównaniu z grupą 3 oraz grupa 6 – w odniesieniu do grupy 4. Różnica między grupą 5 i 6 okazała się nieistotna statystycznie.

### 4.2.3. Markery stresu oksydacyjnego

#### *Dysmutaza ponadtlenkowa SOD-1 – ocena aktywności enzymu w erytrocytach (SOD)*

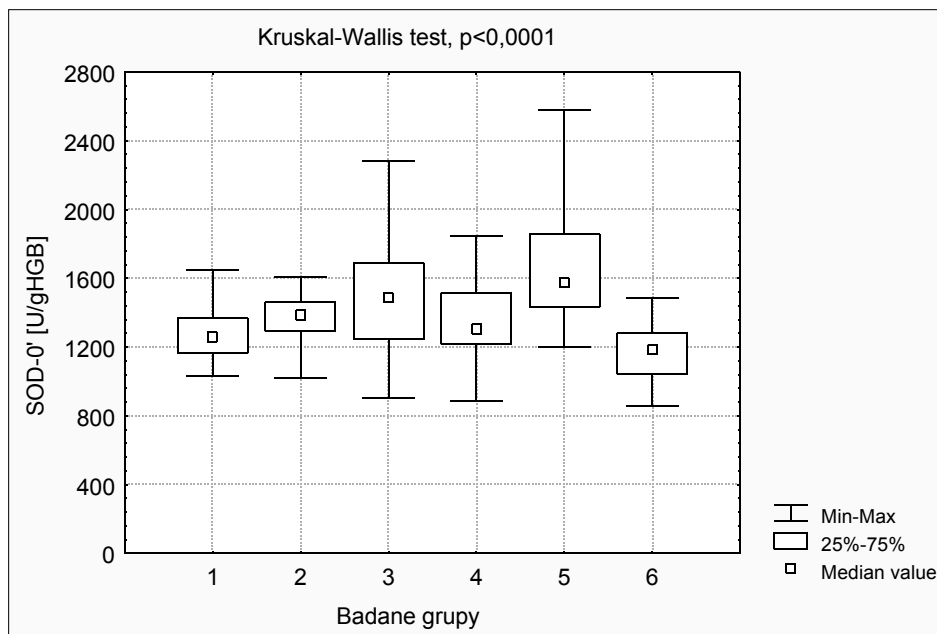
Badane grupy różniły się między sobą aktywnością SOD-1 w erytrocytach na czczo, **SOD-0'** (Rycina 12). Zauważono tendencję wzrostową dla SOD-0' od grupy 1 do grupy 5, przy czym istotna statystycznie różnica występowała między grupą 5 i grupą 1 oraz grupą 5 i grupą 4. Natomiast grupa 6 zaprezentowała niższe aktywności SOD-1 w erytrocytach na czczo niż pozostałe grupy, zwłaszcza istotne statystycznie w porównaniu z grupą 2, 3 i 5.

Badane grupy różniły się aktywnością SOD-1 w 120. minucie testu doustnego obciążenia glukozą, **SOD-120'** (Rycina 13). Nie obserwowano jednego kierunku zmian SOD-120' od grupy 1 do grupy 6 – wartości SOD-120' fluktuowały, a istotne statystycznie różnice dotyczyły niższej aktywności SOD-120' w grupie 6 w porównaniu z grupą 1, 2, 3 i 5 oraz niższej aktywności SOD-120' w grupie 4 w porównaniu z grupą 2.

Dla oceny zmian aktywności SOD-1 w trakcie testu doustnego obciążenia glukozą, w odpowiedzi na bodziec 75,0 gramów glukozy, zaproponowałam indeks  $SOD-R_{75} = [SOD-120'] / [SOD-0']$  – różniący się między badanymi grupami. W grupach od 1 do 6, w przyjętym modelu narastania ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2, zaobserwowano obniżanie się SOD- $R_{75}$  (Rycina 14): grupy 4, 5 i 6 prezentowały niższe wartości wskaźnika w porównaniu z grupą 1 oraz w porównaniu z grupą 2. Grupy 3, 4, 5 i 6 nie różniły się między sobą indeksem SOD- $R_{75}$ .

#### *Dysmutaza ponadtlenkowa SOD-1 – ocena ekspresji genu dla SOD-1 w PBMC (xSOD)*

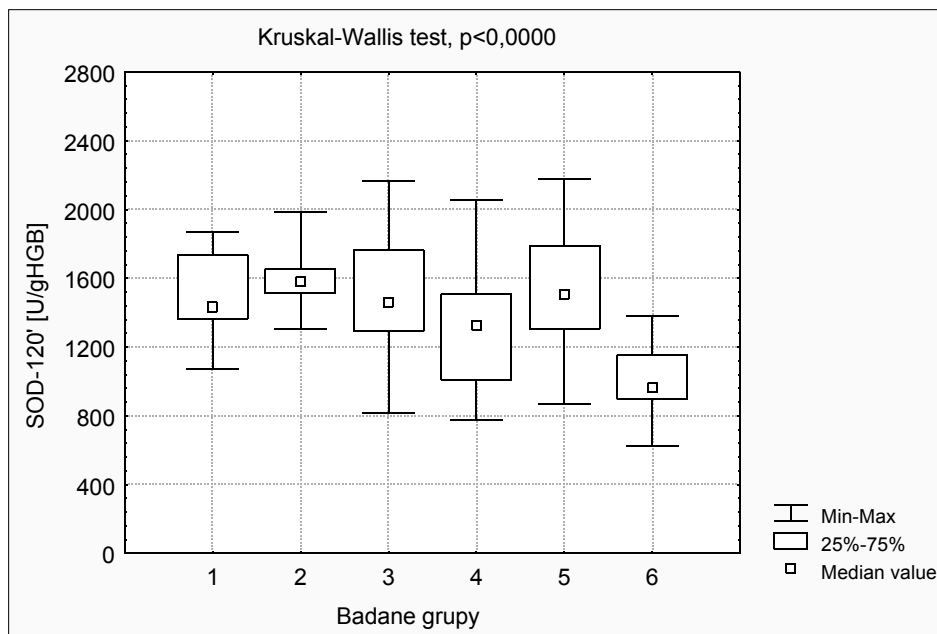
Badane grupy różniły się między sobą ekspresją genu dla SOD-1 w PBMC na czczo, **xSOD-0'** (Rycina 15): grupy 3 i 5 ujawniły wyższą ekspresję w porównaniu



SOD-0': test Kruskala-Wallisa,  $p < 0,0001$ ;  
wartość p dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		0,8820	0,0956	1,0000	0,0000	1,0000
2	0,8820		1,0000	1,0000	0,0562	<b>0,0396</b>
3	0,0956	1,0000		1,0000	0,5902	<b>0,0019</b>
4	1,0000	1,0000	1,0000		<b>0,0095</b>	0,2631
5	<b>0,0000</b>	0,0562	0,5902	<b>0,0095</b>		<b>0,0000</b>
6	1,0000	<b>0,0396</b>	<b>0,0019</b>	0,2631	<b>0,0000</b>	

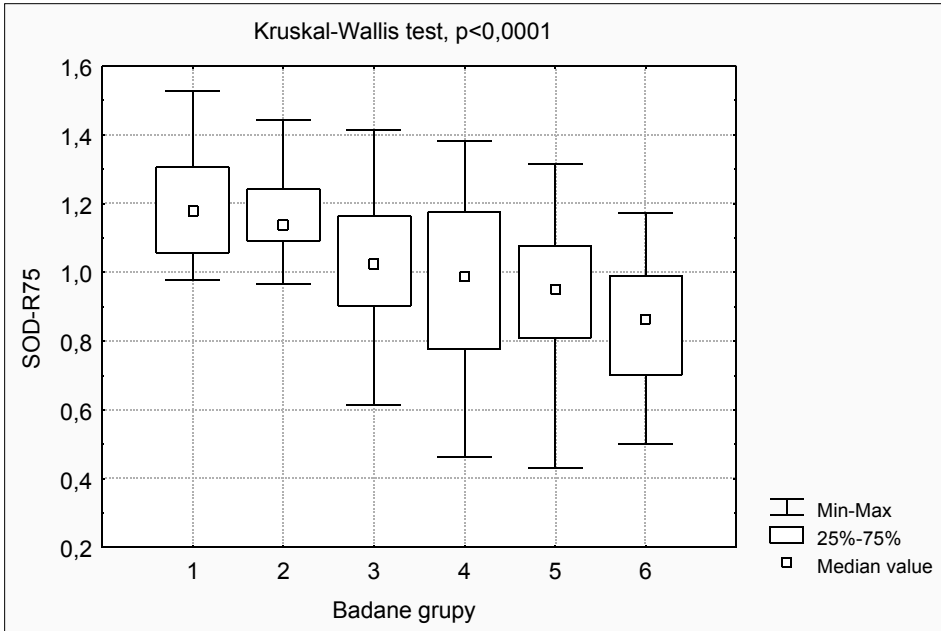
**Rycina 12.** Porównanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w erytrocytach na czczo (SOD-0') między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallisa (rycina) z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).



SOD-120': test Kruskala-Wallisa,  $p < 0,0001$ ;  
wartość p dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		1,0000	1,0000	0,6449	1,0000	<b>0,0000</b>
2	1,0000		1,0000	<b>0,0359</b>	1,0000	<b>0,0000</b>
3	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	<b>0,0001</b>
4	0,6449	<b>0,0359</b>	1,0000		0,5471	0,0673
5	1,0000	1,0000	1,0000	0,5471		0,0000
6	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0001</b>	0,0673	<b>0,0000</b>	

**Rycina 13.** Porównanie aktywności SOD-120' między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallisa (rycyna) z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).

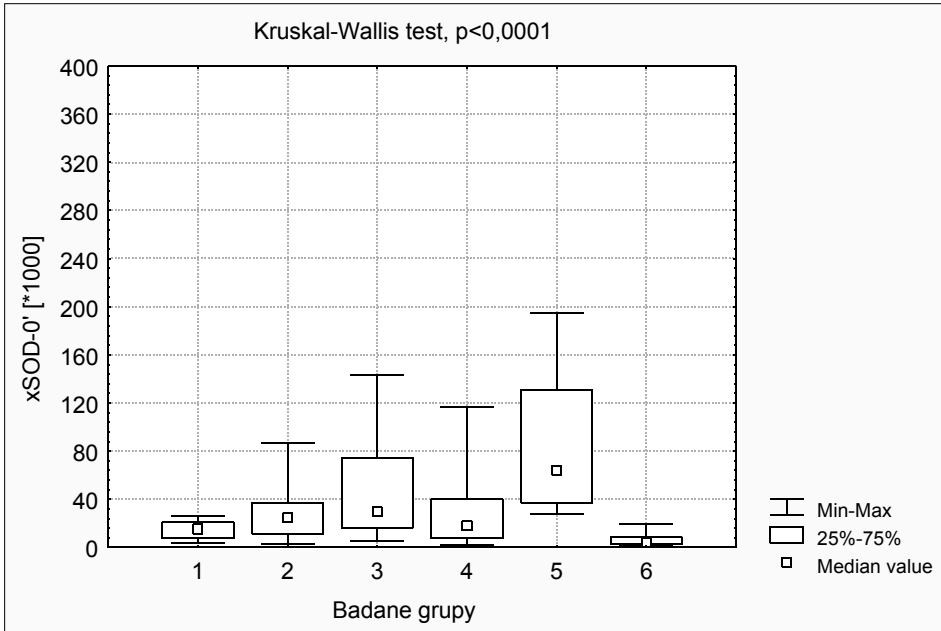


SOD-R<sub>75</sub>: test Kruskala-Wallisa,  $p < 0,0001$ ;  
wartość p dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		1,0000	0,0605	<b>0,0128</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,0000</b>
2	1,0000		0,1608	<b>0,0383</b>	<b>0,0012</b>	<b>0,0001</b>
3	0,0605	0,1608		1,0000	1,0000	0,5297
4	<b>0,0128</b>	<b>0,0383</b>	1,0000		1,0000	1,0000
5	<b>0,0003</b>	<b>0,0012</b>	1,0000	1,0000		1,0000
6	<b>0,0000</b>	<b>0,00001</b>	0,5297	1,0000	1,0000	

**Rycina 14.** Porównanie indeksu SOD-R<sub>75</sub> między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallisa (rycina) z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).





xSOD-0': test Kruskala-Wallisa,  $p < 0,0001$ ;  
 wartość p dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		0,8469	<b>0,0345</b>	1,0000	<b>0,0000</b>	0,3157
2	0,8469		1,0000	1,0000	<b>0,0051</b>	<b>0,0004</b>
3	<b>0,0345</b>	1,0000		1,0000	0,2195	<b>0,0000</b>
4	1,0000	1,0000	1,0000		<b>0,0007</b>	<b>0,0063</b>
5	<b>0,0000</b>	<b>0,0051</b>	0,2195	<b>0,0007</b>		<b>0,0000</b>
6	0,3157	<b>0,0004</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0063</b>	<b>0,0000</b>	

**Rycina 15.** Porównanie ekspresji xSOD-0' między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallisa (rycina) z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).

z grupą 1 a grupa 5 – dodatkowo w porównaniu z grupą 2 i 4. Grupa 6 prezentowała niższą ekspresję SOD-1 niż pozostałe grupy, a istotną statystycznie różnicę wykazano w porównaniu z grupami 2, 3, 4 i 5.

Badane grupy różniły się między sobą ekspresją genu dla SOD-1 w PBMC w 120. minucie OGTT, **xSOD-120'** (Rycina 16). Nie obserwowano jednego kierunku zmian xSOD-120'. Grupa 6 prezentowała niższą ekspresję SOD-1 niż pozostałe grupy, a istotną statystycznie różnicę wykazano w porównaniu z grupami 1, 2, 3 i 5, natomiast grupa 4 ujawniła niższe xSOD-120' niż grupa 2. Najwyższe wartości xSOD-120' zaobserwowano w grupach, kolejno, 6 i 3.

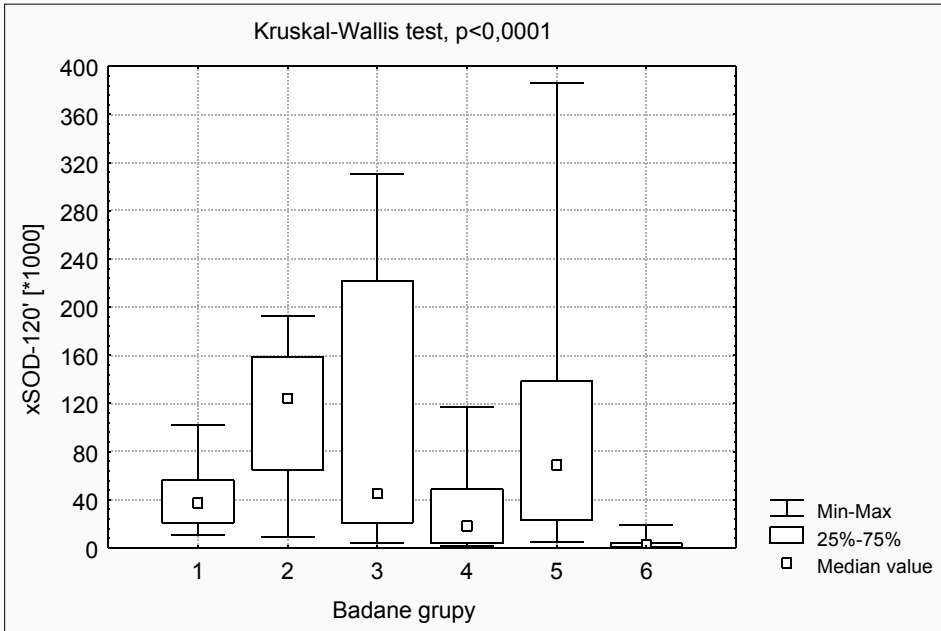
Dla oceny zmian ekspresji SOD-1 w PBMC, w trakcie testu doustnego obciążenia glukozą, w odpowiedzi na bodziec 75,0 gramów glukozy, zaproponowałam indeks  $\text{xSOD-R}_{75} = [\text{xSOD-120}'] / [\text{xSOD-0}']$ , który różnił się między badanymi grupami. Grupy 4, 5 i 6 prezentowały niższy xSOD-R<sub>75</sub> (Rycina 17) w porównaniu z grupą 1 a grupy 3, 4, 5 i 6 w porównaniu z grupą 2. Najwyższy wskaźnik xSOD-R<sub>75</sub> zaobserwowano w grupie 2.

#### *Dysmutaza ponadtlenkowa SOD-1 – ocena ekspresji genu dla SOD-1 w PBMC jako log wartości xSOD (log xSOD)*

Badane grupy różniły się między sobą ekspresją genu dla SOD-1 wyrażoną jako **log xSOD-0'** (Rycina 18). Zaobserwowano narastanie **log xSOD-0'** w grupach od 1 do 5 z istotnie wyższymi wartościami w grupie 3 i 5 w porównaniu z grupą 1 oraz w grupie 5 w porównaniu z grupami 2 i 4. Natomiast grupa 6 zaprezentowała niższy log xSOD-0' niż pozostałe grupy, różnica była istotna statystycznie w porównaniu z grupą 2, 3, 4 i 5.

Badane grupy różniły się między sobą log wartości ekspresji genu dla SOD-1 w PBMC w 120. minucie OGTT, **log xSOD-120'** (Rycina 19). Nie obserwowano jednego kierunku zmian tego parametru. Grupa 6 prezentowała niższy log xSOD-120' niż pozostałe grupy, a istotną statystycznie różnicę wykazano w porównaniu z grupami 1, 2, 3 i 5, natomiast grupa 4 ujawniła niższe xSOD-120' niż grupa 2.

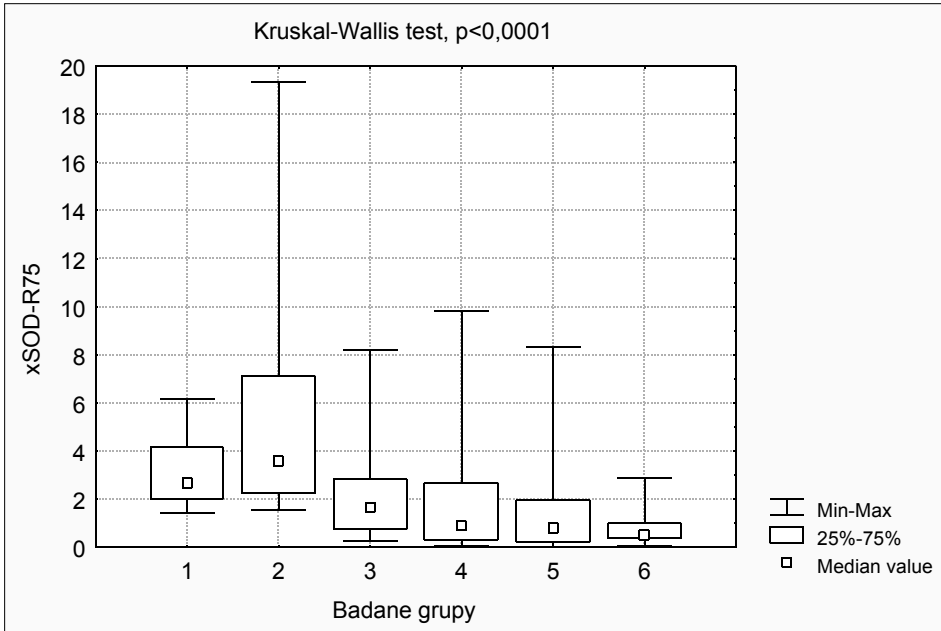
Zmianę ekspresji SOD-1 w PBMC, w trakcie testu doustnego obciążenia glukozą, w odpowiedzi na bodziec 75,0 gramów glukozy, śledzono również w oparciu o indeks  $[\text{log xSOD}]\text{-R}_{75} = [\text{log xSOD-120}'] / [\text{log xSOD-0}']$ , który różnił się między badanymi grupami. Zaobserwowano obniżanie się tego parametru od grupy 1 do grupy 6 (Rycina 20): grupy 4, 5 i 6 prezentowały niższy  $[\text{log xSOD}]\text{-R}_{75}$  w porównaniu z grupą 1, a grupy 3, 4, 5 i 6 – w porównaniu z grupą 2.



xSOD-120': Test Kruskala-Wallisa,  $p < 0,0001$ ;  
wartość p dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		0,0941	1,0000	1,0000	1,0000	<b>0,0001</b>
2	0,0941		1,0000	<b>0,0003</b>	1,0000	<b>0,0000</b>
3	1,0000	1,0000		0,1212	1,0000	<b>0,0000</b>
4	1,0000	<b>0,0003</b>	0,1212		0,0726	0,0628
5	1,0000	1,0000	1,0000	0,0726		<b>0,0000</b>
6	<b>0,0001</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	0,0628	<b>0,0000</b>	

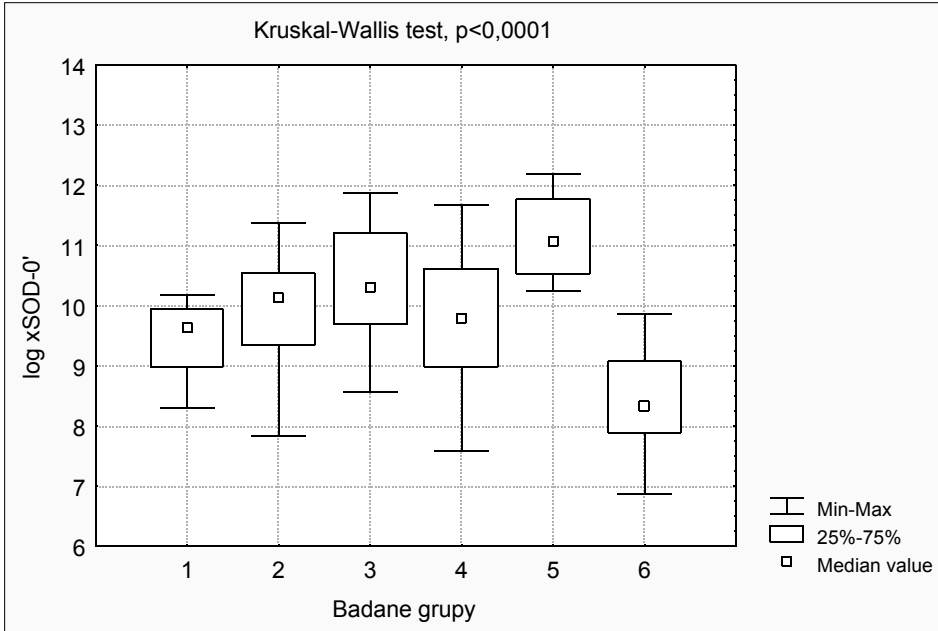
**Rycina 16.** Porównanie ekspresji xSOD-120' między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallisa (rycyna) z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).



xSOD-R<sub>75</sub>: test Kruskala-Wallisa,  $p < 0,0001$ ;  
 wartość p dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		1,0000	0,5555	<b>0,0382</b>	<b>0,0017</b>	<b>0,0002</b>
2	1,0000		<b>0,0270</b>	<b>0,0008</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
3	0,5555	<b>0,0270</b>		1,0000	1,0000	0,3525
4	<b>0,0382</b>	<b>0,0008</b>	1,0000		1,0000	1,0000
5	<b>0,0017</b>	<b>0,0000</b>	1,0000	1,0000		1,0000
6	<b>0,0002</b>	<b>0,0000</b>	0,3525	1,0000	1,0000	

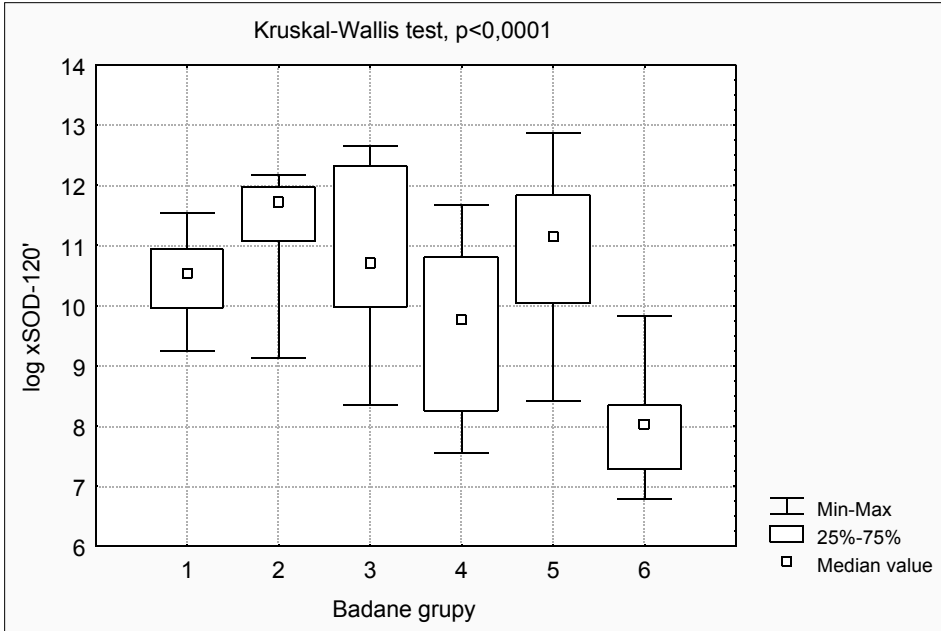
**Rycina 17.** Porównanie indeksu xSOD-R<sub>75</sub> między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallisa (rycina) z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).



log xSOD-0': test Kruskala-Wallisa,  $p < 0,0001$ ;  
wartość p dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		0,8469	<b>0,0345</b>	1,0000	<b>0,0000</b>	0,3157
2	0,8469		1,0000	1,0000	<b>0,0051</b>	<b>0,0004</b>
3	<b>0,0345</b>	1,0000		1,0000	0,2195	<b>0,0000</b>
4	1,0000	1,0000	1,0000		<b>0,0007</b>	<b>0,0063</b>
5	<b>0,0000</b>	<b>0,0051</b>	0,2195	<b>0,0007</b>		<b>0,0000</b>
6	0,3157	<b>0,0004</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0063</b>	<b>0,0000</b>	

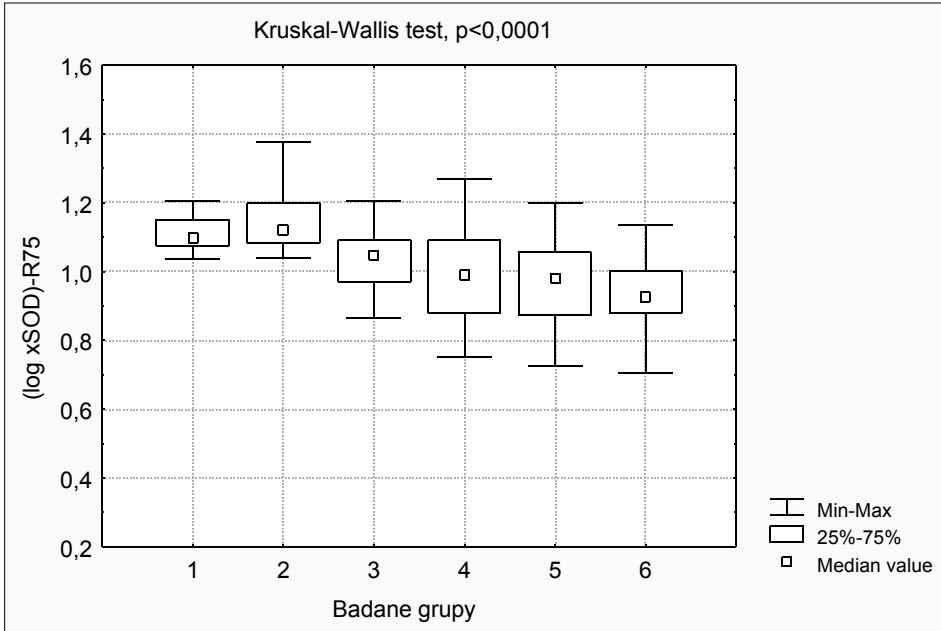
**Rycina 18.** Porównanie logarytmu wartości xSOD-0' ( $\log xSOD-0'$ ) między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallisa (rycina) z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).



log xSOD-120': test Kruskala-Wallisa,  $p < 0,0001$ ;  
wartość p dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		0,0941	1,0000	1,0000	1,0000	<b>0,0001</b>
2	0,0941		1,0000	<b>0,0003</b>	1,0000	<b>0,0000</b>
3	1,0000	1,0000		0,1212	1,0000	<b>0,0000</b>
4	1,0000	<b>0,0003</b>	0,1212		0,0726	0,0628
5	1,0000	1,0000	1,0000	0,0726		<b>0,0000</b>
6	<b>0,0001</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	0,0628	<b>0,0000</b>	

**Rycina 19.** Porównanie logarytmu wartości xSOD-120' ( $\log xSOD-120'$ ) między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallisa (rycina) z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).



(log xSOD)- $R_{75}$ : test Kruskala-Wallisa,  $p < 0,0001$ ;  
wartość p dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		1,0000	0,3078	<b>0,0342</b>	<b>0,0008</b>	<b>0,0002</b>
2	1,0000		<b>0,0302</b>	<b>0,0021</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
3	0,3078	<b>0,0301</b>		1,0000	1,0000	0,5126
4	<b>0,0342</b>	<b>0,0021</b>	1,0000		1,0000	1,0000
5	<b>0,0008</b>	<b>0,0000</b>	1,0000	1,0000		1,0000
6	<b>0,0002</b>	<b>0,0000</b>	0,5126	1,0000	1,0000	

**Rycina 20.** Porównanie indeksu  $R_{75}$  logarytmów wartości xSOD w trakcie OGTT ( $\log xSOD$ )- $R_{75}$ , między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallisa (rycina) z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).

### *Całkowity stan antyoksydacyjny (TAS) osocza*

Badane grupy różniły się między sobą stężeniem TAS w osoczu na czczo, **TAS-0'** (Rycina 21). Zauważono tendencję wzrostową dla TAS-0' od grupy 1 do grupy 5: grupy 3, 4 i 5 ujawniły wyższe TAS-0' w porównaniu z grupą 1, dodatkowo grupa 4 – w porównaniu grupą 2. Natomiast grupa 6 zaprezentowała niższe TAS-0' niż pozostałe grupy, istotnie statystycznie w porównaniu z grupą 2, 3, 4 i 5.

Zróżnicowanie stężenia TAS w osoczu w 120. minucie testu doustnego obciążenia glukozą, **TAS-120'** między grupami (Rycina 22) wyrażało się obniżaniem TAS-120' od grupy 4 do grupy 6, a stężenia w grupie 6 były niższe od każdej z pozostałych grup, tj. 1, 2, 3, 4 i 5.

Zmianę stężeń TAS osocza w trakcie testu doustnego obciążenia glukozą, w odpowiedzi na bodziec 75,0 gramów glukozy, oceniono wyliczając indeks **TAS-R<sub>75</sub>** = [TAS-120']/[TAS-0'], który różnił się między badanymi grupami. Zaobserwowano obniżanie się tego parametru od grupy 1 do grupy 3 i od grupy 4 do grupy 6 (Rycina 23). Grupy 3, 5 i 6 ujawniły niższe wartości w porównaniu z grupą 1, grupy 5 i 6 – w porównaniu z grupą 2 oraz grupa 6 – w porównaniu z grupą 4.

### *Produkty peroksydacji składników lipidowych (TBARS) osocza*

Badane grupy różniły się między sobą stężeniem TBARS w osoczu na czczo, **TBARS-0'** (Rycina 24). Stężenie TBARS-0', podobne w grupach 1 i 2, następnie zwiększało się aż do grupy 6; stężenia w grupach 3, 4, 5 i 6 były wyższe niż w grupach 1 i 2.

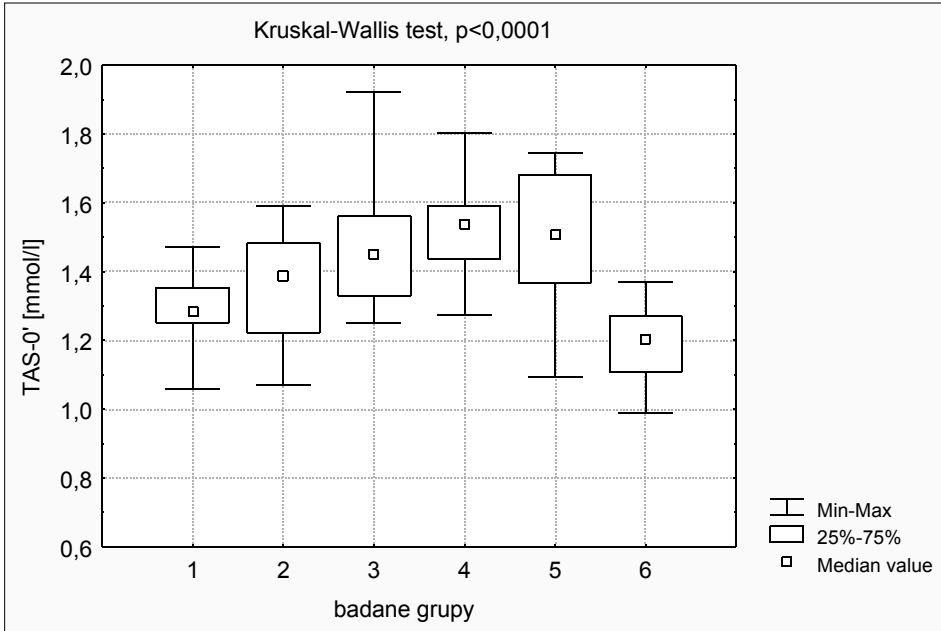
Stężenia TBARS w osoczu, w 120. minucie testu doustnego obciążenia glukozą, **TBARS-120'** (Rycina 25), podobne w grupach 1 i 2, kolejno narastały aż do grupy 6. Grupy 3, 4, 5 i 6 prezentowały wyższe TBARS-120' w porównaniu z grupami 1 i 2.

Zmianę stężeń TBARS osocza w trakcie testu doustnego obciążenia glukozą, w odpowiedzi na bodziec 75,0 gramów glukozy, śledzono w oparciu o indeks **TBARS-R<sub>75</sub>** = [TBARS-120']/[TBARS-0'] – jego wartość w grupie 6 była wyższa niż w grupach 1 i 2 (Rycina 26).

### *Wskaźnik TAS-0'/TBARS-0'*

Badane grupy różniły się między sobą wskaźnikiem TAS-0'/TBARS-0' (Rycina 27), który przyjmował podobne wartości w grupach 1 i 2, a następnie zmniejszał się aż do grupy 6. Wskaźnik w grupach 4, 5 i 6 był niższy niż w grupach 1 i 2; dodatkowo w grupie 6 – niższy niż w grupie 3.

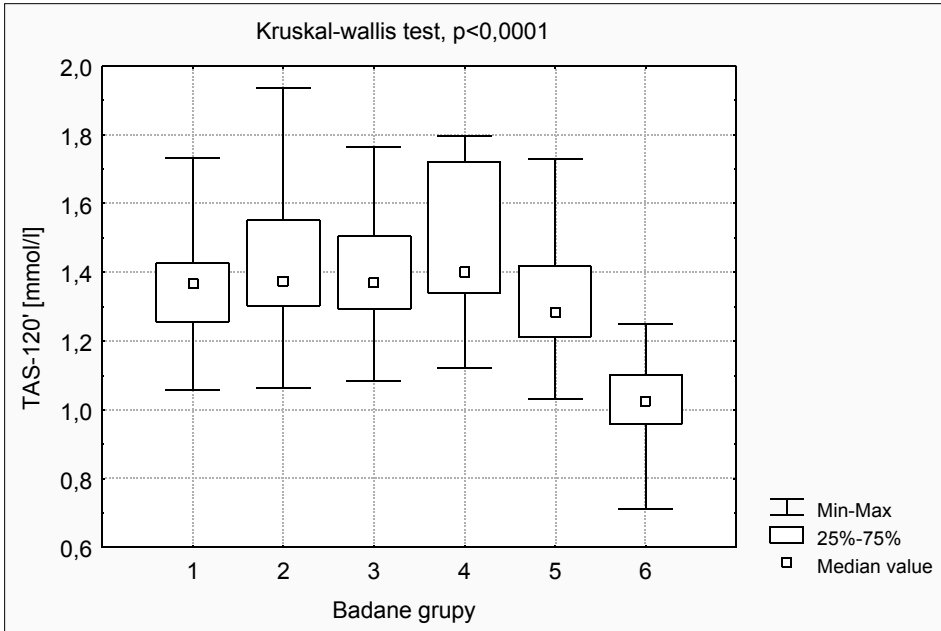




TAS-0': test Kruskala-Wallisa,  $p < 0,0001$ ;  
wartość p dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		1,0000	<b>0,0135</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0003</b>	1,0000
2	1,0000		1,0000	<b>0,0287</b>	0,1105	<b>0,0408</b>
3	<b>0,0135</b>	1,0000		1,0000	1,0000	<b>0,0000</b>
4	<b>0,0000</b>	<b>0,0287</b>	1,0000		1,0000	<b>0,0000</b>
5	<b>0,0003</b>	0,1105	1,0000	1,0000		<b>0,0000</b>
6	1,0000	<b>0,0408</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	

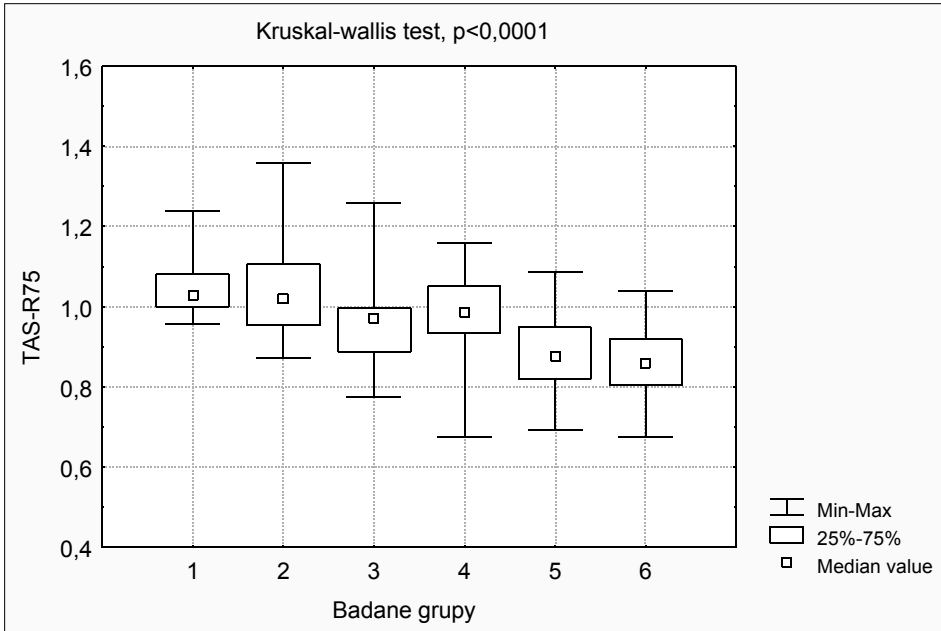
**Rycina 21.** Porównanie stężenia TAS-0' między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallisa (rycina) z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).



TAS-120': test Kruskala-Wallisa,  $p < 0,0001$ ;  
wartość p dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	<b>0,0000</b>
2	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	<b>0,0000</b>
3	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	<b>0,0000</b>
4	1,0000	1,0000	1,0000		0,3325	<b>0,0000</b>
5	1,0000	1,0000	1,0000	0,3325		<b>0,0003</b>
6	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0003</b>	

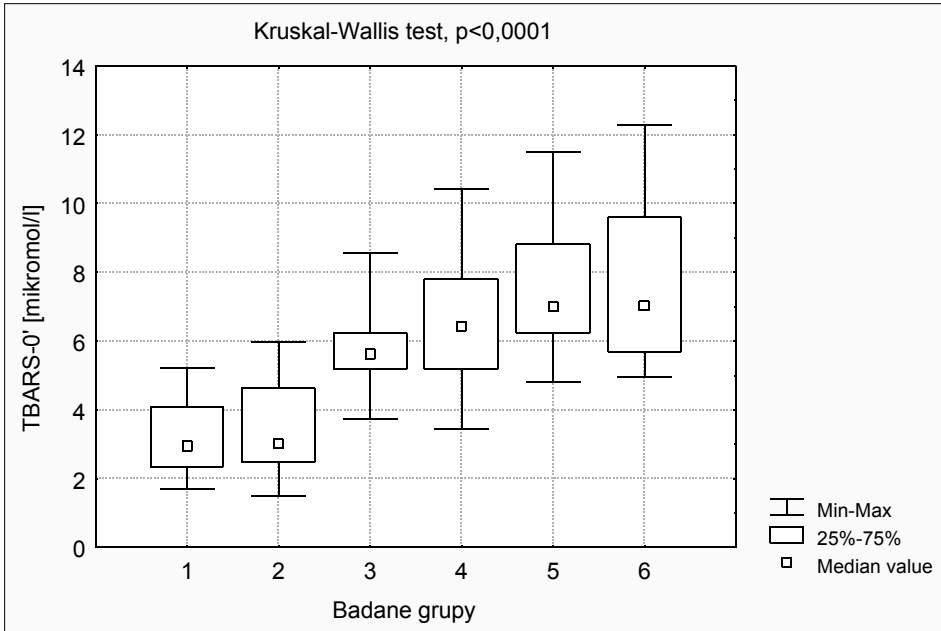
**Rycina 22.** Porównanie stężenia TAS-120' między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallisa (rycina) z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).



TAS-R<sub>75</sub>: test Kruskala-Wallisa,  $p < 0,0001$ ;  
wartość p dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		1,0000	<b>0,0241</b>	0,3386	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
2	1,0000		0,3575	1,0000	<b>0,0003</b>	<b>0,0000</b>
3	<b>0,0241</b>	0,3575		1,0000	0,6570	0,0685
4	0,3386	1,0000	1,0000		0,0824	<b>0,0055</b>
5	<b>0,0000</b>	<b>0,0003</b>	0,6570	0,0824		1,0000
6	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	0,0685	<b>0,0055</b>	1,0000	

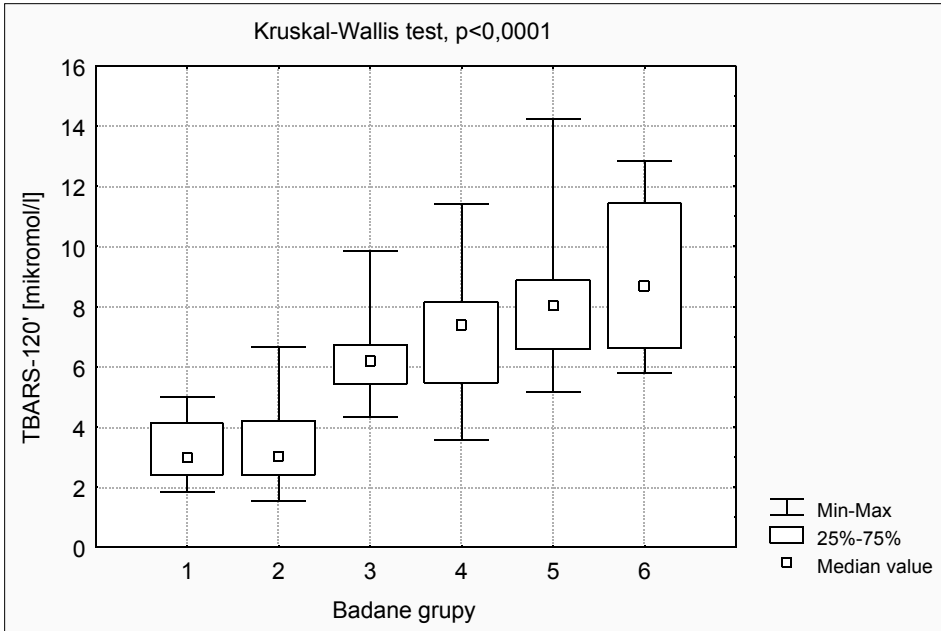
**Rycina 23.** Porównanie indeksu TAS-R<sub>75</sub> między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallisa (rycina) z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).



TBARS-0': test Kruskala-Wallisa,  $p < 0,0001$ ;  
wartość p dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		1,0000	<b>0,0003</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
2	1,0000		<b>0,0023</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
3	<b>0,0003</b>	<b>0,0023</b>		1,0000	0,2825	0,2872
4	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	1,0000		1,0000	1,0000
5	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	0,2825	1,0000		1,0000
6	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	0,2872	1,0000	1,0000	

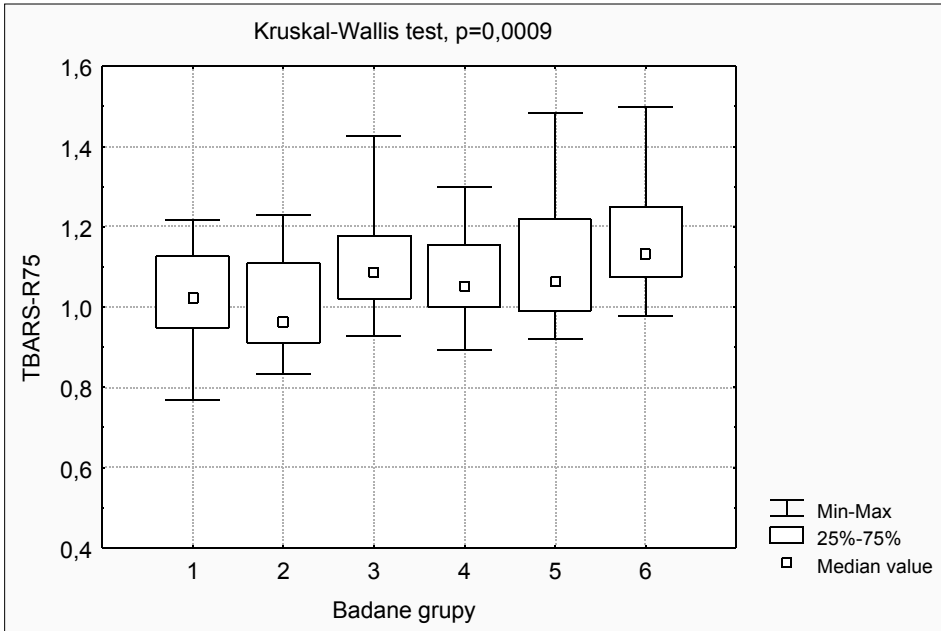
**Rycina 24.** Porównanie stężenia TBARS-0' między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallisa (rycina) z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).



TBARS-120': test Kruskala-Wallisa,  $p < 0,0001$ ;  
wartość  $p$  dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		1,0000	<b>0,0003</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
2	1,0000		<b>0,0023</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
3	<b>0,0003</b>	<b>0,0023</b>		1,0000	0,2825	0,2872
4	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	1,0000		1,0000	1,0000
5	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	0,2825	1,0000		1,0000
6	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	0,2872	1,0000	1,0000	

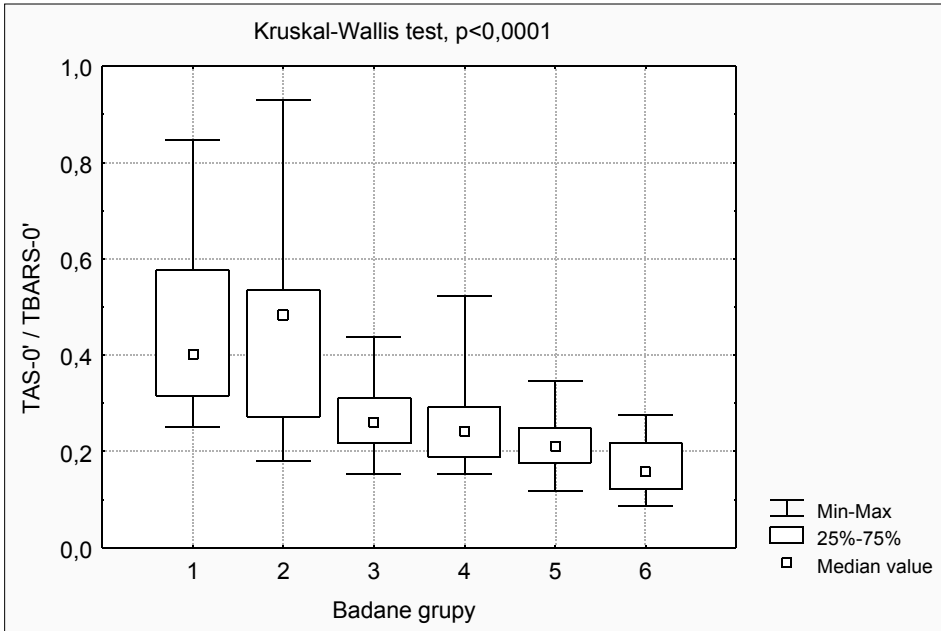
**Rycina 25.** Porównanie stężenia TBARS-120' między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallisa (rycina) z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).



TBARS-R<sub>75</sub>: test Kruskala-Wallisa,  $p = 0,0009$ ;  
wartość p dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		1,0000	0,4573	1,0000	1,0000	<b>0,0153</b>
2	1,0000		0,0765	1,0000	0,2398	<b>0,0014</b>
3	0,4573	0,0765		1,0000	1,0000	1,0000
4	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	0,4621
5	1,0000	0,2398	1,0000	1,0000		1,0000
6	<b>0,0153</b>	<b>0,0014</b>	1,0000	0,4621	1,0000	

**Rycina 26.** Porównanie indeksu TBARS-R<sub>75</sub> między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallisa (rycina) z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).



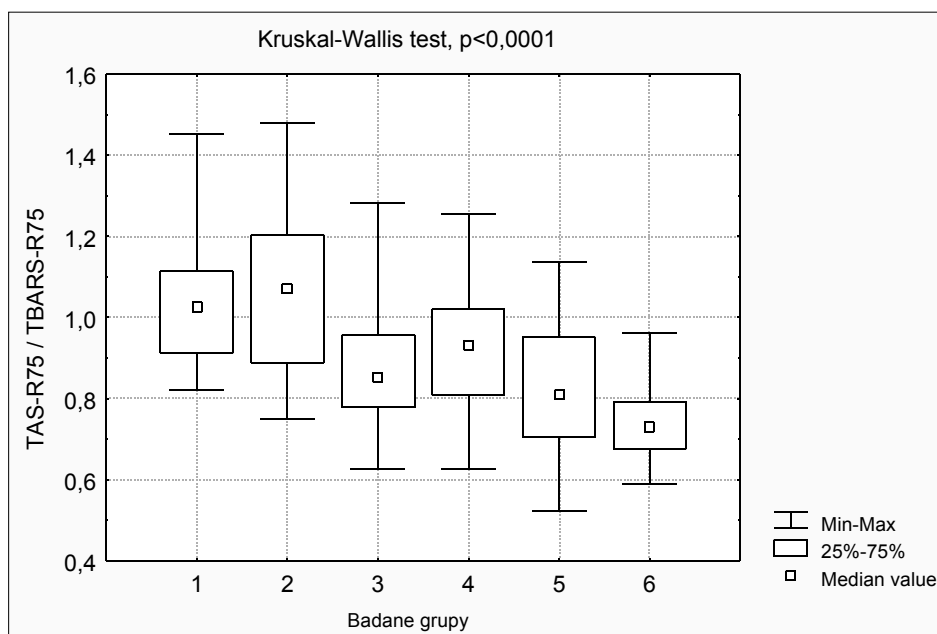
TAS-0'/TBARS-0': test Kruskala-Wallisa,  $p < 0,0001$   
wartość p dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		1,0000	0,0126	<b>0,0009</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
2	1,0000		0,0598	<b>0,0055</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
3	<b>0,0126</b>	0,0598		1,0000	0,7610	<b>0,0100</b>
4	<b>0,0009</b>	<b>0,0055</b>	1,0000		1,0000	0,1390
5	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	0,7610	1,0000		1,0000
6	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0100</b>	0,1391	1,0000	

**Rycina 27.** Porównanie wskaźnika TAS-0'/TBARS-0' między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallisa z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).

### Wskaźnik $TAS-R_{75}/TBARS-R_{75}$

Badane grupy różniły się wartością wskaźnika  $TAS-R_{75}/TBARS-R_{75}$  (Rycina 28). Zaobserwowano obniżanie się wartości wskaźnika od grupy 1 i 2 aż do grupy 6. Grupy 3, 5 i 6 prezentowały niższe wartości w porównaniu z grupą 1 i grupą 2.



TAS-R<sub>75</sub>/TBARS-R<sub>75</sub>: Kruskal-Wallis test, p < 0,0001.  
wartość p dla porównań wielokrotnych (dwustronnych):

grupa	1	2	3	4	5	6
1		1,0000	<b>0,0220</b>	0,4782	<b>0,0006</b>	<b>0,0000</b>
2	1,0000		<b>0,0231</b>	0,4951	<b>0,0006</b>	<b>0,0000</b>
3	<b>0,0220</b>	<b>0,0231</b>		1,0000	1,0000	0,1447
4	0,4782	0,4951	1,0000		0,9210	<b>0,0075</b>
5	<b>0,0006</b>	<b>0,0006</b>	1,0000	0,9210		1,0000
6	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	0,1447	<b>0,0075</b>	1,0000	

**Rycina 28.** Porównanie wskaźnika  $TAS-R_{75}/TBARS-R_{75}$  między wszystkimi badanymi grupami testem Kruskala-Wallisa z analizą *post hoc* testem Dunna (tabela).



## 4.3. Ocena korelacji i regresji wielokrotnej

### 4.3.1. Ocena wzajemnej korelacji parametrów stresu oksydacyjnego w badanych grupach 1–6

W tabeli 24. przedstawiono wzajemne korelacje parametrów stresu oksydacyjnego w badanych grupach od 1 do 6. W każdej z badanych grup obserwowano silne korelacje SOD-0' & xSOD-0' oraz SOD-120' & xSOD-120' ( $R > 0,9$ ;  $p < 0,0001$ ), które nie były rozpatrywane w kategorii związku przyczynowo-skutkowego. Zaobserwowany układ sugeruje równoległe zmiany aktywności SOD-1 i ekspresji genu.

#### *Dysmutaza ponadtlenkowa*

Dodatnią korelację zmiany aktywności SOD w 0. i 120. min testu doustnego obciążenia glukozą zaobserwowano w grupach: 1, 2, 3 i 4.

Ujemną korelację SOD-0' i TBARS-0' obliczono w grupie 2, natomiast ekspresja genu xSOD-0' korelowała ujemnie z indeksem TBARS- $R_{75}$  w grupie 5.

Dodatnią zależność indeksu zmiany SOD w trakcie OGTT (SOD- $R_{75}$ ) od SOD-120' znaleziono w grupie 1 oraz grupach: 4, 5 i 6. Podobną zależność zaprezentowała wartość ekspresji genu xSOD-120' w stosunku do indeksu xSOD- $R_{75}$  (w grupach: 3, 4, 5 i 6).

#### *Całkowity stan antyoksydacyjny osocza (TAS)*

Dodatnią korelację zmiany stężenia TAS w 0. i 120. min testu doustnego obciążenia glukozą zaobserwowano w grupach: 1, 2, 3, 5 i 6. Dodatnia zależność indeksu zmiany TAS w trakcie OGTT (TAS- $R_{75}$ ) od TAS-120' była cechą wszystkich badanych grup.

Równoległe zmiany TAS-0' i SOD-0' zaobserwowano w grupie 2 i 6. W grupie 1 indeks TAS- $R_{75}$  i SOD-120' korelowały ujemnie, podczas gdy w grupie 6 – dodatnio.

Odwrotna zależność TAS-0' i TBARS-0' charakteryzowała grupę 2 i 3. Natomiast korelacja TAS-0' i TBARS-120', dodatnia w grupie 2, przyjęła współczynnik R ujemny w grupie 6.

#### *Produkty peroksydacji lipidów (TBARS)*

Dodatnią korelację zmiany stężenia TBARS w 0. i 120. min testu doustnego obciążenia glukozą zaobserwowano w grupach: 3, 4, 5 i 6.

Odwrotną zależność TBARS-0' i SOD-120' znaleziono w grupie 1. Ujemna korelacja TBARS-120' i TAS-120' charakteryzowała grupę 3.

Ujemną zależność indeksu zmiany TBARS w trakcie OGTT (TBARS-R<sub>75</sub>) od TAS-120' znaleziono w grupie 2. Odwrotne zmiany indeksów TAS-R<sub>75</sub> i TBARS-R<sub>75</sub> zaobserwowano w grupach: 1, 3 i 5.

#### 4.3.2. Ocena związku parametrów stresu oksydacyjnego z czynnikami ryzyka chorób sercowo-naczyniowych w badanych grupach 1–6

Obliczono korelacje między parametrami stresu oksydacyjnego i pozostałymi parametrami w każdej badanej grupie, od 1 do 6, wyniki zamieszczono w tabeli 25. Następnie przeprowadzono analizę regresji wielokrotnej dla sprawdzenia, czy są zmienne korelujące z poszczególnymi markerami stresu oksydacyjnego, niezależnie od pozostałych i istotne statystycznie wyniki umieszczono w tabeli 26.

W grupie 2 glikemia w 120. minucie OGTT i HbA1c okazały się znaczącymi czynnikami odwrotnie korelującymi z aktywnością enzymu i ekspresją genu SOD-1. Zmiany stężenia G-120' i wartości HbA1c wyjaśniły w 66% zmienność aktywności SOD-0' w badanej grupie osób z nadwagą i prawidłową tolerancją glukozy. Pozostałe 34% zmienności SOD-0' mogło być spowodowane innymi czynnikami lub nieliniowymi zależnościami. Podobnie G-120' prezentowała odwrotną liniową zależność z xSOD-0', odpowiadając za 61% zmienności ekspresji genu SOD-1, natomiast wartość HbA1c, odwrotnie korelująca z SOD-120' i xSOD-120', odpowiadała za jedynie 37% zmienności aktywności enzymu i 35% zmienności ekspresji genu w 120. minucie OGTT.

U osób z grupy 4 stężenie insuliny w 120. minucie OGTT w sposób niezależny dodatnio korelowało ze stężeniem TBARS-120' i zmienność Ins-120' w 59% mogła tłumaczyć zmienność stężenia TBARS w 120. min testu.

W grupie 5 glikemia na czczo dodatnio korelowała z aktywnością SOD-0' i ekspresją xSOD-0', usprawiedliwiając 76% i 60% zmienności aktywności enzymu i ekspresji genu SOD-1. Liczba leukocytów prezentowała dodatnią liniową zależność z indeksem TAS-R<sub>75</sub> i stężeniem TBARS-0', odpowiadając za ich zmienność w 49% i 40%. Stężenie HDL-C dodatnio skorelowane z TBARS-0', mogło odpowiadać za jedynie 40% zmienności stężenia produktów peroksydacji lipidów na czczo.

W grupie 1 i 6 nie znaleziono zmiennych prezentujących niezależny od pozostałych predyktorów związek liniowy z badanymi parametrami stresu oksydacyjnego.

**Tabela 24.** Korelacje w zakresie parametrów stresu oksydacyjnego w badanych grupach 1–6. Podano wartość współczynnika R Spearmana i wartość (p) dla korelacji istotnych statystycznie; ns – nieistotne statystycznie

	Grupa 1	Grupa 2	Grupa 3	Grupa 4	Grupa 5	Grupa 6
SOD-0' & SOD-120'	0,51 (0,0110)	0,46 (0,0244)	0,72 (0,0001)	0,57 (0,0058)	ns	ns
SOD-0' & TBARS-0'	ns	-0,41 (0,0453)	ns	ns	ns	-0,49 (0,0216)
SOD-120' & SOD-R <sub>75</sub>	0,71 (0,0001)	ns	ns	0,73 (0,0001)	0,69 (0,0002)	0,82 (<0,0001)
xSOD-0' & TBARS-R <sub>75</sub>	ns	ns	ns	ns	-0,42 (0,0415)	ns
xSOD-120' & xSOD-R <sub>75</sub>	ns	ns	0,41 (0,0455)	0,75 (0,0001)	0,81 (<0,0001)	0,74 (0,0001)
TAS-0' & TAS 120'	0,73 (<0,0001)	0,49 (0,0156)	0,64 (0,0008)	ns	0,51 (0,0116)	0,62 (0,002)
TAS-0' & SOD-0'	ns	0,66 (0,0004)	ns	ns	ns	0,48 (0,0221)
TAS-0' & TBARS-0'	ns	-0,71 (0,0001)	-0,61 (0,0014)	ns	ns	ns
TAS-0' & TBARS-120'	ns	0,77 (<0,0001)	ns	ns	ns	-0,77 (0,0001)
TAS-120' & TAS-R <sub>75</sub>	0,55 (0,0049)	0,60 (0,0021)	0,56 (0,0044)	0,71 (0,0002)	0,60 (0,0019)	0,71 (0,0002)
TAS-R <sub>75</sub> & SOD-120'	-0,60 (0,0020)	ns	ns	ns	ns	0,46 (0,0307)
TBARS-0' & SOD-120'	-0,44 (0,0322)	ns	ns	ns	ns	ns
TBARS-0' & TBARS-120'	ns	ns	0,85 (<0,0001)	0,87 (<0,0001)	0,80 (<0,0001)	0,93 (<0,0001)
TBARS-120' & TAS-120'	ns	ns	-0,65 (0,0006)	ns	ns	ns
TBARS-R <sub>75</sub> & TAS-120'	ns	-0,45 (0,0289)	ns	ns	ns	ns
TBARS-R <sub>75</sub> & TAS-R <sub>75</sub>	-0,57 (0,0035)	ns	-0,51 (0,0078)	ns	-0,43 (0,0337)	ns

**Tabela 25.** Korelacje liniowe parametrów stresu oksydacyjnego i czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych w badanych grupach – podano wartość współczynnika R Spearmana, gdy  $p < 0,05$ .

	Grupa 1	Grupa 2	Grupa 3	Grupa 4	Grupa 5	Grupa 6
SOD-0'	-	G-120'; -0,71	-	-	G-0'; 0,79	-
		HbA <sub>1c</sub> ; -0,50			ISI <sub>0,120'</sub> ; -0,41	
		SBP; -0,44			ISI <sub>fastaudd</sub> ; -0,42	
					HOMA; 0,53	
					WBC; 0,54	
SOD-120'	-	HbA <sub>1c</sub> ; -0,54	-	-	-	-
		G-120'; -0,48				
SOD-R <sub>75</sub>	-	-	G-0'; 0,46	G-120'; 0,43	G-0'; -0,44	-
			ISI <sub>0,120'</sub> ; 0,42			
			TALIA; 0,40			
xSOD-0'	-	G-120'; -0,65	-	-	G-0'; 0,63	-
		HbA <sub>1c</sub> ; -0,54			WBC; 0,51	
		Ins-0'; 0,47				
xSOD-120'	-	G-120'; -0,44	-	G-120'; 0,45	-	CRP; 0,42
		HbA <sub>1c</sub> ; -0,52		SBP; 0,46		
				DBP; 0,43		
xSOD-R <sub>75</sub>	-	-	-	G-120'; 0,45	-	-
TAS-0'	T-C; -0,49	-	G-120'; 0,48	ISI <sub>fastaudd</sub> '; 0,44	-	-
	LDL-C; -0,51					
TAS-120'	SBP; -0,43	-	-	-	DBP; 0,45	-
	DBP; -0,47					
TAS-R <sub>75</sub>	-	TAG; -0,42	-	LDL-C; -0,47	DBP; 0,48	HDL-C; -0,43
					CRP; 0,42	
					WBC; 0,52	
TBARS-0'	-	SBP; 0,45	-	G-0'; 0,56	HDL-C; 0,53	-

cd. tabeli 25.

	Grupa 1	Grupa 2	Grupa 3	Grupa 4	Grupa 5	Grupa 6
		T-C; 0,41		HbA <sub>1c</sub> ; 0,52	WBC; 0,48	
				Ins-120'; 0,48		
				ISI <sub>0,120'</sub> ; -0,56		
				ISI <sub>hfastuda'</sub> ; -0,43		
TBARS-120'	-	SBP; 0,58 T-C; 0,46	-	G-0'; 0,45	HDL-C; 0,45	-
				HbA <sub>1c</sub> ; 0,50		
				Ins-120'; 0,43		
				HDL-C; -0,45		
				CRP; 0,45		
				WBC; 0,56		
TBARS-R <sub>75</sub>	-	SBP; 0,41 DBP; 0,41	-	HDL-C; -0,54	wiek; 0,52	G-120'; 0,44 HbA <sub>1c</sub> ; 0,46
TAS-0'/ TBARS-0'	-	SBP; -0,50 T-C; -0,43	-	HbA1c; -0,47	WBC; -0,64	-
				G-0'; -0,62		
				Ins-120'; -0,56		
				ISI <sub>0,120'</sub> ; 0,61		
				ISI <sub>hfastuda'</sub> ; 0,53		
				hsCRP; -0,45		
TAS-R <sub>75</sub> / TBARS-R <sub>75</sub>	-	TAG; -0,48	-	LDL-C; -0,44	-	-

**Tabela 26.** Wyniki analizy regresji wielokrotnej w zakresie korelacji parametrów stresu oksydacyjnego z czynnikami ryzyka chorób sercowo-naczyniowych w badanych grupach, przedstawione, gdy  $p < 0,05$ . Wytłuszczono zmienną korelującą z parametrem stresu oksydacyjnego, niezależnie od pozostałych czynników – wartość  $\beta$  i  $R^2$  podano w nawiasie ( $\beta$ ;  $R^2$ )

	Grupa 2	Grupa 3	Grupa 4	Grupa 5
SOD-0'	<b>G-120'</b> (-0,41; 0,66)	--	--	<b>G-0'</b> (0,62; 0,76)
	<b>HbA<sub>1c</sub></b> (-0,37; 0,66)			ISI <sub>0,120</sub> --
	SBP --			ISI <sub>Matsuda</sub> --
				HOMA --
				WBC --
SOD-120'	<b>HbA<sub>1c</sub></b> (-0,53; 0,37)	--	--	--
	G-120' --			
xSOD-0'	<b>G-120'</b> (-0,51; 0,61)	--	--	<b>G-0'</b> (0,56; 0,60)
	HbA <sub>1c</sub> --			<b>WBC</b> (0,36; 0,60)
	Ins-0' --			
xSOD-120'	G-120' --	--	--	--
	<b>HbA<sub>1c</sub></b> (-0,55; 0,35)			
TAS-R	--	--	--	DBP --
				CRP --
				<b>WBC</b> (0,44; 0,49)
TBARS-0'	--	--		<b>HDL-C</b> (0,40; 0,40)
	--			<b>WBC</b> (0,40; 0,40)
TBARS-120'	<b>SBP</b> (0,42; 0,26)	--	G-0' --	--
	T-C --		HbA <sub>1c</sub> --	
			<b>Ins-120'</b> (0,45; 0,59)	
			HDL-C --	
			CRP --	
			WBC --	

#### 4.3.3. Ocena związku parametrów stresu oksydacyjnego z czynnikami ryzyka chorób sercowo-naczyniowych w całej badanej populacji

W całej badanej populacji, tj. łącznie w grupach 1, 2, 3, 4, 5 i 6, przeprowadzono ocenę korelacji między markerami stresu oksydacyjnego i czynnikami ryzyka ChSN (Tabela 27) oraz analizę regresji wielokrotnej (Tabela 28).

Uwagę zwróciły:

- a) korelacje glikemii w 0. minucie OGTT (**G-0'**), glikemii w 120. minucie OGTT (**G-120'**) i **HbA<sub>1c</sub>**:
  - ujemne z SOD-120', SOD-R<sub>75</sub>, xSOD-120', xSOD-R<sub>75</sub>, TAS-120', TAS-R<sub>75</sub> oraz indeksami TAS-0'/TBARS-0' i TAS-R<sub>75</sub>/TBARS-R<sub>75</sub>,
  - dodatnie z TBARS-0', TBARS-120' i TBARS-R<sub>75</sub>,

**Tabela 27.** Korelacje parametrów stresu oksydacyjnego z czynnikami ryzyka chorób sercowo-naczyniowych w całej badanej populacji (grupy 1+2+3+4+5+6; n = 140). Przedstawiono wyniki istotne statystycznie, gdy  $p < 0,05$ .

	talia	SBP	DBP	BMI	HbA1c	G 0'	G 120'	Ins 0'	Ins 120'	HOMA-IR
SOD-0'	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,24	0,29	0,20
SOD-120'	-0,22	ns	ns	-0,24	-0,44	-0,34	-0,36	ns	ns	ns
SOD-R <sub>75</sub>	-0,33	ns	ns	-0,43	-0,46	-0,44	-0,45	-0,31	-0,41	-0,37
xSOD-0'	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,27	0,29	0,21
xSOD-120'	-0,20	ns	ns	-0,22	-0,47	-0,34	-0,37	ns	ns	ns
xSOD-R <sub>75</sub>	-0,31	ns	ns	-0,41	-0,42	-0,42	-0,41	-0,31	-0,41	-0,36
TAS-0'	ns	ns	ns	0,18	ns	ns	ns	0,23	0,24	0,21
TAS-120'	ns	ns	ns	ns	-0,33	-0,23	-0,35	ns	ns	ns
TAS-R <sub>75</sub>	-0,31	ns	ns	-0,36	-0,50	-0,43	-0,55	-0,38	-0,41	-0,42
TBARS-0'	0,52	0,45	0,30	0,60	0,68	0,64	0,70	0,43	0,63	0,52
TBARS-120'	0,55	0,43	0,29	0,62	0,72	0,65	0,72	0,44	0,62	0,53
TBARS-R <sub>75</sub>	0,22	ns	ns	0,22	0,33	0,22	0,26	0,19	0,18	0,22
TAS-0'/ TBARS-0'	-0,46	-0,42	-0,29	-0,53	-0,63	-0,58	-0,65	-0,33	-0,53	-0,43
TAS-R <sub>75</sub> / TBARS-R <sub>75</sub>	-0,33	ns	ns	-0,36	-0,51	-0,41	-0,50	-0,34	-0,36	-0,39

	ISI <sub>0,120</sub>	ISI <sub>M</sub>	T-C	TAG	HDL-C	LDL-C	nie HDL-C	hsCRP	WBC
SOD-0'	ns	-0,20	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
SOD-120'	0,32	0,21	-0,20	-0,24	0,23	ns	-0,23	-0,19	ns
SOD-R <sub>75</sub>	0,50	0,47	-0,18	-0,36	0,29	ns	-0,24	-0,26	-0,24
xSOD-0'	ns	-0,18	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
xSOD-120'	0,33	0,21	ns	-0,25	0,20	ns	-0,19	-0,20	ns
xSOD-R <sub>75</sub>	0,48	0,46	ns	-0,33	0,25	ns	-0,18	-0,26	-0,24
TAS-0'	ns	ns	ns	0,18	ns	ns	ns	ns	ns
TAS-120'	0,34	0,25	ns	-0,21	0,18	ns	-0,18	-0,17	ns
TAS-R <sub>75</sub>	0,56	0,51	-0,33	-0,48	0,31	-0,28	-0,38	-0,20	ns
TBARS-0'	-0,74	-0,70	0,41	0,51	-0,37	0,35	0,46	0,51	0,39
TBARS-120'	-0,76	-0,71	0,44	0,54	-0,41	0,39	0,50	0,50	0,37
TBARS-R <sub>75</sub>	-0,27	-0,24	0,30	0,32	-0,30	0,30	0,35	ns	ns
TAS-0'/ TBARS-0'	0,68	0,62	-0,38	-0,43	0,33	-0,33	-0,42	-0,51	-0,38
TAS-R <sub>75</sub> / TBARS-R <sub>75</sub>	0,51	0,46	-0,37	-0,48	0,35	-0,33	-0,43	-0,20	ns

- b) korelacje insulinemii w 0. min (**Ins-0'**) i 120. min OGTT (**Ins-120'**):
- dodatnie z SOD-0', xSOD-0', TAS-0',
  - ujemne z SOD-R<sub>75</sub>', xSOD-R<sub>75</sub>', TAS-R<sub>75</sub>' oraz indeksami TAS-0'/TBARS-0' i TAS-R<sub>75</sub>'/TBARS-R<sub>75</sub>',
  - dodatnie z TBARS-0', TBARS-120' i TBARS-R<sub>75</sub>'.

Analiza regresji wielokrotnej wykazała, że glikemia na czczo i glikemia w 120. min OGTT są znaczącymi czynnikami korelującymi dodatnio (G-0') i ujemnie (G-120') z TAS-120', a liniowa zmiana glikemii wyjaśniła zmienność stężenia TAS-120' w 27%. Pozostałe 72% zmienności TAS-120' mogło być spowodowane innymi czynnikami lub nieliniowymi zależnościami.

**Tabela 28.** Wyniki analizy regresji wielokrotnej w zakresie korelacji parametrów stresu oksydacyjnego z czynnikami ryzyka chorób sercowo-naczyniowych w całej badanej populacji (grupy 1+2+3+4+5+6, n = 140), przedstawione, gdy  $p < 0,05$ . Wytluszczone zmienną korelującą z parametrem stresu oksydacyjnego, niezależnie od pozostałych czynników – wartość  $\beta$  i  $R^2$  podano w nawiasie ( $\beta$ ;  $R^2$ )

SOD-0'	SOD-120'	SOD-R <sub>75</sub>
Ins-0' --	Talia --	Talia --
<b>Ins-120' (0,29; 0,12)</b>	BMI --	BMI --
	<b>HbA1c (-0,51; 0,12)</b>	HbA1c --
	G-0' --	G-0' --
	G-120' --	G-120' --
	T-C --	Ins-0' --
	TAG --	Ins-120' --
	HDL-C--	T-C --
	hsCRP --	TAG --
		HDL-C --
		hsCRP --
		WBC --

xSOD-0'	xSOD-120'	xSOD-R <sub>75</sub>
Ins-0' --	Talia --	Talia --
Ins-120' --	BMI --	BMI --
	HbA1c --	HbA1c --
	G-0' --	G-0' --
	G-120' --	G-120' --
	TAG --	Ins-0' --
	HDL-C--	Ins-120' --
	hsCRP --	TAG --
		HDL-C--
		hsCRP --
		WBC --



cd. tabeli 28.

TAS-0'	TAS-120'	TAS-R <sub>75</sub>
BMI --	HbA1c --	Talia --
Ins-0' --	<b>G-0'</b> (0,30; 0,27)	BMI --
Ins-120' --	<b>G-120'</b> (-0,63; 0,27)	HbA1c --
TAG --	TAG --	G-0' --
	HDL-C --	G-120' --
	hsCRP --	Ins-0' --
		Ins-120' --
		T-C --
		TAG --
		HDL-C --
		hsCRP --

TBARS-0'	TBARS-120'	TBARS-R <sub>75</sub>
Talia --	Talia --	Talia --
SBP	SBP	HbA1c --
DBP	DBP	G-0' --
HbA1c --	<b>HbA1c</b> (0,29; 0,56)	G-120' --
G-0' --	G-0' --	Ins-0' --
G-120' --	G-120' --	Ins-120' --
Ins-0' --	Ins-0' --	T-C --
<b>Ins-120'</b> (0,19; 0,53)	<b>Ins-120'</b> (0,14; 0,56)	TAG --
T-C --	T-C --	HDL-C --
TAG --	TAG --	
HDL-C --	HDL-C --	
hsCRP --	hsCRP --	
<b>WBC</b> (0,14; 0,53)	<b>WBC</b> (0,14; 0,56)	

TAS-0' / TBARS-0'	TAS-R <sub>75</sub> / TBARS-R <sub>75</sub>	
Talia --	Talia --	
SBP --	BMI --	
DBP --	HbA1c --	
HbA1c --	G-0' --	
G-0' --	G-120' --	
G-120' --	Ins-0' --	
Ins-0' --	Ins-120' --	
Ins-120' --	T-C --	
T-C --	TAG --	
TAG --	HDL-C --	
HDL-C --	hsCRP --	
hsCRP --		
WBC --		

Ins-120' prezentowała dodatnią liniową zależność z SOD-0' – odpowiadając za 12% zmienności aktywności enzymu, z TBARS-0' i TBARS-120' – odpowiadając za 53% i 56% zmienności stężenia TBARS na czczo i w 120. min testu.

HbA1c w sposób niezależny korelowała ujemnie z SOD-120' i dodatnio z TBARS-120', a zmienność HbA1c mogła tłumaczyć zmienność aktywności SOD-120' w 12% i stężenia TBARS-120' w 56%.

Liczba WBC, dodatkowo korelująca ze stężeniem TBARS w 0. i 120. min OGTT, może wiązać się za zmiennością TBARS-0' w 53% i TBARS-120' w 56%.

## 4.4. Analiza krzywych ROC

Przy użyciu programu MedCalc wykreślono krzywe ROC, obliczono pole pod krzywą (AUC – ang. *area under curve*) oraz czułość i swoistość diagnostyczną, z jaką każdy oceniany w tej pracy parametr stresu oksydacyjnego i wskaźnik insulinowrażliwości–insulinooporności, przy wyznaczonej wartości odcięcia, może różnicować dwie badane grupy. Analiza ma na celu rozpoznanie parametrów charakteryzujących się zarówno najwyższą czułością jak i swoistością wraz z polem pod krzywą (AUC) najbliższym wartości 1, oznaczającej pełną, 100% zdolność dyskryminacyjną badania. AUC przyjmujące połowę pola całkowitego (wartość 0,5) odpowiada równym (50%) szansom rozpoznania i wykluczenia patologii i oznacza brak mocy dyskryminacyjnej parametru.

Wyniki oceny krzywych ROC dla porównań między dwiema kolejnymi badanymi grupami, tj. 1 vs 2, 2 vs 3, 3 vs 4, 4 vs 5, 5 vs 6, przedstawiono w tabeli 29. Przeprowadzono analizę, łącząc grupy wg znaczenia klinicznego, tj. porównując osoby normoglikemiczne z nadmierną masą ciała (nadwaga/otyłość) vs osoby ze stanem przedcukrzycowym (Tabela 30), osoby ze stanem przedcukrzycowym vs osoby z cukrzycą rozpoznaną w trakcie OGTT (Tabela 31) oraz osoby z prawidłową tolerancją glukozy (niezależnie od wartości BMI) vs osoby z dysglikemią (Tabela 32).

Wskaźniki insulinowrażliwości–insulinooporności w istotny sposób rozróżniały kolejne grupy badane, prezentujące narastające ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2. Spośród nich wskaźnik  $ISI_{0,120}$  (wskaźnik Gutt) przedstawiał największe wartości AUC we wszystkich przeprowadzonych analizach, za wyjątkiem porównania grupy 1 z grupą 2, gdzie dla  $ISI_{Matsuda}$  obliczono 0,962, a dla  $ISI_{0,120}$  0,956.

Niewielkie znaczenie dyskryminacyjne uzyskano dla ocenianych parametrów przy różnicowaniu grupy 3 i grupy 4.

Markery obrony antyoksydacyjnej przyjęły najlepszą charakterystykę przy różnicowaniu stanu przedcukrzycowego z cukrzycą, zwłaszcza przy porównaniu grupy 5 i grupy 6 – przewyższając znaczeniem wskaźniki insulinowrażliwości (Tabela 31).

**Tabela 29.** Podsumowanie wyników analizy krzywych ROC dla wskaźników insulinowrażliwości i parametrów stresu oksydacyjnego. Porównanie pomiędzy kolejnymi badanymi grupami 1-6. Dane przedstawiono wg schematu: wartość odcięcia (czułość % / swoistość %) AUC; AUC – pole pod krzywą

Grupa badana	1 / 2	2 / 3	3 / 4	4 / 5	5 / 6
parametr					
HOMA-IR	> 1,92 (75,0 / 95,8) 0,936	> 2,27 (79,2 / 45,8) 0,611	> 3,11 (77,3 / 70,8) 0,727	> 4,46 (45,8 / 81,8) 0,608	≤ 2,75 (18,2 / 95,8) 0,519
ISI <sub>Matsuda</sub>	≤ 8,6 (90,9 / 90,5) 0,962	≤ 4,4 (57,1 / 86,4) 0,742	≤ 4,8 (76,2 / 42,9) 0,570	≤ 2,9 (80,9 / 80,9) 0,867	> 2,9 (47,6 / 80,9) 0,567
ISI <sub>0,120</sub>	≤ 46,3 (90,9 / 90,5) 0,956	≤ 34,6 (76,2 / 95,5) 0,901	≤ 26,2 (38,1 / 95,2) 0,681	≤ 24,1 (85,7 / 90,48) 0,926	≤ 18,8 (57,1 / 90,5) 0,812
SOD-0'	> 1351 (63,6 / 76,2) 0,715	> 1468 (47,6 / 77,3) 0,531	≤ 1347 (61,9 / 61,9) 0,556	> 1347 (90,5 / 61,9) 0,771	≤ 1380 (85,7 / 90,5) 0,928
SOD-R <sub>75</sub>	≤ 1,25 (77,3 / 42,9) 0,551	≤ 1,11 (66,7 / 77,3) 0,745	≤ 0,83 (42,9 / 80,9) 0,579	≤ 1,11 (90,5 / 33,3) 0,537	≤ 0,84 (47,6 / 80,9) 0,553
xSOD-0'	> 10,7 (40,9 / 100) 0,718	≤ 9,09 (33,3 / 81,8) 0,501	≤ 9,84 (52,4 / 66,7) 0,560	> 10,0 (95,2 / 57,1) 0,789	≤ 9,78 (95,2 / 95,2) 0,975
xSOD-R <sub>75</sub>	≤ 1,04 (31,8 / 80,9) 0,524	≤ 0,97 (33,3 / 100) 0,719	≤ 0,86 (38,1 / 90,5) 0,600	≤ 1,06 (80,9 / 42,9) 0,551	≤ 0,83 (33,3 / 76,2) 0,492
TAS-0'	> 1,39 (54,5 / 85,7) 0,686	> 1,49 (74,6 / 81,8) 0,626	> 1,39 (80,9 / 52,4) 0,651	≤ 1,38 (33,3 / 85,7) 0,566	≤ 1,30 (85,7 / 90,5) 0,926
TAS-R <sub>75</sub>	≤ 0,98 (40,9 / 90,5) 0,587	≤ 1,04 (90,5 / 45,5) 0,705	> 0,98 (52,4 / 71,4) 0,603	≤ 0,93 (76,2 / 76,2) 0,745	≤ 0,87 (66,7 / 52,4) 0,568
TBARS-0'	> 4,9 (22,7 / 95,2) 0,530	> 3,62 (100 / 72,7) 0,906	> 6,15 (66,7 / 71,4) 0,635	> 8,18 (33,3 / 90,5) 0,611	> 9,11 (33,3 / 80,9) 0,532
TBARS-R <sub>75</sub>	≤ 0,92 (40,9 / 85,7) 0,519	> 0,92 (100 / 40,9) 0,697	≤ 1,02 (42,9 / 76,2) 0,602	> 1,08 (52,4 / 66,7) 0,582	> 1,05 (80,9 / 47,6) 0,637
TAS-0' / TBARS-0'	> 0,38 (70,8 / 50,0) 0,510	≤ 0,39 (95,8 / 70,8) 0,799	≤ 0,25 (63,6 / 58,3) 0,589	≤ 0,23 (66,7 / 63,6) 0,631	≤ 0,16 (54,5 / 79,2) 0,695
TAS-R <sub>75</sub> / TBARS-R <sub>75</sub>	> 1,12 (41,7 / 83,8) 0,531	≤ 1,01 (87,5 / 62,5) 0,766	> 0,93 (50,0 / 75,0) 0,592	≤ 0,80 (50,0 / 81,8) 0,664	≤ 0,80 (86,4 / 50,0) 0,651

**Tabela 30.** Podsumowanie wyników analizy krzywych ROC dla wskaźników insulinow-  
rażliwości i parametrów stresu oksydacyjnego. Porównanie osób wg kategorii: nadwaga/  
otyłość z normoglikemią – stan przedcukrzycowy. Dane przedstawiono wg schematu:  
wartość odcięcia (czułość % / swoistość %) AUC; AUC – pole pod krzywą

Grupa badana	2+3 / 4	2+3 / 5	3 / 4	3 / 5
parametr				
HOMA-IR	> 3,11 (77,3 / 66,7) 0,769	> 2,7 (95,8 / 52,1) 0,825	> 3,11 (77,3 / 70,8) 0,727	> 2,98 (83,3 / 66,7) 0,797
ISI <sub>Matsuda</sub>	≤ 4,48 (77,3 / 66,7) 0,7773	≤ 3,35 (100 / 87,5) 0,971	≤ 4,8 (76,2 / 42,9) 0,570	≤ 3,14 (95,8 / 79,2) 0,943
ISI <sub>0,120</sub>	≤ 33,7 (100 / 66,7) 0,850	≤ 26,7 (100 / 95,8) 0,997	≤ 26,2 (38,1 / 95,2) 0,681	≤ 24,1 (91,7 / 100) 0,995
SOD-0'	≤ 1361 (63,6 / 60,4) 0,564	> 1391 (91,7 / 47,9) 0,738	≤ 1347 (61,9 / 61,9) 0,556	> 1391 (91,7 / 45,8) 0,692
SOD-R <sub>75</sub>	≤ 0,83 (40,9 / 93,8) 0,650	≤ 0,99 (70,8 / 77,1) 0,737	≤ 0,83 (42,9 / 80,9) 0,579	≤ 10,2 (91,7 / 45,8) 0,700
xSOD-0'	≤ 10,0 (59,1 / 60,4) 0,556	> 10,2 (91,7 / 45,8) 0,711	≤ 9,84 (52,4 / 66,7) 0,560	> 0,99 (70,8 / 58,3) 0,621
xSOD-R <sub>75</sub>	≤ 0,97 (50,0 / 83,3) 0,675	≤ 0,99 (70,8 / 77,1) 0,744	≤ 0,86 (38,1 / 90,5) 0,600	≤ 0,93 (54,2 / 75,0) 0,647
TAS-0'	> 1,40 (81,8 / 54,2) 0,716	> 1,56 (41,7 / 87,5) 0,664	> 1,39 (80,9 / 52,4) 0,651	> 1,39 (70,8 / 50,0) 0,599
TAS-R <sub>75</sub>	≤ 0,95 (40,9 / 72,9) 0,523	≤ 0,95 (79,2 / 72,9) 0,781	> 0,98 (52,4 / 71,4) 0,603	≤ 0,95 (79,2 / 66,7) 0,710
TBARS-0'	> 6,15 (63,6 / 87,5) 0,786	> 6,03 (83,3 / 85,4) 0,876	> 6,15 (66,7 / 71,4) 0,635	> 6,03 (83,3 / 70,8) 0,785
TBARS-R <sub>75</sub>	> 0,93 (90,9 / 27,1) 0,529	> 0,93 (95,8 / 27,1) 0,585	≤ 1,02 (42,9 / 76,2) 0,602	≤ 1,07 (54,2 / 62,5) 0,538
TAS-0' / TBARS-0'	≤ 0,34 (95,5 / 43,7) 0,703	≤ 0,24 (75,0 / 72,9) 0,795	≤ 0,25 (63,6 / 58,3) 0,589	< 0,24 (75,0 / 66,7) 0,713
TAS-R <sub>75</sub> / TBARS-R <sub>75</sub>	≤ 1,04 (86,4 / 35,4) 0,557	≤ 0,84 (66,7 / 66,7) 0,709	> 0,93 (50,0 / 75,0) 0,592	≤ 0,74 (37,5 / 83,3) 0,590

**Tabela 31.** Podsumowanie wyników analizy krzywych ROC dla wskaźników insulinow-  
rażliwości i parametrów stresu oksydacyjnego. Porównanie osób wg kategorii stan przed-  
cukrzycowy – cukrzyca. Dane przedstawiono wg schematu: wartość odcięcia (czułość %  
/ swoistość %) AUC; AUC – pole pod krzywą.

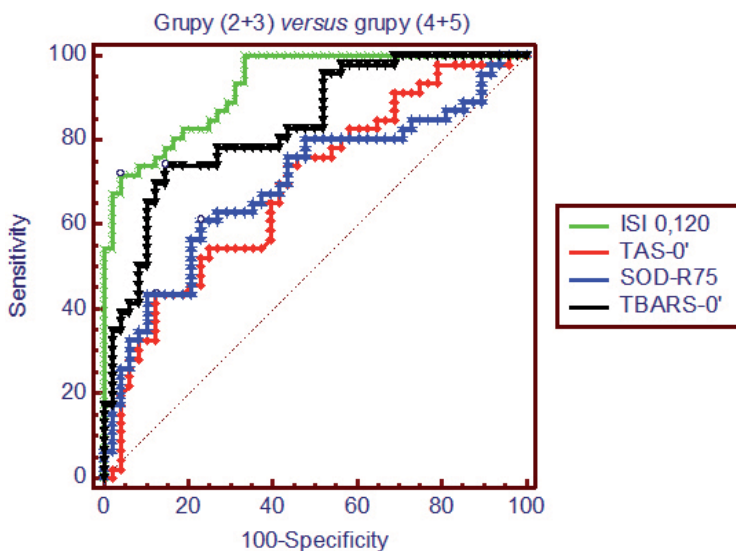
Grupa badana	4+5 / 6	4 / 6	5 / 6
parametr			
HOMA-IR	> 4,67 (45,5 / 71,1) 0,532	> 4,46 (45,5 / 81,8) 0,587	≤ 2,75 (18,2 / 95,8) 0,519
ISI <sub>Matsuda</sub>	≤ 2,4 (52,4 / 73,8) 0,608	≤ 2,43 (59,1 / 95,5) 0,818	> 2,9 (47,6 / 80,9) 0,567
ISI <sub>0,120</sub>	≤ 21,9 (80,9 / 80,9) 0,899	≤ 22,6 (95,5 / 100) 0,994	≤ 18,8 (57,1 / 90,5) 0,812
SOD-0'	≤ 1211 (61,9 / 88,1) 0,804	≤ 1211 (59,1 / 81,8) 0,682	≤ 1380 (85,7 / 90,5) 0,928
SOD-R <sub>75</sub>	≤ 0,79 (42,9 / 76,2) 0,572	≤ 0,96 (72,7 / 59,1) 0,624	≤ 0,84 (47,6 / 80,9) 0,553
xSOD-0'	≤ 9,78 (95,2 / 73,8) 0,902	≤ 6,85 (72,7 / 81,8) 0,820	≤ 9,78 (95,2 / 95,2) 0,975
xSOD-R <sub>75</sub>	≤ 1,07 (80,9 / 30,9) 0,526	≤ 2,76 (95,5 / 36,4) 0,586	≤ 0,83 (33,3 / 76,2) 0,492
TAS-0'	≤ 1,37 (100 / 78,6) 0,951	≤ 1,37 (100 / 86,4) 0,977	≤ 1,30 (85,7 / 90,5) 0,926
TAS-R <sub>75</sub>	≤ 0,92 (80,9 / 59,5) 0,693	≤ 0,92 (81,8 / 77,3) 0,808	≤ 0,87 (66,7 / 52,4) 0,568
TBARS-0'	> 9,08 (28,1 / 83,3) 0,586	> 8,18 (40,9 / 90,9) 0,641	> 9,11 (33,3 / 80,9) 0,532
TBARS-R <sub>75</sub>	> 1,05 (80,9 / 50,0) 0,645	> 1,07 (77,3 / 59,1) 0,710	> 1,05 (80,9 / 47,6) 0,637
TAS-0'/ TBARS-0'	≤ 0,16 (54,5 / 87,0) 0,743	≤ 0,16 (54,5 / 95,5) 0,795	≤ 0,16 (54,5 / 79,2) 0,695
TAS-R <sub>75</sub> / TBARS-R <sub>75</sub>	≤ 0,80 (86,4 / 65,2) 0,743	≤ 0,80 (86,4 / 81,8) 0,844	≤ 0,80 (86,4 / 50,0) 0,651

**Tabela 32.** Podsumowanie wyników analizy krzywych ROC dla wskaźników insulinowrażliwości i parametrów stresu oksydacyjnego. Porównanie osób wg kategorii normoglikemia – dysglikemia. Dane przedstawiono wg schematu: wartość odcięcia (czułość % / swoistość %) AUC; AUC – pole pod krzywą

Populacja badana parametr	1+2+3 / 4+5+6	1+2+3 / 4+5	2+3 / 4+5
HOMA-IR	2,7 (92,6 / 68,1) 0,868	> 2,7 (93,5 / 68,1) 0,865	> 2,7 (93,5 / 52,1) 0,798
ISI <sub>Matsuda</sub>	≤ 4,8 (92,1 / 73,4) 0,896	≤ 5,1 (92,9 / 68,6) 0,882	≤ 4,8 (88,1 / 60,5) 0,824
ISI <sub>0,120</sub>	≤ 28,1 (82,5 / 95,3) 0,958	≤ 33,7 (95,2 / 78,1) 0,937	≤ 28,1 (73,8 / 93,0) 0,927
SOD-0'	> 1425 (41,3 / 70,3) 0,528	> 1425 (57,1 / 70,3) 0,640	> 1425 (57,1 / 60,5) 0,584
SOD-R <sub>75</sub>	≤ 0,99 (66,7 / 84,4) 0,762	≤ 0,97 (59,5 / 87,5) 0,744	≤ 1,01 (64,3 / 76,7) 0,696
xSOD-0'	> 11,9 (15,9 / 93,7) 0,516	> 10,2 (69,1 / 59,4) 0,657	> 9,16 (88,1 / 30,2) 0,578
xSOD-R <sub>75</sub>	≤ 1,01 (65,1 / 81,3) 0,774	≤ 0,99 (61,9 / 84,4) 0,762	≤ 1,01 (64,3 / 76,7) 0,731
TAS-0'	> 1,52 (33,3 / 84,4) 0,568	> 1,40 (73,8 / 65,6) 0,741	> 1,40 (73,8 / 53,5) 0,688
TAS-R <sub>75</sub>	≤ 0,95 (69,8 / 76,6) 0,747	≤ 0,95 (59,5 / 76,6) 0,682	≤ 0,95 (59,5 / 65,1) 0,628
TBARS-0'	> 6,03 (73,0 / 87,5) 0,878	≤ 6,03 (73,8 / 87,5) 0,871	> 6,03 (73,8 / 83,7) 0,833
TBARS-R <sub>75</sub>	> 1,15 (34,9 / 87,5) 0,635	≤ 1,15 (30,9 / 87,5) 0,585	> 0,93 (92,9 / 25,6) 0,555
TAS-0' / TBARS-0'	≤ 0,25 (73,5 / 80,6) 0,846	≤ 0,35 (97,5 / 51,4) 0,810	≤ 0,35 (97,8 / 43,7) 0,751
TAS-R <sub>75</sub> / TBARS-R <sub>75</sub>	≤ 0,84 (64,7 / 75,0) 0,750	≤ 0,84 (54,3 / 75,0) 0,684	≤ 1,04 (89,1 / 35,4) 0,636

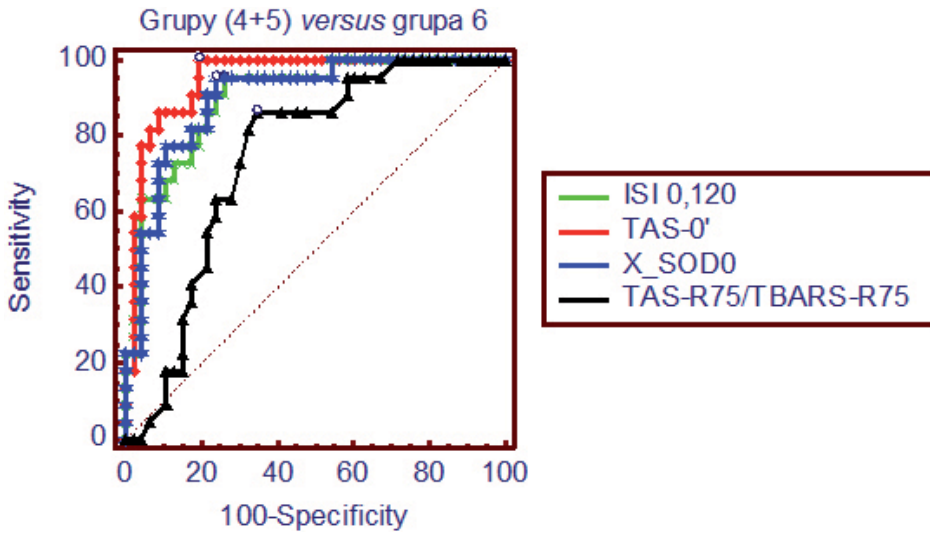
Produkty peroksydacji lipidów (TBARS-0') okazały się istotne przy porównaniu grupy 2 z grupą 3, prezentując największe pole pod krzywą spośród badanych parametrów (Tabela 29).

Porównanie krzywych ROC dla parametrów prezentujących najwyższe AUC w kategoriach: insulinowrażliwość–insulinooporność, TAS, TBARS i SOD, w różnicowaniu wybranych sytuacji klinicznych, przedstawiono na rycinach 29–32.



ISI_0_120 ~ TAS_0'	
Difference between areas / Significance level	0,239 / P = 0,0001
ISI_0_120 ~ SOD_R75	
Difference between areas / Significance level	0,231 / P < 0,0001
ISI_0_120 ~ TBARS_0'	
Difference between areas / Significance level	0,0942 / P = 0,0155
TAS_0' ~ SOD_R75	
Difference between areas / Significance level	0,00747 / P = 0,9244
TAS_0' ~ TBARS_0'	
Difference between areas / Significance level	0,145 / P = 0,0548
SOD_R75 ~ TBARS_0'	
Difference between areas / Significance level	0,137 / P = 0,0315

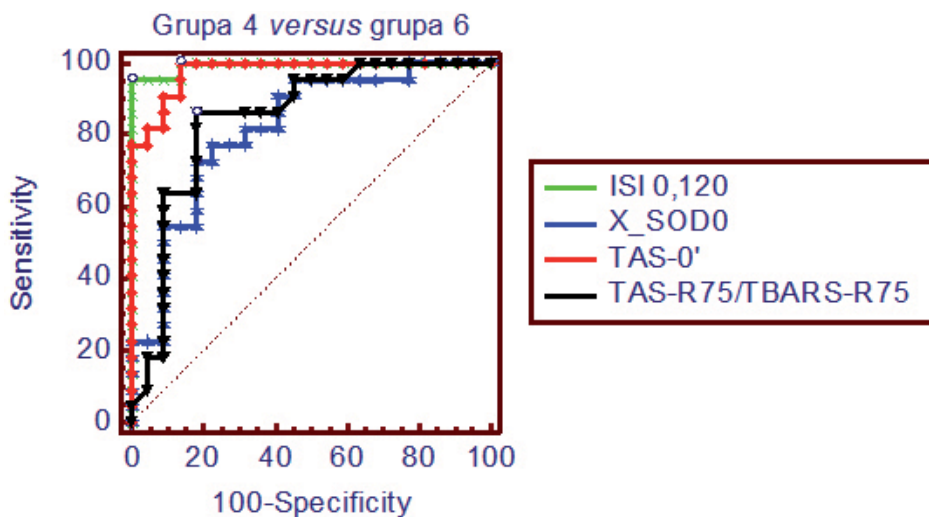
**Rycina 29.** Porównanie krzywych ROC w różnicowaniu grup (2+3) i grup (4+5). Analiza dotyczy parametrów prezentujących najwyższe AUC w każdej z czterech kategorii: insulinowrażliwość–insulinooporność, dysmutaza nadadtlenkowa (SOD), całkowity stan antyoksydacyjny osocza (TAS), produkty peroksydacji lipidów w osoczu (TBARS); szczegółowe dane dla wszystkich ocenianych parametrów zamieszczono w tabeli 32.



ISI_0_120 ~ TAS_0'	
Difference between areas / Significance level	0,0514 / P = 0,2023
ISI_0_120 ~ X_SOD0	
Difference between areas / Significance level	0,00296 / P = 0,9563
ISI_0_120 ~ TAS_R75_TBARS_R75	
Difference between areas / Significance level	0,156 / P = 0,0323
TAS_0' ~ X_SOD0	
Difference between areas / Significance level	0,0484 / P = 0,2673
TAS_0' ~ TAS_R75_TBARS_R75	
Difference between areas / Significance level	0,208 / P = 0,0025
X_SOD0 ~ TAS_R75_TBARS_R75	
Difference between areas / Significance level	0,159 / P = 0,0326

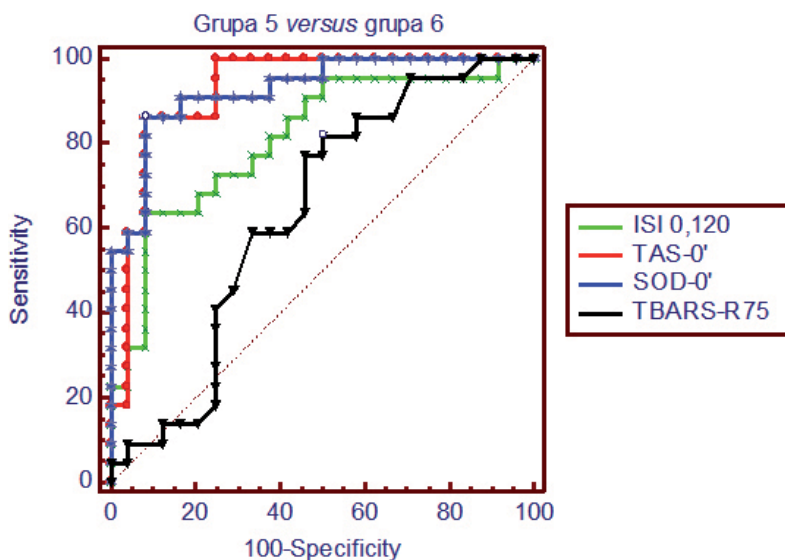
**Rycina 30.** Porównanie krzywych ROC w różnicowaniu grup (4+5) i grupy 6. Analiza dotyczy parametrów prezentujących najwyższe AUC w każdej z czterech kategorii: insulino-wrażliwość-insulinooporność, dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), całkowity stan antyoksydacyjny osocza (TAS), produkty peroksydacji lipidów w osoczu (TBARS); szczególne dane dla wszystkich ocenianych parametrów zamieszczono w tabeli 31.





ISI_0_120 ~ X_SOD0	
Difference between areas / Significance level	0,174 / P = 0,0063
ISI_0_120 ~ TAS_0'	
Difference between areas / Significance level	0,0165 / P = 0,3137
ISI_0_120 ~ TAS_R75_TBARS_R75	
Difference between areas / Significance level	0,150 / P = 0,0214
X_SOD0 ~ TAS_0'	
Difference between areas / Significance level	0,157 / P = 0,0174
X_SOD0 ~ TAS_R75_TBARS_R75	
Difference between areas / Significance level	0,0238 / P = 0,7821
TAS_0' ~ TAS_R75_TBARS_R75	
Difference between areas / Significance level	0,133 / P = 0,0494

**Rycina 31.** Porównanie krzywych ROC w różnicowaniu grupy 4 i grupy 6. Analiza dotyczy parametrów prezentujących najwyższe AUC w każdej z czterech kategorii: insulinowrażliwość-insulinooporność, dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), całkowity stan antyoksydacyjny osocza (TAS), produkty peroksydacji lipidów w osoczu (TBARS); szczegółowe dane dla wszystkich ocenianych parametrów zamieszczono w tabeli 31.



ISI_0_120 ~ TAS_0'	
Difference between areas / Significance level	0,114 / P = 0,1163
ISI_0_120 ~ SOD_0'	
Difference between areas / Significance level	0,116 / P = 0,1098
ISI_0_120 ~ TBARS_R75	
Difference between areas / Significance level	0,175 / P = 0,1279
TAS_0' ~ SOD_0'	
Difference between areas / Significance level	0,00189 / P = 0,9718
TAS_0' ~ TBARS_R75	
Difference between areas / Significance level	0,289 / P = 0,0048
SOD_0' ~ TBARS_R75	
Difference between areas / Significance level	0,291 / P = 0,0018

**Rycina 32.** Porównanie krzywych ROC w różnicowaniu grupy 5 i grupy 6. Analiza dotyczy parametrów prezentujących najwyższe AUC w każdej z czterech kategorii: insulinowrażliwość-insulinooporność, dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), całkowity stan antyoksydacyjny osocza (TAS), produkty peroksydacji lipidów w osoczu (TBARS); szczegółowe dane dla wszystkich ocenianych parametrów zamieszczono w tabeli 31.

## 5. Dyskusja

Patogenezę cukrzycy typu 2, podobnie jak innych wolno rozwijających się patologii, próbujemy ustalić analizując wyniki badań dotyczących różnych obszarów i etapów dysglikemii – wysiłek wielu badaczy służy opracowaniu modelu choroby, a zwłaszcza skutecznej prewencji i wczesnej diagnostyki oraz zaproponowaniu najskuteczniejszego leczenia.

Wyniki przedstawianej pracy są głosem w dyskusji nad charakterystyką populacji polskiej pod względem wskaźników insulinowrażliwości–insulinooporności (IS/IR) i wartości HbA1c oraz ich znaczenia diagnostycznego w stanach zwiększonego ryzyka cukrzycy typu 2. Polskie Towarzystwo Diabetologiczne nie zaleca stosowania HbA1c w diagnostyce cukrzycy i stanów przedcukrzycowych, w odróżnieniu od Amerykańskiego Towarzystwa Diabetologicznego [10] i towarzystw europejskich, argumentując to brakiem wystarczającej kontroli jakości metod laboratoryjnych w Polsce oraz nieustaloną wartością diagnostyczną HbA1c w rozpoznawaniu cukrzycy dla polskiej populacji [177].

Autorka skorzystała z dwóch możliwości określenia dysglikemii, na podstawie OGTT i wartości HbA1c [77, 167], dla wyodrębnienia poszczególnych grup badanych, mogących odpowiadać naturalnemu postępowi zagrożenia zaburzeniami glikemii u ludzi. Stratyfikację ryzyka założono ze względu na wartość wskaźnika BMI oraz stopień zaburzeń glikemii. Wśród osób dysglikemicznych na szczególną uwagę zasługuje wydzielenie grup: IFG (grupa 4), IGT (grupa 5) i świeżo rozpoznanej cukrzycy (grupa 6). Nadal brakuje prac charakteryzujących oddzielnie dwie kategorie *prediabetes*. Badacze często łączą je w jeden stan przedcukrzycowy [162] lub opisują jako dysglikemię – łącznie ze świeżo wykrytą T2DM [87].

W przedstawianej pracy porównanie kliniczno-metaboliczne osób z kolejnych badanych grup od 1 do 6 pokazuje systematyczne gromadzenie czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych (ChSN), choć z różną intensywnością w zależności od analizowanego parametru.

Analiza wartości HbA1c między grupami ukazuje podobieństwo metaboliczne normoglikemicznych osób otyłych (grupa 3) z osobami w stanie przedcukrzycowym (grupy 4 i 5). Podobnych informacji dostarcza ocena wskaźników insulinowrażliwości, choć trzeba zauważyć, że w przypadku  $ISI_{0,120}$  i  $ISI_{\text{Matsuda}}$  normoglikemiczne osoby z nadwagą (grupa 2) przyjęły wartości pośrednie między grupą 1 a grupą 3. Z kolei wskaźnik insulinoporności HOMA-IR wyraźnie różnicuje grupę 2 od grupy 1, następnie przyjmuje podobne wartości u nor-

moglikiemicznych osób z nadwagą (grupa 2) i otyłością (grupa 3) i na kolejnym wyższym poziomie, w grupach dysglikemicznych, nie różni się u osób ze stanem przedcukrzycowym (grupy 4 i 5) i świeżo rozpoznaną cukrzycą (grupa 6). Dla żadnego z omawianych parametrów insulinowrażliwości–insulinooporności nie zaobserwowano różnicy istotnej statystycznie, porównując osoby ze stanem przedcukrzycowym (grupy 4 i 5) i ze świeżo rozpoznaną T2DM (grupa 6).

Analiza parametrów gospodarki lipidowej pokazała podobieństwo metaboliczne grupy 1 i 2 w zakresie stężenia TAG, HDL-C i nie-HDL-C oraz grup 3, 4, 5 i 6 w zakresie wszystkich ocenianych parametrów lipidowych.

Na tym etapie oceny równowagi metabolicznej badanej populacji możemy podjąć dyskusję nt. obecnego w literaturze określenia „otyły-metabolicznie zdrowy” (ang. *metabolically healthy obese*), proponowanego dla osób z nadmierną masą ciała, bez nadciśnienia, dyslipidemii i cukrzycy [5] oraz wynikami przedstawianego badania uzasadnić porównywalną zwiększoną śmiertelność osób otyłych zarówno metabolicznie zdrowych jak i chorych [75].

Na podstawie przeglądu publikacji, porównując wyniki badań uzyskanych bezpośrednio (metodą kłamry metabolicznej) oraz pośrednio i przy użyciu wskaźników zastępczych [119], największą wartość predykcyjną dla cukrzycy wykazano dla wskaźnika  $ISI_{0,120}$  [70] – tzw. indeksu Gutt. Ekspersi podkreślali, że wskaźnik ten odzwierciedla różne aspekty patogenetyczne cukrzycy, co tłumaczy umiarkowaną korelację z bezpośrednią metodą pomiaru insulinooporności, a z drugiej strony znacznie podnosi wartość kliniczną parametru [70].

W przedstawianych badaniach przeanalizowano wskaźniki insulinowrażliwości–insulinooporności, tj. uzyskany z pomiarów na czczo wskaźnik HOMA-IR i pochodzące z OGTT dynamiczne wskaźniki:  $ISI_{Matsuda}$  i  $ISI_{0,120}$ . Analiza krzywych ROC pokazała znaczenie tych wskaźników w prognozowaniu rozwoju T2DM w populacji polskiej. Wyniki dla HOMA-IR i  $ISI_{Matsuda}$  nie odbiegały od danych opublikowanych przez innych autorów [150]. W niniejszej pracy zwiększająca się wartość HOMA-IR dobrze prognozowała wystąpienie dysglikemii, ale była słabym wskaźnikiem predykcyjnym dla cukrzycy u osób z dysglikemią. Wskaźnik  $ISI_{Matsuda}$  bardziej przydatny niż HOMA-IR, różnicował poszczególne grupy pacjentów za wyjątkiem IGT i świeżo wykrytej T2DM.

W przedstawianych badaniach po raz pierwszy podano wartości indeksu Gutt dla populacji polskiej, wraz z czułością i swoistością, dla prognozowania zagrożenia cukrzycą. Prezentowane badania pokazują, że wskaźnik  $ISI_{0,120}$  może być stosowany na każdym etapie rozwoju stanu przedcukrzycowego, od okresu normoglikemii i prawidłowej masy ciała, przez okres nadwagi/otyłości oraz zaburzonej tolerancji glukozy, aż do świeżo rozpoznanej cukrzycy – ze względu na systematyczne obniżanie indeksu Gutt. Podobne wnioski ogłosili badacze chińscy, przedkładając indeks Gutt nad wskaźnik albumina/kreatynina w moczu, stężenie

adiponektyny i interleukiny 6 oraz HOMA-IR [96]. Uzyskane wartości  $ISI_{0,120}$  są porównywalne z danymi opublikowanymi przez Gutt i wsp. dla trzech grup osób – z prawidłową tolerancją glukozy, IGT i typem 2 cukrzycy – poddanych badaniu metodą klamry metabolicznej i OGTT [67].

W przedstawianej pracy największe znaczenie diagnostyczne wykazano przy różnicowaniu normoglikemicznych osób z nadwagą i otyłością (grupy 2 i 3) z osobami ze stanem przedcukrzycowym (grupy 4 i 5).

Dla ograniczenia innych niż glikemia czynników mogących modyfikować stan równowagi oksydanty-antyoksydanty, do badanych grup kwalifikowano osoby o porównywalnych stężeniach parametrów lipidowych we krwi, z prawidłową morfologią krwi obwodowej i stężeniem hsCRP < 8 mg/l. Mimo to badana populacja zaprezentowała podwyższone wartości parametrów procesu zapalnego (WBC, hsCRP) w dysglikemicznych grupach 4, 5 i 6 w porównaniu z normoglikemicznymi grupami 1, 2 i 3 oraz porównywalne wartości WBC i hsCRP w grupach 4–6, potwierdzając znaczenie każdej nieprawidłowej glikemii w patobiochemii ryzyka ChSN.

W wielu pracach dotyczących jawnej cukrzycy, zwłaszcza typu 2, udowodniono udział reakcji zapalnej [169] i aktywacji komórek układu immunologicznego [43]. Akcentuje się rolę stresu oksydacyjnego w patomechanizmie przewlekłych powikłań cukrzycowych – najczęściej jako mechanizmu łączącego pozostałe zjawiska patologiczne [55, 31], szczególnie w odniesieniu do dysfunkcji śródbłonna [148].

W pracach oceniających stan równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej w warunkach podstawowych, rano na czczo, badacze zaobserwowali obniżoną aktywność SOD oraz podwyższone stężenie TBARS w osoczu u osób z cukrzycą typu 1 i typu 2, w porównaniu z grupą normoglikemiczną [3]. Colak i wsp. udokumentowali znacznie obniżoną aktywność erytrocytarnej SOD-1 i stężenie TAS w osoczu u pacjentów z T2DM i ChSN w porównaniu z osobami zdrowymi [41]. Odnotowano podwyższone stężenia produktów peroksydacji lipidów u pacjentów z T2DM w porównaniu z osobami IGT i normoglikemicznymi, z dodatnią korelacją TBARS i HbA1c u osób z cukrzycą [174]. Ogromna wartość pojedynczego badania, opisującego podstawowy metabolizm człowieka, może być podniesiona, gdy zastosujemy badania dynamiczne oraz jeszcze bardziej – przy wykorzystaniu idei badania czynnościowego.

Związek cukrzycy z chorobami sercowo-naczyniowymi powoduje, że szczególnego znaczenia nabiera analiza mechanizmów proponowanych jako wspólne dla obu patologii. Łączna ocena wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego potencjału antyoksydacyjnego krwi wraz ze stężeniem produktów peroksydacji lipidów w osoczu u osób ze zwiększonym ryzykiem rozwoju cukrzycy typu 2 dostarczy informacji patogenetycznych i polepszy postępowanie diagnostyczno-terapeutyczne.

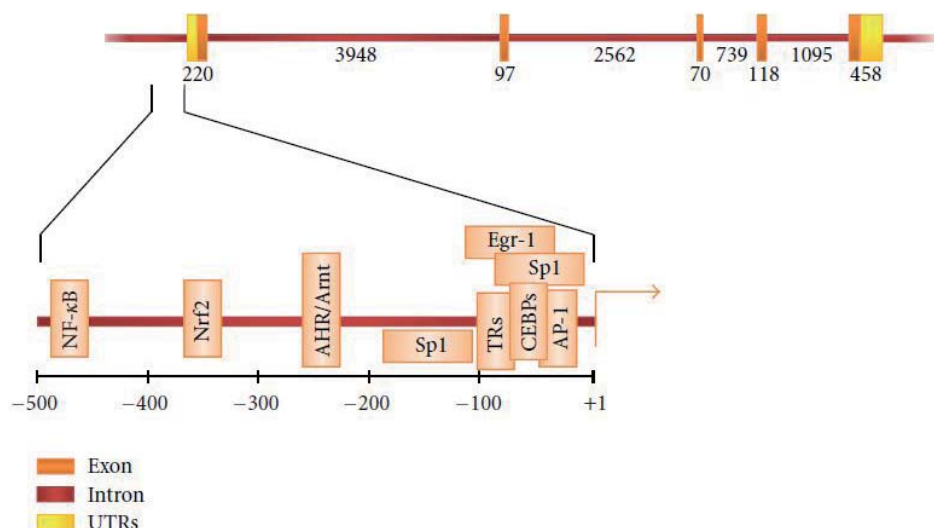
Jako marker przedziału wewnątrzkomórkowego badano aktywność cytoplazmatycznej SOD-1 w erytrocytach, enzymu działającego na pierwszym etapie

ograniczania rozprzestrzeniania się reaktywnych form tlenu – eliminowania anionorodnika ponadtlenkowego. W PBMC krwi obwodowej równolegle badano ekspresję genu dla SOD-1. Dla oceny osocznego zasobu zewnątrzkomórkowego antyoksydantów wybrano stężenie całkowitego stanu antyoksydacyjnego (*total antioxidant status*, TAS). Skutki działania reaktywnych form tlenu oceniano jako produkty peroksydacji lipidów (TBARS) w osoczu.

Badanie klinicznego znaczenia dysmutazy ponadtlenkowej zapoczątkowała neurologia. Stwardnienie zanikowe boczne (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS), zwłaszcza postać rodzinna, jest jednostką chorobową, w której najlepiej przebadano aktywność dysmutazy ponadtlenkowej oraz mutacje i ekspresję genu dla SOD-1, a mimo to precyzyjny mechanizm, według którego każda z opisanych mutacji prowadzi do choroby neurodegeneracyjnej, nadal pozostaje niejasny [25]. Mutacje o różnych własnościach dają ten sam efekt kliniczny, a w badaniach laboratoryjnych – np. obniżenie aktywności Cu,Zn-SOD w erytrocytach [160].

Gen warunkujący ludzką Cu,Zn-SOD jest zlokalizowany na chromosomie 21q22 i składa się z pięciu eksonów oddzielonych czterema intronami. Czynniki transkrypcyjne, zaangażowane w regulację ekspresji genu dla SOD, zarówno konstytucyjną jak i indukowaną [111], to:

- jądrowy czynnik kappa B (ang. *nuclear factor-kappaB*, NF-κB), wrażliwy na zmiany stanu redox w komórce [76],
- białko SP1 (ang. *Specificity Protein 1*) [113],



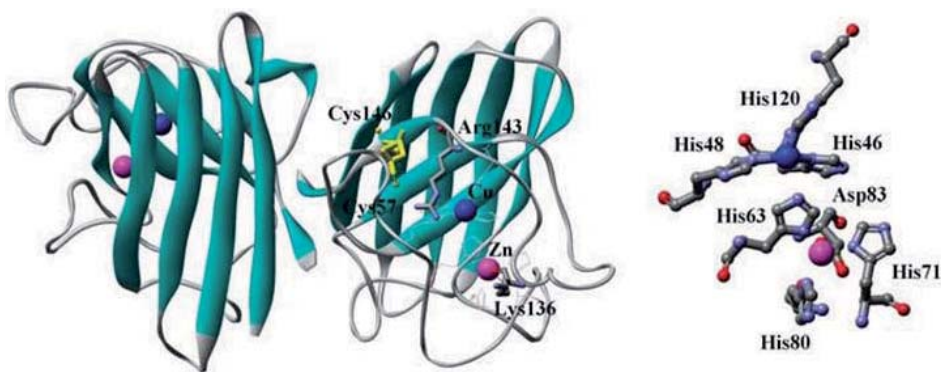
**Rycina 33.** Struktura i organizacja genu kodującej dysmutazę ponadtlenkową SOD-1 [112] – opis w tekście.

- kompleks białkowy AP-1 (ang. *activating protein-1*), wrażliwy m.in. na cytokiny i stres oksydacyjny, opisywany w procesach proliferacji komórki i transformacji nowotworowej, w odniesieniu do SOD-1 ma zmniejszać transkrypcję genu [13],
- rodzina białek AP-2 (ang. *activating protein-2*) [52], przez które ginsenozyd Rb<sub>2</sub> (substancja aktywna z korzenia żeń-szenia właściwego *Panax ginseng*) może zwiększać transkrypcję *sod1* [90],
- białka wiążące się z sekwencją, regulatorową i wzmacniającą, CCAAT tzw. C/EBP (ang. *CCAAT-Enhancer-Binding Proteins*), niezbędne dla podstawowej transkrypcji genu dla SOD-1 [135].

Badacze sugerują specjalne oddziaływania transkrypcyjne opisane w badaniach na zwierzętach: pozytywne – poprzez czynnik transkrypcyjny Elk1 i negatywne – poprzez YY1 [34]. Wykazano, że kwas arachidonowy aktywuje gen dla SOD-1 poprzez PPRE (ang. *peroxisome proliferator-responsive element*) [175]. Natomiast lek przeciwnowotworowy, mitomycyna C, hamuje transkrypcję genu dla SOD-1 u ludzi poprzez czynnik p-53 [36], a ksenobiotyki mogą stymulować indukcję ekspresji genu dla SOD-1 oddziałując na obszary ARE (ang. *antioxidant responsive element*) bądź XRE (ang. *xenobiotic responsive element*) [124].

Efekt końcowy, jakim jest aktywność enzymu, nie jest prostym przełożeniem struktury genu na ilość białka enzymatycznego i jego aktywność. W ostatnich latach doceniamy regulację epigenetyczną, która dotyczy zmian ekspresji genu bez zmian sekwencji DNA – kowalencyjnych modyfikacji DNA i zmian struktury chromatyny. Epigenetyka tłumaczy różnice fenotypowe, wynikające z różnej ekspresji genów identycznych genetycznie komórek. Do uznanych mechanizmów epigenetycznych należą: metylacja DNA, potranslacyjne modyfikacje białek histonowych (m.in. fosforylacja, acetylacja, metylacja), przebudowa chromatyny zależna od ATP, powstawanie wariantów histonów oraz regulacja genów przez niekodujący RNA (non-coding RNA, ncRNA) – czynnik odróżniający sekwencje DNA przeznaczone do wyciszenia. Ważnym etapem kontroli ekspresji genu jest poziom potranskrypcyjny, obejmujący zmiany stabilności mRNA, translację mRNA i regulacje potranslacyjne – to dzięki nim jest możliwa szybka modyfikacja. W odróżnieniu od SOD-2, opublikowano niewiele badań nad mechanizmami regulacji epigenetycznych i potranskrypcyjnych dla SOD-1 [121].

SOD-1 jest kluczowym enzymem antyoksydacyjnym, regulującym ilość anionorodnika ponadtlenkowego w cytozolu – potrzebnego dla normalnego metabolizmu komórki (regulacja szlaków sygnałowych, zwalczanie patogenów), ale również pojawiającego się pod wpływem procesów patologicznych i czynników zewnętrznych, ograniczając możliwość powstawania rodnika hydroksylowego z  $\cdot\text{O}_2^-$  [126]. Enzym jest dimerem o masie cząsteczkowej 32 kDa. Część białkowa (apoenzym) powstaje na rybosomach w formie monomerów, które następnie



**Rycina 34.** Model dojrzałej, aktywnej cytoplazmatycznej dysmutazy ponadtlenkowej SOD-1 [59]. Jony miedzi i cynku zaznaczono w formie kulek, odpowiednio na niebiesko i różowo; wiązanie dwusiarczkowe – linią łamaną. Po stronie prawej schemat struktury koordynacyjnej wokół jonów  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$ .

są transportowane do cytoplazmy. Do apoenzymu włączane są jony  $\text{Zn}^{2+}$  odpowiedzialne za utrzymanie stabilności SOD-1 i jony  $\text{Cu}^{2+}$  warunkujące aktywność katalityczną (oksydacyjno-redukcyjną) [28, 71]. Dla pełnej aktywności enzymu jednostki muszą być połączone mostkiem dwusiarczkowym, a utworzenie połączenia ułatwia specjalne białko „towarzyszące” CCS (*Copper Chaperone for SOD*), którego podstawowym zadaniem jest ścisła kontrola dostarczania miedzi do apoenzymu [29]. Hamowanie lub przyspieszanie procesu „dojrzewania” enzymu w cytoplazmie będzie elementem potranslacyjnej modyfikacji SOD-1 [59, 130]. Próbę opisanego etapu podjęto w badaniach dotyczących suplementacji cynkiem na modelu zwierzęcym ALS, uzyskując zarówno negatywny jak i pozytywny efekt [54, 64], odwrotnie proporcjonalnie do wielkości podaży Zn drogą pokarmową. Badacze sugerowali przeprowadzanie wyjściowej oceny statusu cynku we krwi dla ustalenia optymalnej suplementacji u pacjenta z ALS i podkreślili konieczność prowadzenia badań nad regulacją ekspresji i modyfikacją potranslacyjną *sod1*. Kolejnym kierunkiem badań, ostatnio bardzo intensywnych w różnych patologiach u ludzi, jest udział mikro RNA w regulacji procesów translacji [111].

Znaczne niedobory miedzi i cynku u osób żywionych doustnie występują stosunkowo rzadko (w odróżnieniu od długotrwanie żywionych parenteralnie), jednak zaobserwowano zmniejszone stężenie Zn i aktywność SOD-1 oraz zwiększone stężenie TBARS rano na czczo w erytrocytach otyłych mężczyzn, przy niezmienionych stężeniach miedzi i żelaza w komórce, w porównaniu z grupą zdrowych mężczyzn o prawidłowym BMI [123]. W badaniach nad transgenicznymi myszami pozbawionymi białka CCS w cytoplazmie SOD-1 prezentowała 15% aktywności w porównaniu z myszami ze szczepu dzikiego, musi więc istnieć dodatkowa możliwość utworzenia aktywnej formy enzymu [19, 170].



W literaturze nie znaleziono prac porównujących zmiany markerów stresu oksydacyjnego we krwi w trakcie testu doustnego obciążenia glukozą, w grupach osób prezentujących stopniowe zwiększanie ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2. Badacze z reguły porównują wyniki oznaczeń w surowicy na czczo, coraz częściej w odpowiedzi na ładunek glukozy (np. w trakcie testu doustnego obciążenia glukozą), oceniając pacjentów z cukrzycą, upośledzoną tolerancją glukozy (IGT) lub ogólnie – ze stanem przedcukrzycowym, i prawidłową tolerancją glukozy.

Badacze zaobserwowali zwiększoną całkowitą aktywność SOD w erytrocytach i TBARS w osoczu u pacjentów z cukrzycą w porównaniu z osobami bez cukrzycy (z prawidłowym i nieprawidłowym stężeniem glukozy na czczo) [15]. Ocena TBARS w trakcie OGTT ujawniła wzrost stężenia produktów peroksydacji lipidów w 120. min testu u osób z IGT i u osób z cukrzycą, a brak zmian u osób z prawidłową tolerancją glukozy [137].

Analiza wyników aktywności SOD: na czczo, w odpowiedzi na 75 g glukozy i w formie indeksu zmian w trakcie OGTT, w przedstawianym modelu badawczym, sugeruje narastanie aktywności podstawowej SOD wraz ze zwiększaniem BMI, z kulminacją przy wystąpieniu upośledzonej tolerancji glukozy (grupa 5). Jednocześnie towarzyszy temu obniżanie przyrostu aktywności SOD w odpowiedzi na bodziec glukozy (SOD-R<sub>75</sub>), począwszy od przejścia stanu nadwagi w otyłość, poprzez stan przedcukrzycowy aż do rozwoju T2DM. Osoby ze stanem przedcukrzycowym pod postacią IFG (grupa 4), odmiennie od osób z IGT, mogą prezentować aktywność podstawową enzymu zbliżoną do wartości stwierdzanych u normoglikemicznych osób z nadwagą.

Obserwacja wartości xSOD w trakcie testu doustnego obciążenia glukozą wskazuje na to, że kilkukrotne zwiększenie ekspresji genu dla SOD-1 w odpowiedzi na 75 g glukozy może charakteryzować prawidłowy metabolizm człowieka w przedstawianym badaniu taką sytuację zaobserwowano w grupach 1 i 2. Wraz ze zwiększaniem BMI i rozwojem zaburzeń glikemii zdolność do nasilania ekspresji w odpowiedzi na bodziec glikemiczny ulegała osłabieniu.

Różny czas trwania upośledzonej tolerancji glukozy jako kategorii stanu przedcukrzycowego, ze zwiększoną podstawową ekspresją genu dla SOD-1, utrzymującą się dzień po dniu w wyniku stymulacji np. hiperglikemią, może objawiać się podwyższoną podstawową aktywnością enzymu u osób z IGT. Jednocześnie coraz słabsza odpowiedź na bodziec hiperglikemiczny (obniżanie indeksu xSOD-R<sub>75</sub>) w konsekwencji może doprowadzić do zmniejszenia ekspresji i aktywności enzymu oraz zmniejszenia mobilizacji obrony antyoksydacyjnej (grupa 6 – osoby ze świeżo rozpoznaną cukrzycą).

Nieco inaczej przebiegać mogą zmiany stanu antyoksydacyjnego osocza. W przedstawionym scenariuszu rozwoju T2DM podstawowe stężenie TAS osocza zwiększa się systematycznie wraz ze zwiększaniem BMI, aż do wystąpienia

hiperglikemii przedcukrzycowej, głównie IFG. Indeks zmiany TAS pod wpływem 75 g glukozy ulegał zmniejszaniu od grupy 1 do grupy 6. Natomiast IGT, z dużą rozpiętością wyników stężenia TAS, może być rozpoznane jako stan, w którym dochodzi do załamania mechanizmów obronnych i w konsekwencji do przejścia do kolejnego etapu – cukrzycy typu 2.

Niekorzystny scenariusz stresu oksydacyjnego uzupełniają podstawowe stężenia produktów peroksydacji lipidów (TBARS), porównywalne u normoglikemicznych osób z prawidłowym BMI (grupa 1) i nadwagą (grupa 2), natomiast zwiększone u otyłych (grupa 3), ze stanem przedcukrzycowym (grupy 4 i 5) i T2DM (grupa 6). Względnie stabilna odpowiedź TBARS na 75 g glukozy w grupach 1–5 ulegała zwiększeniu przy wystąpieniu T2DM (grupa 6).

Serin i wsp. wykazali narastanie stężenia MDA (jako TBARS) w trakcie OGTT u pacjentów z IGT i t2DM, przy braku zmian w grupie osób z prawidłową tolerancją glukozy [137]. Wzrost stężenia produktów peroksydacji lipidów w surowicy zaobserwowano w trakcie OGTT u kobiet prezentujących zarówno prawidłową, jak i upośledzoną tolerancję glukozy [88].

W przeprowadzonych badaniach oceniono ekspresję genu dla SOD-1 i aktywność końcową enzymu w dwóch różnych liniach komórkowych i uzyskano wysoką, dodatnią korelację wartości ekspresji SOD (w leukocytach) i aktywności SOD (w erytrocytach), zwłaszcza na czczo. Z jednej strony potwierdza to konstytutywną cechę SOD-1 [113], a z drugiej strony sugeruje, że zaobserwowane w trakcie OGTT zmiany ekspresji genu dla SOD-1 mają charakter potranskrypcyjny, jak wnioskowali badacze w innych sytuacjach klinicznych [59]. Stwierdzona równoległość zmian ekspresji genu dla SOD-1 w PBMC i aktywności SOD-1 w erytrocytach promuje ocenę aktywności erytrocytarnej Cu,Zn-SOD jako parametru odzwierciedlającego wewnątrzkomórkowy potencjał antyoksydacyjny w sytuacji zwiększonego ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2.

Pomimo bardzo dużego zainteresowania rolą nadtlenu, w tym anionorodnika ponadtlenu  $\cdot\text{O}_2^-$ , nie obserwujemy szerokiego klinicznego zastosowania leczenia opartego na mechanizmach „zmiatania” nadtlenu z użyciem SOD jako leku bądź związków mimetycznych czy stechiometrycznych „zmiataczy”  $\cdot\text{O}_2^-$  [106].

Aktualnie rozwijane sposoby terapii z wykorzystaniem idei dysmutazy ponadtlenu w unieczynnianiu RFT obejmują [12]:

1. zwiększenie ekspresji genu dla SOD lub zwiększenie aktywności enzymu, bez suplementacji antyoksydantami – taki mechanizm opisano dla inhibitorów kanału wapniowego (amlodypina) i inhibitorów enzymu konwertującego angiotensynę I (enalapril) na przykładzie wzrostu aktywności Cu,Zn-SOD w komórkach mięśnia sercowego [159] oraz przy zastosowaniu ekstraktu z kwiatu róży *Rosa rugosa* [120],

2. zastosowanie związków naśladowujących działanie SOD (nadal w fazie prób przedklinicznych) – oparte na strukturze porfiryn lub składowych selenowo-manganowych, które potencjalnie mogą zastąpić aktywność zarówno SOD jak i katalazy, przewidywane do długotrwałego stosowania w dawkach profilaktycznych [80, 128, 179],
3. suplementację enzymu tzw. „super-SOD” – np. przy użyciu białka-chimery o strukturze SOD-2/3 prezentującego mniejsze powinowactwo do powierzchni komórkowej, umożliwiające podawanie dożylnie [74]. W badaniach na zwierzętach laboratoryjnych uzyskano efekt przeciwwzapalny w uszkodzeniach płuc i obrzękach nóg, zmniejszenie uszkodzenia oksydacyjnego podczas reperfuzji oraz zmniejszenie ilości oddziaływań neutrofil-endothelium [23].

Stres oksydacyjny nie jest chorobą samą w sobie (*per se*), lecz istotną składową wielu schorzeń, m.in. procesów zapalnych, przebiegających z niedokrwieniem i reperfuzją, neurodegeneracyjnych, nowotworowych i cukrzycy [106, 148]. Na podstawie badań klinicznych, oceniających stosowanie dysmutazy ponadtlenkowej, można wskazać jednostki chorobowe, w których zaobserwowano korzyści: m.in. zapalenie kości i stawów, zwalczanie skutków radioterapii [48], wrzodzące zapalenie jelita grubego [138], leczenie niewydolności oddechowej u wcześniaków [45], bielactwo [133], ale znajdziemy również publikacje dokumentujące brak pozytywnych efektów: m.in. u pacjentów z nadciśnieniem samoistnym [61] i u pacjentów poddawanych zabiegowi pomostowania wieńcowego [27].

Jeżeli występują zróżnicowane efekty terapii antyoksydantami w jawnych klinicznie patologiach, to rozumiemy jeszcze większe trudności w ustaleniu pozycji tych czynników w prewencji chorób. Wyniki omawianych badań mogą przyczynić się do opracowania schematu postępowania w stanach zwiększonego ryzyka cukrzycy typu 2, w tym w zakresie zasadności stosowania antyoksydantów.

Ocena potencjału antyoksydacyjnego, zwłaszcza ocena dynamiczna pokazuje sposób radzenia sobie ze stresem metabolicznym. Odkrycie specyficznych zachowań aktywności SOD i stężeń TAS osocza w poszczególnych grupach osób ze zwiększonym ryzykiem rozwoju T2DM, do pewnego stopnia tłumaczy rozbieżne wyniki opublikowanych badań.

Osoby zdolne do zwiększania aktywności/stężenia antyoksydantów w trakcie OGTT to osoby „walczące”, mobilizujące się i być może dzięki temu nadal pozostające w stanie przedcukrzycowym. Osoby prezentujące niższe wartości SOD i TAS w 120. minucie OGTT w porównaniu z wartościami w 0. minucie, o indeksie  $R_{75}$  poniżej 1.0, mogą zostać rozpoznane jako intensywnie „zużywające” potencjał antyoksydacyjny lub pozbawione zdolności do mobilizowania mechanizmów obronnych. Hiperglikemia po spożyciu 75 g glukozy jest niewątpliwie potencjalnym źródłem wolnych rodników, np. w mechanizmie autooksydacji glukozy z następową produkcją rodnika ponadtlenkowego, nasilonych reakcji szlaku polioliowego z konsekwencją zmiany proporcji  $NADPH/NAD^+$  i  $NADH/NAD^+$ , co

prowadzi do uruchamiania syntezy prostaglandyn równoległe ze zwiększaniem produkcji nadtlenków [39, 110].

Traktując hiperglikemię jako czynnik prowokujący stres oksydacyjny, badacze próbują ustalić przebieg równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej świadczący o prawidłowym metabolizmie. Ceriello i wsp. porównali wartości całkowitej zdolności antyoksydacyjnej osocza, stężenia kwasu askorbinowego,  $\alpha$ -tokoferolu i grup -SH białek w trakcie testu doustnego obciążenia glukozą u 10 osób normoglikemicznych i u 10 pacjentów T2DM. Statystycznie istotne niższe wartości zdolności antyoksydacyjnej, bez zmian w pozostałych parametrach, zaobserwowali w grupie T2DM w porównaniu z grupą normoglikemiczną. Dodatkowo zmienność zdolności antyoksydacyjnej w pięciu punktach czasowych testu (0, 30, 60, 90, 120. min OGTT) różniła się między dwiema grupami, prezentując systematyczne obniżanie się potencjału antyoksydacyjnego u pacjentów T2DM [30]. W kolejnej pracy oceniającej wpływ przyjęcia 75 g glukozy na stan antyoksydacyjny osocza, oceniany jako FRAP – ang. *ferric reducing/antioxidant power*, i stężenie malonyldialdehydu w trakcie OGTT u 10 osób z prawidłową tolerancją glukozy, badacze nie zaobserwowali istotnych statystycznie zmian parametrów w czasie [97].

W przedstawianym modelu badawczym 24 normoglikemiczne osoby (12 kobiet i 12 mężczyzn) z prawidłowym BMI można uznać za grupę odniesienia, a „zachowanie” aktywności SOD, stężenia TAS i TBARS pod wpływem bodźca 75 g glukozy – przyjęć jako wzorcowe. W kolejnych normoglikemicznych grupach osób, z nadwagą (grupa 2) i otyłością (grupa 3), indeksy  $R_{75}$  dla SOD, TAS i TBARS mogą współtworzyć model równowagi metabolicznej w sytuacji nadmiernej masy ciała.

Uzyskane w grupach 2 i 3 indeksy SOD-75 i TAS-75 powyżej 1.0 i indeks TBARS-75 porównywalny z grupą 1 oraz bardzo wysoka (grupa 2) i wysoka (grupa 3) odwrotna korelacja TAS-0' & TBARS-0', pozwalają nazwać taki układ skuteczną mobilizacją stanu antyoksydacyjnego i wydaje się, że pożądaną, skoro wyniki OGTT pozostają charakterystyczne dla prawidłowej tolerancji glukozy.

Wnioski stanowią zachętę do podjęcia badań prospektywnych nad stosowaniem antyoksydantów w określonych warunkach metabolicznych, dla prewencji cukrzycy, by odpowiedzieć na pytanie, którzy pacjenci odniosą korzyści z suplementacji. Istotne jest, by nie doszło do całkowitego zahamowania produkcji RFT, gdyż są one konieczne do prawidłowego funkcjonowania organizmu (co zaznaczono we wstępie). Znane są wyniki badań dowodzące supresyjnego wpływu pokarmowych antyoksydantów na zachowanie się endogennych mechanizmów obronnych, zwłaszcza dysmutazy ponadtlenkowej SOD-3, u ludzi zdrowych [91].

Pośród czynników transkrypcyjnych, zaangażowanych w regulację ekspresji genu dla SOD-1, badacze na pierwszym miejscu wymieniają jądrowy czynnik kappaB (NF- $\kappa$ B) [131], nazywany czynnikiem natychmiastowym, szybko reagującym na szkodliwe bodźce, a elementy odpowiadające za aktywację NF- $\kappa$ B po-

twierdzono w obszarach promotorowych i intronowych genu [76]. Rodnik ponadtlenkowy może przenikać przez błony endosomalne i w reakcji dysmutacji  $\cdot\text{O}_2^-$ , katalizowanej przez Cu,Zn-SOD na powierzchni endosomów, powstanie nadtlenek wodoru aktywujący szlak NF- $\kappa$ B [118]. Niektórzy badacze zaobserwowali, że indukcja ekspresji genu dla SOD-1 przebiega trudniej niż pozostałych dysmutaz ponadtlenkowych, zwłaszcza SOD-2 [113], co potwierdza udział pozostałych opisanych czynników transkrypcyjnych i konieczność kontroli dojrzewania SOD-1 w cytoplazmie, dla uzyskania końcowej aktywności enzymu.

Na przestrzeni lat badacze coraz więcej uwagi poświęcali poposiłkowej hiperглиkemii, zwłaszcza w patobiochemii przewlekłych powikłań cukrzycy [68, 146], właściwie interpretując wyniki badań prospektywnych [14]. Pojawiały się prace oceniające wpływ hiperглиkemii na poszczególne elementy rozważane w definicji miażdżycy, początkowo w badaniach *in vitro* i na zwierzętach [66, 60], kolejno *in vivo* u ludzi jako obserwacja zmian poposiłkowych [42, 129], a także – z wykorzystaniem testu doustnego obciążenia glukozą [114], niejednokrotnie uzyskując przeciwstawne wyniki dotyczące związku hiperглиkemii i insulinemii w 120. min OGTT z potwierdzoną koronarograficznie miażdżycą tętnic [89, 134].

Konukoglu i wsp., porównując wyniki badań w trakcie OGTT u osób z prawidłową tolerancją glukozy (NGT), IGT i świeżo rozpoznaną T2DM, wykazali brak różnic w podstawowej aktywności zewnątrzkomórkowej SOD (SOD-3) między grupami oraz wzrost aktywności w grupie IGT i spadek – w grupie T2DM, 120 min po obciążeniu glukozą. Jednocześnie stężenie TBARS w osoczu nie zmieniało się w trakcie testu w grupie NGT i ulegało zwiększeniu w grupach IGT i T2DM [94].

Analiza aktywności SOD-1 w trakcie OGTT ujawniła obniżone aktywności enzymu w 120. min testu, zwłaszcza w grupach T2DM i IGT, w porównaniu z prawidłową tolerancją glukozy [162] oraz obniżone aktywności SOD-1 w erytrocytach i brak zmian stężeń TBARS w osoczu, w trakcie OGTT, w stanie przedcukrzycowym w porównaniu z normoglikemią [172].

W 2009 r. Kabanova i wsp. ujawnili obecność typowego eukariotycznego RNA w ludzkich erytrocytach, dotąd uważanych za niezdolne do syntezy białka. Znaleziono transkrypty 1019 genów, z czego m.in. 529 genów odpowiedzialnych za metabolizm komórkowy (w tym 96 odpowiedzialnych za syntezę białek) i 228 genów dla przekaźników (z czego 112 genów dla przekaźników wewnątrzkomórkowych) [83]. To potwierdza hipotezę o syntezie białek niezależnej od obecności jądra w komórce [92]. Wykazano także ekspresję czynników NF $\kappa$ B i I $\kappa$ B- $\alpha$  w ludzkich erytrocytach [62]. Udokumentowano niektóre mechanizmy modyfikacji enzymu SOD-1 wyizolowanego z ludzkich erytrocytów, fosforylację i przyłączenie glutationu, z których ostatni jest związany z reakcjami redox i odpowiada za przejście dimeru SOD-1 w formę monomeru z następującą agregacją i zmniejszeniem aktywności enzymu [168]. Potranslacyjna modyfikacja SOD-1 w erytrocytach powinna być brana pod uwagę przy stwierdzaniu zmian aktywności enzymu.

Najlepiej, gdyby to sam organizm sprawował kontrolę i zwiększał ekspresję/aktywność SOD w zależności od potrzeb, by zabezpieczyć komórki i tkanki jedynie przed nadmiarem RFT. W niniejszej pracy TBARS stanowią przejaw działania RFT, które zdążyły zmodyfikować lipidy osocza lub błon komórkowych, dając produkty pośrednie, np. MDA, oceniane w reakcji z kwasem tiobarbiturowym. Część wolnych rodników tlenowych mogła zostać zużyta do aktywacji szlaku transkrypcyjnego genu dla SOD (leukocyty) lub wziąć udział w potranskrypcyjnych modyfikacjach, obejmujących zmiany stabilności mRNA, translację mRNA i potranslacyjną modyfikację (erytrocyty).

Przedstawione w pracy wzajemne korelacje parametrów stresu oksydacyjnego u normoglikemicznych osób z nadmierną masą ciała mogą stanowić metaboliczną charakterystykę tych grup, niezbędną do uniknięcia przejścia w stan przedcukrzycowy, np. odwrotna korelacja TAS-0' & TBARS-0' obserwowana jedynie w grupie 2 i 3. Dodatnia korelacja TAS-0' & TBARS-120' w grupie 2 może świadczyć o mobilizującym wpływie niewielkich stężeń TBARS w 120. min OGTT na utrzymanie optymalnych podstawowych stężeń TAS, natomiast ujemna – w grupie 6 – dowodzi negatywnego oddziaływania najwyższych obserwowanych w badanej populacji stężeń TBARS, w sytuacji rozpoznania T2DM.

Kolejne analizy statystyczne (korelacje i analiza regresji wielokrotnej) stanowią próbę wyjaśnienia metabolicznych aspektów stwierdzanych zmian aktywności, ekspresji i stężeń ocenianych parametrów stresu oksydacyjnego. Zwraca uwagę mnogość korelacji w grupie 2, z istotnymi zależnościami między aktywnością i ekspresją SOD a G-120' i HbA1c, co sugeruje, że u osób z nadwagą utrzymanie prawidłowej tolerancji glukozy może zależeć od sprawności dysmutazy ponadtlenkowej. W literaturze możemy znaleźć dowody na obecność wykładników oksydacyjnego uszkodzenia struktur komórek  $\beta$  wysp trzustkowych w typie 2 cukrzycy [132, 144].

Dowodzono, że zarówno IFG, jak i IGT prezentują niekorzystny lipidowy i prozapalny (hsCRP) profil metaboliczny w porównaniu z osobami o prawidłowej tolerancji glukozy. Jednakże ze względu na wyższe stężenie TAG i wolnych kwasów tłuszczowych oraz niższe stężenie HDL-C u osób IGT stwierdzono aterogenny profil ryzyka sercowo-naczyniowego, podobnie jak u osób ze świeżo rozpoznaną cukrzycą [33].

W przedstawianym badaniu osoby IFG (grupa 4) i IGT (grupa 5), spośród parametrów gospodarki węglowodanowej i lipidowej, różniły się wskaźnikiem insulinowrażliwości – wyższy  $ISI_{Matsuda}$  w grupie IFG. Zaobserwowano jedynie tendencję do wyższej HbA1c w grupie IGT. Nie znaleziono różnic w stężeniu hsCRP. Wyraźne różnice ujawniła ocena parametrów stresu oksydacyjnego: wyższa podstawowa aktywność i ekspresja SOD-1 w grupie 5 w porównaniu z grupą 4.

Odmienne związki czynników ryzyka ChSN z markerami stresu oksydacyjnego mogą charakteryzować dwie kategorie stanu przedcukrzycowego. W grupie

IFG związki metaboliczne dotyczyły głównie ekspresji genu dla SOD-1 (xSOD-120') i stężenia TBARS w trakcie OGTT, podczas gdy w grupie IGT – podstawowej aktywności enzymu i ekspresji genu dla SOD-1 oraz indeksu TAS-R<sub>75</sub>. Powtarzająca lub utrzymująca się hiperglikemia będąca źródłem rodnika ponadtlenkowego w komórkach  $\beta$  może nasilać ekspresję genu, np. dla SOD-1, bądź stymulować sekrecję insuliny [4, 127], ale także poprzez reaktywne formy tlenu i pochodne – bezpośrednio uszkadzać lipidy, białka i DNA komórki [151]. Dodatkowo zmiana ekspresji genu dla SOD-1 oraz indeksu TAS-R<sub>75</sub> w istotny sposób była dodatkowo związana z WBC krwi obwodowej w grupie osób z IGT. Liczba leukocytów i insulinemia w 120. min OGTT, niezależnie od pozostałych zmiennych, w przeszło 50% dodatkowo wpływały na zmienność produktów peroksydacji lipidów w trakcie OGTT, w całej badanej populacji. Potwierdza to wzajemne przenikanie się procesów zapalnych i mechanizmów stresu oksydacyjnego, zwłaszcza w dyskusji o patobiochemii zwiększonego ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2 i zagrożeniu miażdżycą.

Podjęmowane są próby opisanie roli poszczególnych składowych miażdżycy oraz roli stresu oksydacyjnego jako mechanizmu łączącego. Porównując kobiety z upośledzoną i prawidłową tolerancją glukozy, Kassi i wsp. wykazali, że oksydowane LDL są dobrym predykatorem insulinooporności. Zaobserwowali dodatnie korelacje produktów peroksydacji lipidów z hiperglikemią i hsCRP z insulinemią na czczo [88]. Analiza parametrów stresu metabolicznego, wywołanego reaktywnymi formami tlenu i azotu oraz markerów prozapalnych w trakcie OGTT u osób z prawidłową tolerancją glukozy, IGT i T2DM, ujawniła ich przewagę nad hiperglikemią w ocenie związku z chorobą niedokrwinną serca w grupie osób bez cukrzycy [38].

Analiza wszystkich parametrów metabolicznych w omawianym modelu badawczym, tj. markerów gospodarki węglowodanowej i lipidowej, stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego, sugeruje, że wraz ze zwiększaniem BMI rozwija się insulinooporność i do momentu wystąpienia stanu przedcukrzycowego, zwłaszcza upośledzonej tolerancji glukozy, wskaźniki insulinooporności z największą czułością i swoistością diagnostyczną zapowiadają kolejne etapy stanu zwiększonego ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2. Natomiast z momentem wystąpienia hiperglikemii przedcukrzycowej większego znaczenia nabiera stres oksydacyjny. Zaburzenia równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej mogą decydować o przejściu stanu przedcukrzycowego w cukrzycę.

Przyznanie stresowi oksydacyjnemu centralnej roli (łączącej inne elementy) w patobiochemii przewlekłych powikłań cukrzycy i uznanie początku zaburzeń w stanie przedcukrzycowym, stanowi wyzwanie dla skutecznego postępowania, niefarmakologicznego i farmakologicznego, w prewencji cukrzycy typu 2. Nie-

spełnienie nadziei terapeutycznych przy stosowaniu witamin antyoksydacyjnych (np. witaminy C i E), zwróciło badaczy ponownie ku idei enzymów antyoksydacyjnych, szczególnie cytoplazmatycznej dysmutazy ponadtlenkowej [32], o czym mowa powyżej.

Stan równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej, w tym wewnątrz- i zewnątrz-komórkowy potencjał antyoksydacyjny, stanowią cechę osobniczą. Mnogość czynników środowiskowych i endogennych patologii, które mogą wpływać na stan równowagi, tym bardziej uzasadniają potrzebę indywidualnej oceny stresu oksydacyjnego.

Stan przedcukrzycowy jest właściwym momentem, a stosowane metody diagnostyczne – test doustnego obciążenia glukozą – bardzo dobrą okazją i sposobem przeprowadzenia oceny zjawiska stresu oksydacyjnego: parametrów wyjściowych i indukowanych oraz wskaźników zmian.



## 6. Wnioski

1. Ocena dynamiki zmian parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej we krwi, w trakcie testu doustnego obciążenia glukozą, w modelu obejmującym grupy osób z narastającym wskaźnikiem masy ciała BMI (trzy grupy) i kategoriami dysglikemii (kolejne trzy grupy), odkrywa sekwencje zdarzeń w patobiochemii stanów przedcukrzycowych.
2. Bodziec glikemiczny ma istotny wpływ na aktywność enzymu SOD-1 i ekspresję genu dla SOD-1, w trakcie testu doustnego obciążenia glukozą.
3. Wzrost aktywności SOD-1 i ekspresji *sod1*, obserwowany w trakcie testu doustnego obciążenia glukozą u osób normoglikemicznych z prawidłową masą ciała i nadwagą, może zabezpieczać równowagę oksydacyjno-antyoksydacyjną w przypadku krótkotrwałego wzrostu stężenia glukozy we krwi.
4. Osoby otyłe, nawet w warunkach normoglikemii, prezentują wykładniki stresu metabolicznego zbliżone do osób z dysglikemią.
5. Grupy osób z dysglikemią prezentują wykładniki nasilającego się stresu oksydacyjnego, z odmiennym udziałem wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego potencjału antyoksydacyjnego.
6. Mechanizmy insulinooporności są odpowiedzialne za pogłębianie zaburzeń metabolicznych wraz ze zwiększaniem ryzyka cukrzycy typu 2. Stres oksydacyjny jest odpowiedzialny za konwersję stanu przedcukrzycowego do cukrzycy.
7. Test doustnego obciążenia glukozą, może być wykorzystany w grupie osób ze zwiększonym ryzykiem rozwoju cukrzycy typu 2, do oceny osobniczej podatności na stres oksydacyjny.

## 7. Piśmiennictwo

1. Abdella N, Salman A, Moro M. Classical microangiopathic diabetic complications in the absence of overt diabetes mellitus. *Diab Res Clin Pract.* 1990;8:283–286.
2. Abdul-Ghani MA, Tripathy D, De Fronzo RA. Contributions of beta-cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Diabetes Care.* 2006;29:1130–1139.
3. Abou-Seif MA, Youssef AA. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clin Chim Acta.* 2004;346:161–170.
4. Affourtit C, Jastroch M, Brand MD. Uncoupling protein-2 attenuates glucose-stimulated insulin secretion in INS-1E insulinoma cells by lowering mitochondrial reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2011;50:609–616.
5. Alam I, Nq TP, Larbi A. Does inflammation determine whether obesity is metabolically healthy or unhealthy? The aging perspective. *Mediators Inflamm.* 2012; 2012:456456. doi: 10.1155/2012/456456.
6. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998;15:539–553.
7. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome – a new worldwide definition. *Lancet.* 2005;366:1059–1062.
8. American Diabetes Association: Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 1997;20:1183–1197.
9. American Diabetes Association: Standards of medical care in diabetes – 2012. *Diabetes Care.* 2012;35:S11–S63.
10. American Diabetes Association: Standards of medical care in diabetes – 2013. *Diabetes Care.* 2013;36:S11–S66.
11. Ansley DM, Wang B. Oxidative stress and myocardial injury in the diabetic heart. *J Pathol.* 2013;229:232–241.
12. Bafana A, Dutt S, Kumar A, Kumar S, Ahuja PS. The basic and applied aspects of superoxide dismutase. *J Mol Catal B: Enzym.* 2011;68:129–138.
13. Baldelli S, Aquilano K, Rotilio G, Ciriolo MR. Glutathione and copper, zinc superoxide dismutase are modulated by overexpression of neuronal nitric oxide synthase. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40:2660–2670.
14. Baldeweg SE, Yudkin JS. Implications of the United Kingdom prospective diabetes study. *Prim Care.* 1999;26:809–827.
15. Bandeira SdeM, Guedes Gda S, da Fonseca LJ, Pires AS, Gelain DP, Moreira JC, Rabelo LA, Vasconcelos SM, Goulart MO. Characterization of blood oxidative stress

- in type 2 diabetes mellitus patients: increase in lipid peroxidation and SOD activity. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:819310. doi: 10.1155/2012/819310.
16. Bandeira SdeM, da Fonseca LJ, da S Guedes G, Rabelo LA, Goulart MO, Vasconcelos SM. Oxidative stress as an underlying contributor in the development of chronic complications in diabetes mellitus. *Int J Mol Sci*. 2013;14:3265–3284.
  17. Bartosz G. *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*. Wyd. Drugie. Wydawnictwo Naukowe PWN 2008.
  18. Bartosz G. Non-enzymatic antioxidant capacity assays: Limitation of use in biomedicine. *Free Radical Research*. 2010;44(7):711–720.
  19. Beckman JS, Estevez AG, Barbeito L, Crow JP. CCS knockout mice establish an alternative source of copper for SOD in ALS. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(10):1433–1435.
  20. Bhatt AP, Gupta A, Vibha D, Dharma A, Mahajan S. Florid diabetic complications in impaired glucose tolerance. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2013;24:86–88.
  21. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012;5:9–19.
  22. Bock G, Chittilapilly E, Basu R, Toffolo G, Cobelli C, Chandramouli V, Landau BR, Rizza RA. Contribution of hepatic and extrahepatic insulin resistance to the pathogenesis of impaired fasting glucose: role of increased rates of gluconeogenesis. *Diabetes*. 2007;56:1703–1711.
  23. Bonder CS, Knight D, Hernandez-Saavedra D, McCord JM, Kubes P. Chimeric SO-D2/3 inhibits at the endothelial-neutrophil interface to limit vascular dysfunction in ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;287:676–684.
  24. Bornfeldt KE, Tabas I. Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis. *Cell Metab*. 2011;14:575–585.
  25. Bruijn LI, Miller TM, Cleveland DW. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci*. 2004;27:723–749.
  26. Buchanan TA, Xiang AH, Peters RK, Kjos SL, Marroquin A, Goico J, Ochoa C, Tan S, Berkowitz K, Hodis HN, Azen SP. Preservation of pancreatic beta-cell function and prevention of type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk Hispanic women. 2002;51:2796–2803.
  27. Butterworth J, Lagault C, Stump DA, Coker L, Hammon JW Jr, Troost bt, Royster RL, Prough DS. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 1999;13:690–694.
  28. Carroll MC, Girouard JB, Ulloa JL, Subramaniam JR, Wong PC, Valentine JS, Culotta VC. Mechanisms for activating Cu- and Zn-containing superoxide dismutase in the absence of the CCS Cu chaperone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:5964–5969.
  29. Carroll MC, Outten CE, Proeschler JB, Rosenfeld L, Watson WH, Whitson LJ, Hart PJ, Jensen LT, Cizewski Culotta V. The effects of glutaredoxin and copper activation pathway on the disulfide and stability of Cu,Zn superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 2006;281:28648–28656.

30. Ceriello A, Bortolotti N, Crescentini A, Motz E, Lizzio S, Russo A, Ézsol Z, Tonutti L, Taboga C. Antioxidant defences are reduced during the oral glucose tolerance test in normal and non-insulin-dependent diabetic subjects. *Eur J Clin Invest.* 1998;28:329–333.
31. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol.* 2004;24:816–823.
32. Ceriello A, Testa R. Antioxidant anti-inflammatory treatment in type 2 diabetes. *Diab Care.* 2009;32:S232-S236.
33. Chakarova N, Tankova T, Atanassova I, Dakovska L. Serum lipid and hsCRP levels in prediabetes – impaired fasting glucose (IFG) and impaired glucose tolerance (IGT). *Diabetes Res Clin Pract.* 2009;86:56–60.
34. Chang MS, Yoo HY, Rho HM. Positive and negative regulatory elements in the upstream region of the rat Cu/Zn-superoxide dismutase gene. *Biochem J.* 1999;339:335–341.
35. Chen X, Zhao Y, Zhanq X, Li Q, Bai L, Zhang M. Prevalence and risk factors of diabetic retinopathy in Chongqing prediabetes patients. *Eye.* 2012;26:816–820.
36. Cho G, Kang S, Seo SJ, Kim Y, Jung G. The transcriptional repression of the human Cu/Zn superoxide dismutase (sod1) gene by the anticancer drug, mitomycin C (MMC). *Biochem Mol Biol Int.* 1997;42:949–956.
37. Chomczyński P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156–159.
38. Chu CS, Lee KT, Cheng KH, Lee MY, Kuo HF, Lin TH, Su HM, Voon WC, sheu SH, Lai WT. Postchallenge response of nitrotyrosine and TNF-alpha during 75-g oral glucose tolerance test are associated with the presence of coronary artery disease in patients with prediabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 2012;11:21. doi: 10.1186/1475–2840.
39. Chung SSM, Ho ECM, Lam KSL, Chung SK. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14,S233-S236.
40. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci.* 2013;9:191–200.
41. Colak E, Majkić-Singh N, Stanković S, Srecković-Dimitrijević V, Djordjević PB, Lalić N. Parameters of antioxidative defense in type 2 diabetic patients with cardiovascular complications. *Ann Med.* 2005;37:613–620.
42. Control Group; Turnbull FM, Abraira C, Anderson RJ, Byington RP, Chalmers JP, Duckworth WC, Evans GW, Gerstein HC, Holman RR, Moritz TE, Neal BC, Ninomiya T, Patel AA, Paul SK, Traver F, Woodward M. Intensive glucose control and macrovascular outcome in type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2009; 52:2288–2298.
43. Cruz NG, Sousa LP, Sousa MO, Pietrani NT, Fernandes AP, Gomes KB. The linkage between inflammation and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2013;99:85–92.

44. Culotta VC, Yang M, O'Halloran TV. Activation of superoxide dismutase: Putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763:747–758.
45. Davies JM, Parad RB, Michele T, Allred E, Price A, Rosenfeld W. Pulmonary outcome at 1 year corrected age in premature infants treated at birth with recombinant human CuZn superoxide dismutase. *Pediatrics*. 2003;111:469–476.
46. DeFronzo RA, Banerji M, Bray GA, Buchanan TA, Clement S, Henry RR, Kitabchi AE, Mudaliar S, Musi N, Ratner R, Reaven PD, Schwenke D, Stentz FB, Tripathy D. Actos Now for the prevention of the diabetes (ACT NOW) study. *BMC Endocr Disord*. 2009;9:17. doi: 10.1186/1472–6823–9–17.
47. DeFronzo RA, Matsuda M. Reduced time points to calculate the composite index. *Diabetes Care*. 2010;33:e93.
48. Delanian S, Baillet F, Huart J, Lefaix JL, Maulard C, Housset M. Successful treatment of radiation-induced fibrosis using liposomal Cu/Zn superoxide dismutase: clinical trial. *Radiother Oncol*. 1994;32:12–20.
49. Dembińska-Kieć A., Naskalski J. (red.): Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. Wyd. 3 poprawione i uzupełnione. Elsevier Urban & Partner, Wrocław, 2010:212.
50. Diabetes Control and Complication Research group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993;329:977–986.
51. Diabetes Prevention Program Research Group. The prevalence of retinopathy in impaired glucose tolerance and recent-onset diabetes in the Diabetes Prevention Program. *Diabet Med*. 2007;24:137–144.
52. Eckert D, Buhl S, Weber S, Jager R, Schorle H, The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biol*. 2005;6:246.1–246.8.
53. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*. 2004;37:277–285.
54. Ermilova IP, Ermilov VB, Levy M, Ho E, Pereira C, Beckman JS. Protection by dietary zinc in ALS mutant G93A SOD transgenic mice. *Neurosci Lett*. 2005;379:42–46.
55. Evans JL, Goldfine id, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction? *Diabetes*. 2003;52:1–8.
56. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2003;26 suppl 1:S5–S20.
57. Færch K, Vaag A, Holst JJ, Glümer C, Redersen O, Borch-Johnsen K. Impaired fasting glycaemia vs impaired glucose tolerance: similar impairment of pancreatic alpha and beta cell function but differential roles of incretin hormones and insulin action. *Diabetologia*. 2008;51:853–861.

58. Færch K, Borch-Johnsen K, Holst JJ, Vaag A. Pathophysiology and aetiology of impaired fasting glycaemia and impaired glucose tolerance; does it matter for prevention and treatment of type 2 diabetes? *Diabetologia*. 2009;52:1714–1723.
59. Furukawa Y, O'Halloran TV. Posttranslational modifications in Cu,Zn-superoxide dismutase and mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8:847–867.
60. Gade PV, Andrades JA, Nimni ME, Becerra J, Longoria J, Asemanfar N, Sorgente N. Nitric oxides mediates hyperglycemia-induced defective migration in cultured endothelial cells. *J Vasc Surg*. 1997; 26:319–326.
61. Garcia CE, Kilcoyne CM, Cardillo C, Cannon 3rd RO, Quyyumi AA, Panza JA. Effect of copper-zinc superoxide dismutase on endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. *Hypertension*. 1995;26:863–868.
62. Ghoshghaieina M, Toulany M, Saki M, Bobbala D, Fehrenbacher B, Rupec R, Rodemann HP, Ghoreschi K, Röcken M, Schaller M, Lang F, Wieder T. The NFκB pathway inhibitors Bay 11–7082 and parthenolide induce programmed cell death in anucleated erythrocytes. *Cell Physiol Biochem*. 2011;27:45–54.
63. Gielen S, Landmesser U. A new look at HDL in coronary disease: can we escape natural history? *Heart*. 2011;97(23):1899–1901.
64. Groeneveld GJ, de Leeuw vanWeenen J, van Muiswinkel FL, Veldman H, Veldink JH, Wokke JH, Bar PR, van den Berg LH. Zinc amplifies mSOD1-mediated toxicity in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*. 2003;352:175–178.
65. Guidelines on diabetes, prediabetes, and cardiovascular disease: executive summary. The Task Force on Diabetes and Cardiovascular Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J*. 2007;28:88–136.
66. Gupta S, Sussman I, McArthur CS, Tornheim K, Cohen RA, Ruderman NB. Endothelium-dependent inhibition of Na(+)-K+ ATPase activity in rabbit aorta by hyperglycemia. Possible role of endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest*. 1992;90:727–732.
67. Gutt M, Davies CL, Spitzer SB, Llabre MM, Kumar M, Czarnecki EM, Schneidermann, Skyler JS, Marks JB. Validation of the insulin sensitivity index (ISI<sub>0,120</sub>): comparison with other measures. *Diab Res Clin Pract*. 2000;47:177–184.
68. Haller H. Postprandial glucose and vascular disease. *Diabet Med*. 1997;14 suppl 3:S50–56.
69. Halliwell B. Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry, and Role in Human Disease. *Am J Med*. 1991;91(Suppl.3C):14S–22S.
70. Hanley AJG, Williams K, Gonzalez C, D'Agostino Jr. RB, Wagenknecht LE, Stern MP, Haffner SM. Prediction of type 2 diabetes using simple measures of insulin resistance: combined results from the San Antonio Heart Study, the Mexico City Diabetes Study, and the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes*. 2003;52:463–469.

71. Harvey LJ, McArdle HJ. Biomarkers of copper status: a brief update. *Br J Nutr.* 2008;99:S10-S13.
72. Healy GN, Dunstan DW, Shaw JE, Zimmet PZ, Owen N. Beneficial associations of physical activity with 2-h but not fasting blood glucose in Australian Adults. *Diab Care.* 2006;29:2598–2604.
73. Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radic Med.* 2011;52:993–999.
74. Hernandez-Saavedra D, Zhou H, McCord JM. Anti-inflammatory properties of a chimeric recombinant superoxide dismutase: SOD2/3. *Biomed Pharmacother.* 2005;59:204–208.
75. Hinnouho GM, Czernichow S, Duqravot A, Batty GD, Kivimaki M, Singh-Manoux A. Metabolically healthy obesity and risk of mortality: Does the definition of the metabolic healthy matter? *Diab Care.* 2013; [Epub ahead of print]
76. Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene.* 2006;25:6706–6716.
77. Hu Y, Liu W, Chen Y, Zhang M, Wang L, Zhou H, Wu P, Teng X, Dong Y, Zhou Jw, Xu H, Zheng J, Li S, Tao T, Hu Y, Jia Y. Combined use of fasting plasma glucose and glycated hemoglobin A1c in the screening of diabetes and impaired glucose tolerance. *Acta Diabetol.* 2010;47:231–236.
78. Ichihara S. The pathological roles of environmental and redox stresses in cardiovascular diseases. *Environ Health Prev Med.* 2013;18:177–184.
79. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas, 5th edn.* Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2012. //http://www.idf.org/diabetesatlas.
80. Izumi M, McDonald MC, Sharpe MA, Chatterjee PK, Thiemermann C. Superoxide dismutase mimetics with catalase activity reduce the organ injury in hemorrhagic shock. *Shock.* 2002;18:230–235.
81. Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutase and their impact upon human health. *Mol Aspects Med.* 2005;26(4–5):340–352.
82. Joint Scientific Statement. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association, World Heart Federation, International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation.* 2009;120:1640–1645.
83. Kabanova S, Kleinbongard P, Volkmer J, Andrée B, Kelm M, Jax TW. Gene expression analysis of human red blood cells. *Int J Med Sci.* 2009;6:156–159.
84. Kantorski J, Zeman K. System tlenowego zabijania mikroorganizmów przez neutrofile. *Postępy Biologii Komórki.* 1990;17(4):361–377.
85. Kaplan M, Aviram M, Hayek T. Oxidative stress and macrophage foam cell formation during diabetes mellitus-induced atherogenesis: role of insulin therapy. *Pharmacol Ther.* 2012;136:175–185.

86. Karunakaran U, Park KG. A systematic review of oxidative stress and safety of antioxidants in diabetes: focus on islets and their defense. *Diabetes Metab J.* 2013;37:106–112.
87. Kasperczyk S, Przywara B, Kasperczyk A, Birkner E, Wodniecki J, Ostalowska A, Krauze-Wielicka M. Wpływ hiperglikemii na aktywność peroksydazy glutationowej i dysmutazy ponadtlenkowej u osób z świeżo rozpoznanymi zaburzeniami gospodarki węglowodanowej. *Wiad Lek.* 2002;55(5–6):270–275.
88. Kassi E, Dalamaga M, Hroussalas G, Kazanis K, Merantzi G, Zachari A, Giamarellos-Bourboulis EJ, Dionysiou-Asteriou A. Adipocyte factors, high-sensitive C-reactive protein levels and lipoxidative stress products in overweight postmenopausal women with normal and impaired OGTT. *Maturitas.* 2010;67:72–77.
89. Kim HK, Lee SK, Suh CJ, Yoon HJ, Lee KY, Park HY, Kang MH. Postchallenge hyperglycemia but not hyperinsulinemia is associated with angiographically documented coronary atherosclerosis in Korean subjects. *Diabetes Res Clin Pract.* 2003;59:129–136.
90. Kim YH, Park KH, Rho HM. Transcriptional activation of the Cu,Zn-superoxide dismutase gene through the AP2 site by ginsenoside Rb2 extracted from a medicinal plant, *Panax ginseng*. *J Biol Chem.* 1996;271:24539–24543.
91. Kinoyama M, Nitta H, Hara S, Watanabe A, Shirao K. Blood superoxide dismutase (SOD) decrease following oral administration of plant SOD to healthy subjects. *J Health Science.* 2007;53:608–614.
92. Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T, Kumara I, Gharini P, Kabanova S, Ozüyan B, Schnürch HG, Gödecke A, Weber AA, Robenek M, Robenek H, Bloch W, Rösen P, Kelm M. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood.* 2006;107:2943–2951.
93. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM. Diabetes Prevention Program Research Group: Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med.* 2002;346:393–403.
94. Konukoglu D, Dogan E, Turhan MS, Husrev Hatemi H. Impaired glucose tolerance: its relevance to early endothelial dysfunction. *Horm Metab Res.* 2003;35:607–610.
95. Kumawat M, Sharma TK, Singh N, Ghalaut VS, Vardey SK, Sinha M, Kaushik GG. Study of changes in antioxidant enzymes in diabetic postmenopausal group of women suffering from cardiovascular complications. *Clin Lab.* 2012;58:203–207.
96. Lü Q, Tong N, Liu Y, Li N, Tang X, Zhao J, Cao H, Li D, Gou L, Zhang Y, Wan J, Jiang L. Community-based population data indicates the significant alterations of insulin resistance, chronic inflammation and urine ACR in IFG combined IGT group among prediabetic population. *Diab Res Clin Pract.* 2009;84:319–324.
97. Ma SW, Tomlinson B, Benzie IFF. A study of the effect of oral glucose loading on plasma oxidant:antioxidant balance in normal subject. *Eur J Nutr.* 2005;44:250–254.
98. Madamanchi NR, Runge MS. Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free Radic Biol Med.* 2013;61C:473–501.



99. Maiorino M, Coassini M, Roveri A, Ursini F. Mikrosomal lipid peroxidation: effect of vitamin E and its functional interaction with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Lipids*. 1989;24:721–726.
100. Makita S, Matsui H, Naganuma Y, Abiko A, Tamada M, Nakamura M. Diabetic state as a crucial factor for impaired arterial elastic properties in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis*. 2010;208:167–170.
101. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003;17:24–38.
102. Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982;79:7634–7638.
103. Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 1999;22:1462–1470.
104. McCance DR, Hanson RL, Pettitt DJ, Bennett PH, Hadden DR, Knowler WC. Diagnosing diabetes mellitus; do we need new criteria? *Diabetologia*. 1997;40:247–255.
105. McCord JM. Iron- and manganese-containing superoxide dismutase: structure, distribution, and evolutionary relationships. *Adv Exp Med Biol*. 1976;74:540–550.
106. McCord JM, Edeas MA. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomed Pharmacother*. 2005;59:139–142.
107. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969;244:6049–6055.
108. McIlwain, Silverfield JC, Cheatum DE, Poiley J, Taborn J, Ignaczak T. Mults CV. Intra-articular orgotein in osteoarthritis of the knee: a placebo-controlled efficacy, safety, and dosage comparison. *Am J Med*. 1989;87:295–300.
109. Meyer C, Pimenta W, Woerle HJ, Van Haeften T, Szoke E, Mitrakou A, Gerich J. Different mechanisms for impaired fasting glucose and impaired postprandial glucose tolerance in humans. *Diabetes Care*. 2006;29:1909–1914.
110. Mezzetti A, Cipollone F, Cucurullo F. Oxidative stress and cardiovascular complications in diabetes: isoprostanes as new markers on an old paradigm. *Cardiovasc Res*. 2000;47:475–488.
111. Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med*. 2009;47:344–356.
112. Milani P, Gagliardi S, Cova E, Cereda C. SOD1 transcriptional and posttranscriptional regulation and its potential implications in ALS. *Neurol Res Int*. 2011;2011:458427. doi: 10.1155/2011/458427.
113. Minc E, de Coppet P, Masson P, Thiery L, Dutertre S, Amor-Gueret M, Jaulin C. The human copper-zinc superoxide dismutase gene (SOD1) proximal promoter is regulated by Sp1, Egr-1, and WT1 via non-canonical binding sites. *J Biol Chem*. 1999;274:503–509.
114. Miyazaki T, Shimada K, Iwama Y, Kume A, Sumiyoshi K, Sato Y, Ohmura H, Watanabe Y, Mokuno H, Daida H. Insulin response to oral glucose load is associated

- with coronary artery disease in subjects with normal glucose tolerance. *J Atheroscler Thromb.* 2008;15:6–12.
115. Moczko JA, Bręborowicz GH. Nie samą biostatystyką.... Ośrodek Wydawnictw Naukowych. Poznań 2010,155–161.
  116. Moss JM, Mulholland HB. Diabetes and pregnancy: with special reference to the prediabetic state. *Ann intern Med.* 1951; 34:678–691.
  117. Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med.* 2007;43:477–503.
  118. Mumbengegwi DR, Li Q, Li C, Bear CE, Engelhardt JF. Evidence for a superoxide permeability pathway in endosomal membranes. *Mol Cell Biol.* 2008;28: 3700–3712.
  119. Muniyappa R, Lee S, Chen H, Quon MJ. Current approaches for assessing insulin sensitivity and insulin resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;294:E15–E26.
  120. Ng TB, Gao W, Li L, Niu SM, Zhao L, Liu J, Shi LS, Fu M, Liu F. Rose (*Rosa rugosa*)-flower extract increases the activities of antioxidant enzymes and their gene expression and reduces lipid peroxidation. *Biochem Cell Biol.* 2005;83:78–85.
  121. Oates N, Pamphlett R. An epigenetic analysis of SOD1 and VEGF in ALS. *Amyotroph Lateral Scler.* 2007;8:83–86.
  122. Okhawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95:351–358.
  123. Ozata M, Mergen M, Oktenli C, Aydin A, Sanisoglu SY, Bolu E, Yilmaz MI, Sayal A, Isimer A, Ozdemir IC. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. *Clin Biochem.* 2002;35:627–631.
  124. Park EY, Rho HM. The transcriptional activation of the human copper/zinc superoxide dismutase gene by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin through two different regulator sites, the antioxidant responsive element and xenobiotic responsive element. *Mol Cell Biochem.* 2002;240:47–55.
  125. Perreault L, Bergman BC, Playdon MC, Dalla Man C, Cobelli C, Eckel RH. Impaired fasting glucose with or without impaired glucose tolerance: progressive or parallel state of prediabetes? *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295:E428–E435.
  126. Perry JJP, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1804:245–262.
  127. Pi J, Bai Y, Zhang Q, Wong V, Floering LM, Daniel K, Reece JM, Deeney JT, Anderson ME, Corkey BE, Collins S. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes.* 2007;56:1783–1791.
  128. Pong K, Rong Y, Doctrow SR, Baudry M. Attenuation of zinc-induced intracellular dysfunction and neurotoxicity by a synthetic superoxide dismutase/catalase mimetic, in cultured cortical neurons. *Brain Res.* 2002;950:218–230.
  129. Ray KK, Seshasai SR, Wijesuriya S, Sivakumaran R, Nethercott S, Preiss D, Erqou S, Sattar N. Effect of intensive control of glucose on cardiovascular outcomes and death

- in patients with diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Lancet* 2009;373:1765–1772.
130. Roberts BR, Tainer JA, Getzoff ED, Malencik DA, Anderson SR, Bomben VC, Meyers KR, Karplus PA, Beckman JS. Structural characterization of zinc-deficient human superoxide dismutase and implications for ALS. *J Mol Biol.* 2007;373:877–890.
  131. Rojo AI, Salinas M, Martin D, Perona R, Cuadrado A. Regulation of Cu/Zn-superoxide dismutase expression via the phosphatidylinositol 3 kinase/akt pathway and nuclear factor- $\kappa$ B. *J Neurosci.* 2004;24:7324–7334.
  132. Sakaruba H, Mizukami H, Yagihashi N, Wada R, Hanyu C, Yagihashi S. Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese type II diabetic patients. *Diabetologia.* 2002;45:85–96.
  133. Sanclemente G, Garcia JJ, Zuleta JJ, Diehl C, Correa C, Falabella R. A double-blind, randomized trial of 0.05% betamethasone vs. topical catalase/dismutase superoxide in vitiligo. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 2008;22:1359–1364.
  134. Satoh H, Terada H, Uehara A, Katoh H, Matsunaga M, Yamazaki K, Matoh F, Hayashi H. Post-challenge hyperinsulinaemia rather than hyperglycaemia is associated with the severity of coronary artery disease in patients without a previous diagnosis of diabetes mellitus. *Heart.* 2005;92:731–736.
  135. Seo SJ, Kim HT, Cho G, Rho HM, Jung G. Sp1 and C/EBP-related factors regulate the transcription of human Cu/Zn SOD gene. *Gene.* 1996;178:177–185.
  136. Seo SM, Choo EH, Koh YS, Park MW, Shin DI, Choi YS, Park HJ, Kim DB, Her SH, Lee JM, Park CS, Kim PJ, Moon KW, Chang K, Kim HY, Yoo KD, Jeon DS, Chung WS, Park YG, Seung KB; High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of clinical outcomes in patients achieving low-density lipoprotein cholesterol targets with statins after percutaneous coronary intervention. *Heart.* 2011;97:1943–1950.
  137. Serin O, Konukoglu D, Firtina S, Mavis O. Serum oxidized low density lipoprotein, paraoxonase I and lipid peroxidation levels during oral glucose tolerance test. *Horm Metab Res.* 2007;39:207–211.
  138. Shimmura S, Igarashi R, Yaguchi H, Ohashi Y, Shimazaki J, Tsubota K. Lecithin-bound superoxide dismutase in the treatment of noninfectious corneal ulcers. *Am J Ophthalmol* 2003;135:613–619.
  139. Shin JY, Lee HR, Lee DC. Increased arterial stiffness in healthy subjects with high-normal glucose levels and in subjects with prediabetes. *Cardiovasc Diabet.* 2011;10:30 doi: 10.1186/1475–2840–10–30.
  140. Sieradzki J. red. Cukrzyca. Tom I. Wyd. I. Via Medica, Gdańsk 2006,16.
  141. Sieradzki J. red. Cukrzyca. Tom I. Wyd. I. Via Medica, Gdańsk 2006,247–253.
  142. Singleton JR, Smith AG, Bromberg MB. Increased prevalence of impaired glucose tolerance in patients with painful sensory neuropathy. *Diabetes Care* 2001;24:1448–1453.
  143. Smith AG, Singleton JR. The diagnostic field of a standardized approach to idiopathic sensory-predominant neuropathy. *Arch Intern Med* 2004;164:1021–1025.

144. Song F, Jia W, Yao Y, Hu Y, Lei L, Lin J, Sun X, Liu L. Oxidative stress, antioxidant status and DNA damage in patients with impaired glucose regulation and newly diagnosed Type 2 diabetes. *Clin Sci*. 2007;112:599–606.
145. Stahl W, Sies H. Antioxidant defence: vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes*, 1997;46(Suppl.2):14–18.
146. Standl E, Schnell O, Ceriello A. Postprandial hyperglycemia and glycemic variability. Should we care? *Diabetes Care*. 2011;34:S120–S127.
147. Stanisław A. *Przystępny kurs statystyki w oparciu o program STATISTICA PL na przykładach z medycyny*. StatSoft Wydanie 1, 1998, 205.
148. Su Y, Liu XM, Jin HB, Fu R, Wang YY, Wu Y, Luan Y. The relationship between endothelial dysfunction and oxidative stress in diabetes and prediabetes. *Int J Clin Pract*. 2008;62:877–82.
149. Sumner C, Seth S, Griffin J et al. The spectrum of neuropathy in diabetes and impaired glucose tolerance. *Neurology* 2003;60:108–111.
150. Szurkowska M, Szafraniec K, Gilis-Januszewska A, Szybiński Z, Huszno B. Wskaźniki insulinooporności w badaniu populacyjnym i ich wartość predykcyjna w określaniu zespołu metabolicznego. *Przegl Epidemiol*. 2005;59:743–751.
151. Tang C, Han P, Oprea AI, Lee S.C., Gyulhandanyan AV, Chan GN, Wheeler MB, Giacca A. Evidence for a role of superoxide generation in glucose-induced beta-cell dysfunction in vivo. *Diabetes* 2007;56:2722–2731.
152. The Diabetes Prevention Program Research Group. The Diabetes Prevention Program: baseline characteristics of the randomized cohort. *Diabetes Care*. 2000;23:1619–1629.
153. Torliński L, Zowczak-Drabarczyk M, Wysocka E. Znaczenie patobiochemii i medycyny laboratoryjnej w nowoczesnej diagnostyce różnicowej zakażeń bakteryjnych i wirusowych. W: J. Cianciara, J. Juszczyk (red.). *Choroby zakaźne i pasożytnicze*. Wydawnictwo Czelej, Lublin 2007;81–82.
154. Tönjes A, Fasshauer M, Kratzsch J, Stumvoll M, Blüher M. Adipokine pattern in subjects with impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance in comparison to normal glucose tolerance and diabetes. *PLoS One*. 2010;5:e13911. doi: 10.1371.
155. Tschritter O, Fritsche A, Thamer C, Haap M, Shirkavand F, Rahe S, Staiger H, Marker E, Häring H, Stumvoll M. Plasma adiponectin concentrations predict insulin sensitivity of both glucose and lipid metabolism. *Diabetes*. 2003;52:239–243.
156. Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med*. 2001;344:1343–1350.
157. Tyrberg M, Melander A, Lövestam-Adrian M, Lindblad U. Retinopathy in subjects with impaired fasting glucose: the NANSY-Eye baseline report. *Diabetes Obes Metab*. 2008; 10:646–651.

158. UK Prospective Diabetes Study Group; Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional therapy and risk of complications in patients with type 2 diabetes mellitus (ukpds 33). *Lancet*. 1998;352: 837–853.
159. Umemoto S, Tanaka M, Kawahara S, Kubo M, Umiej K, Hashimoto R, Matsuzaki M. Calcium antagonist reduces oxidative stress by upregulating Cu/Zn superoxide dismutase in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2004;27:877–885.
160. Valentine JS, Doucette PA, Zittin Potter S. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:563–593.
161. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39:44–48.
162. Wang L, Guo L, Zhang L, Zhou Y, He Q, Zhang Z, Wang M. Effects of glucose load and nateglinide intervention on endothelial function and oxidative stress. *J Diabetes Res*. 2013;2013:849295. doi: 10.1155/2013/849295.
163. WHO Second Report of the WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus. WHO Tech Rep. Ser.646. WHO, Geneva 1980.
164. WHO: Diabetes mellitus. Report of a WHO Study Group. WHO Tech Rep. Ser.727. WHO, Geneva 1985.
165. WHO: Definition. Diagnosis and classification of Diabetes mellitus and its complications. Raport of a WHO consultation. Part 1. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report no.99.2. WHO, Geneva 1999.
166. WHO: Definition and diagnosis if diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: Report of a WHO/IDF Consultation. NLM classification: WK 810. WHO, Geneva 2006.
167. WHO. Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus. Abbreviated Report of a WHO Consultation. WHO/NMH/CHP/CPM/11.1. WHO, Geneva 2011.
168. Wilcox KC, Zhou L, Jordon JK, Huang Y, Yu Y, Redler RL, Chen X, Caplow M, Dokholyan NV. Modifications of Superoxide Dismutase (SOD1) in Human Erythrocytes. *J Biol Chem*. 2009;285:13940–13947.
169. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielenski J, Mastronardi F, Maezawa Y, Drucker DJ, Engleman E, Winer D, Dosch HM. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med* 2009;15:921–929.
170. Wong PC, Waggoner D, Subramaniam JR, Tessarollo L, Bartnikas TB, Culotta VC, Price DL, Rothstein J, Gitlin JD. Copper chaperone for superoxide dismutase is essential to activate mammalian Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:2886–2891.

171. Wysocka E, Cymerys M, Mielcarz G, Bryl W, Dzięgielewska S, Torliński L. The way of serum chromium utilization may contribute to cardiovascular risk factors in centrally obese persons. *Arch Med Sci.* 2011;7:257–263.
172. Wysocka E, Cofta S, Piorunek T, Dzięgielewska-Gęsiak S, Bryl W, Torliński L. Blood antioxidant status, dysglycaemia and obstructive sleep apnea. *Adv Exp Med Biol.* 2013;756:121–129.
173. Yano Y, Sato Y, Fujimoto S, Konta T, Iseki K, Moriyama T, Yamagata K, Tsuruya K, Yoshida H, Asahi K, Kurahashi I, Ohashi Y, Watanabe T. Association of high pulse pressure with proteinuria in subjects with diabetes, prediabetes, or normal glucose tolerance in a large Japanese general population sample. *Diabetes Care.* 2012;35:1310–1315.
174. Yilmaz G, Yilmaz FM, Aral Y, Yucel D. *J Clin Lab Anal.* 2007;21:260–264.
175. Yoo HY, Chang MS, Rho HM. Induction of the rat Cu/Zn superoxide dismutase gene through the peroxisome proliferator-responsive element by arachidonic acid. *Gene.* 1999;234:87–91.
176. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2011. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. *Diabetologia Praktyczna.* 2011;12(suppl.A): A1-A46.
177. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2013. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. *Diabetologia Kliniczna.* 2013;2(supl.A)
178. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Rad Biol Med.* 2002;33:337–349.
179. Zhang HJ, Doctrow SR, Xu L, Oberley LW, Beecher B, Morrison J, Oberley TD, Kregel KC. Redox modulation of the liver with chronic antioxidant enzyme mimetic treatment prevents age-related oxidative damage associated with environmental stress. *FASEB J.* 2004;18:1547–1549.

## 8. Streszczenie

Narastający w świecie problem otyłości i związana z tym epidemia cukrzycy typu 2 (T2DM) oraz powikłań sercowo-naczyniowych (ChSN), wymusza podejmowanie konkretnych działań prewencyjnych. Priorytetem jest wczesne rozpoznawanie T2DM m.in. stosując test doustnego obciążenia glukozą (OGTT), interpretacja którego pozwala rozpoznawać prawidłową tolerancję glukozy (NGT), stan przedcukrzycowy (*prediabetes*) bądź cukrzycę. *Prediabetes* może charakteryzować się jedynie zaburzeniami glikemii na czczo (kategoria IFG – nieprawidłowa glikemia na czczo) lub manifestować się zaburzeniami poposiłkowymi (upośledzona tolerancja glukozy, IGT). Insulinooporność jest kluczowym czynnikiem patogenetycznym w rozwoju dysglikemii u osób otyłych. W rzeczywistości nie znamy w pełni mechanizmów konwersji normoglikemii do dysglikemii, a następnie progresji *prediabetes* do T2DM. Stany zwiększonego ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2 stanowią okres poprzedzający wystąpienie T2DM, ale jednocześnie mogą rozpoczynać rozwój przewlekłych powikłań, np. pod postacią neuropatii i angiopatii. W patobiochemii przewlekłych powikłań cukrzycy, zwłaszcza w makroangiopatii, stres oksydacyjny (SO) jest uznany za mechanizm łączący pozostałe elementy miażdżycy.

Cele pracy były następujące:

- Ocena markerów SO we krwi osób tworzących (populacyjny) model narastającego ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2, z wykorzystaniem idei testu doustnego obciążenia glukozą dla oceny dynamiki zmian parametrów.
- Analiza współdziałania elementów wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej obrony antyoksydacyjnej w prewencji stresu oksydacyjnego w stworzonym modelu badawczym.
- Badanie wpływu ocenionych czynników ryzyka ChSN na parametry SO w badanej populacji.
- Ocena wartości diagnostycznej wskaźników insulinooporności (IR)/insulinowrażliwości (IS) oraz parametrów SO, w różnicowaniu stanu zwiększonego ryzyka rozwoju T2DM.

Badaniami objęto osoby z grupy zwiększonego ryzyka wystąpienia cukrzycy typu 2, kobiety i mężczyźni pochodzenia kaukaskiego, w wieku od 30 do 63 lat. Przeprowadzono kompleksowe badanie kliniczne i wykluczono osoby palące, stosujące specjalne diety, farmakoterapię oraz pacjentów ze schorzeniami ostrymi lub przewlekłymi (m.in. choroba niedokrwienna serca, udar mózgu, przewlekłe choroby zapalne np. choroby nerek i wątroby, choroby autoimmunologiczne, nadczynności i niedoczynności gruczołów dokrewnych), które to czynniki mo-

głyby wpływać na metabolizm, w tym na równowagę oksydanty–antyoksydanty lub modyfikować odpowiedź immunologiczną ustroju. Po przeprowadzeniu wstępnych badań, w tym ocenie parametrów wydolności wątroby i nerek w surowicy, badania ogólnego moczu, morfologii krwi obwodowej i hsCRP, do dalszych etapów zakwalifikowano osoby z glikemią < 126 mg/dl, bez patologicznych wyników ww. analiz laboratoryjnych.

Na podstawie wskaźnika BMI i wyników OGTT, uwzględniając osoby prezentujące stężenie hsCRP w surowicy < 8 mg/l, populację badaną (n = 140) podzielono na grupy osób, o zbliżonym rozkładzie wieku i parametrów antropometrycznych, które cechowała:

- Grupa 1 – prawidłowa tolerancja glukozy (NGT) i prawidłowe BMI 19–24,9 kg/m<sup>2</sup> (n = 24),
  - Grupa 2 – NGT i nadwaga (BMI 25,0 – 29,9 kg/m<sup>2</sup>) (n = 24),
  - Grupa 3 – NGT i otyłość (BMI 30,0–39,9 kg/m<sup>2</sup>) (n = 24),
  - Grupa 4 – nieprawidłowa glikemia na czczo (IFG) i nadwaga/otyłość (n = 22),
  - Grupa 5 – nieprawidłowa tolerancja glukozy (IGT) i nadwaga/otyłość (n = 24),
  - Grupa 6 – świeżo rozpoznana cukrzyca typu 2 i nadwaga/otyłość (n=22),
- tworząc w ten sposób model badawczy narastającego ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2.

W trakcie testu doustnego obciążenia glukozą, w 0. i 120. min, oceniono:

- glikemię i insulinemię oraz wyliczono HOMA-IR i wskaźniki dynamiczne IS,
- stężenie produktów peroksydacji lipidów w osoczu (TBARS), stężenie całkowitej aktywności antyoksydacyjnej osocza (TAS) i aktywność cytoplazmatycznej dysmutazy ponadtlenkowej SOD-1 w erytrocytach (SOD),
- ekspresję genu kodującego SOD-1 (xSOD) w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej, metodą PCR w czasie rzeczywistym.

Zaproponowano indeks  $R_{75}$  dla oceny odpowiedzi organizmu na bodziec 75,0 g glukozy w zakresie ocenianego parametru. Pozostałe parametry oceniano jedynie na czczo.

Badane osoby nie różniły się między sobą wiekiem. Konsekwencją założeń pracy były różnice w obwodzie talii, wartości glikemii, HbA1c i wskaźników IS-IR. Porównanie kliniczno-metaboliczne osób między kolejnymi grupami od 1 do 6, pokazuje systematyczne gromadzenie czynników ryzyka miażdżycy, choć z różną intensywnością w zależności od analizowanego parametru.

Wykazano podobieństwo metaboliczne między otyłymi normoglikemicznymi osobami (grupa 3) i osobami w stanie przedcukrzycowym (grupy 4 i 5).

Po raz pierwszy dla populacji polskiej wykazano, że spośród ocenianych parametrów IS-IR jedynie zmiana wskaźnika  $ISI_{0,120}$  (indeks Gutt) różnicuje każdy etap zwiększania ryzyka T2DM, przy czym największe znaczenie diagnostyczne wykazano przy porównaniu osób z nadwagą i otyłością (grupy 2 i 3) z osobami ze stanem przedcukrzycowym (grupy 4 i 5).



Wyniki badania SOD sugerują narastanie aktywności podstawowej SOD wraz ze zwiększaniem BMI, z kulminacją w grupie IGT (grupa 5). Towarzyszy temu obniżanie przyrostu aktywności SOD w odpowiedzi na bodziec glukozy (SOD-R<sub>75</sub>), począwszy od przejścia stanu nadwagi w otyłość, poprzez *prediabetes* aż do rozwoju T2DM. Ocena xSOD wskazuje na to, że kilkukrotne zwiększenie ekspresji genu dla SOD-1 w odpowiedzi na 75 g glukozy może charakteryzować prawidłowy metabolizm człowieka (obserwacja w grupach 1 i 2). Wraz ze zwiększaniem BMI i rozwojem zaburzeń glikemii, zdolność do nasilania ekspresji w trakcie OGTT ulegała osłabieniu. Stwierdzona równoległość zmian ekspresji xSOD w PBMC i aktywności SOD w erytrocytach – w dwóch różnych liniach komórkowych - promuje ocenę aktywności enzymu jako parametru odzwierciedlającego wewnątrzkomórkowy potencjał antyoksydacyjny w sytuacji zwiększonego ryzyka T2DM.

Podstawowe stężenie TAS zwiększało się systematycznie wraz ze zwiększaniem BMI, aż do wystąpienia hiperglikemii przedcukrzycowej, głównie IFG. Indeks zmiany TAS-R<sub>75</sub>, porównywalny w grupach 1 i 2, ulegał fluktuacji w grupach 3 i 4, a następnie zmniejszaniu od grupy 4 do grupy 6. Stężenia TBARS, porównywalne u osób z grup 1 i 2, uległy zwiększeniu w grupach 3, 4, 5 i 6. Względnie stabilny TBARS-R<sub>75</sub> w grupach 1–5, uległ zwiększeniu w grupie T2DM (grupa 6), zwłaszcza w porównaniu z grupami 1 i 2. Wskaźnik równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej osocza w trakcie OGTT (TAS-R<sub>75</sub>/TBARS-R<sub>75</sub>), porównywalny w grupach 1, 2 i 4, uległ obniżeniu w grupach 3, 5 i 6.

Wzajemne korelacje parametrów SO u normoglikemicznych osób z nadmierną masą ciała mogą stanowić metaboliczną charakterystykę tych grup, niezbędną do uniknięcia przejścia w stan przedcukrzycowy, np. odwrotna korelacja TAS-0' & TBARS-0' obserwowana jedynie w grupie 2 i 3. W kolejnych analizach statystycznych zwraca uwagę mnogość korelacji w grupie 2, z istotnymi niezależnymi związkami między aktywnością i ekspresją SOD a G-120' i HbA1c, co sugeruje, że u osób z nadwagą utrzymanie prawidłowej tolerancji glukozy może zależeć od sprawności dysmutazy ponadtlenkowej.

U osób w stanie przedcukrzycowym, podobnych pod względem parametrów węglowodanowo-lipidowych i prozapalnych, stwierdzono odmienne związki czynników ryzyka ChSN z markerami stresu oksydacyjnego w grupie IFG i grupie IGT.

Na podstawie powyższych analiz można stwierdzić, że ocena dynamiki zmian parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej we krwi, w trakcie OGTT, w zaproponowanym modelu obejmującym 6 grup osób z narastającym BMI (trzy grupy) i kategoriami dysglikemii (kolejne trzy grupy), odkrywa sekwencje zdarzeń w patobiochemii stanów przedcukrzycowych.

Bodziec 75 g glukozy ma istotny wpływ na aktywność enzymu SOD-1 i ekspresję genu dla SOD-1 w trakcie OGTT. Wzrost aktywności i ekspresji SOD-1

obserwowany w trakcie OGTT u osób normoglikemicznych z prawidłową masą ciała i nadwagą, może zabezpieczać równowagę oksydacyjno-antyoksydacyjną w przypadku krótkotrwałego wzrostu stężenia glukozy we krwi.

Osoby otyłe, nawet w warunkach normoglikemii, w przedstawionym modelu prezentują wykładniki stresu metabolicznego zbliżone do osób z dysglikemią. Grupy osób z dysglikemią prezentują nasilający się obraz stresu oksydacyjnego, z odmiennym udziałem wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego potencjału antyoksydacyjnego.

Mechanizmy insulinooporności są odpowiedzialne za pogłębianie zaburzeń metabolicznych wraz ze zwiększaniem ryzyka cukrzycy typu 2. Stres oksydacyjny jest odpowiedzialny za konwersję stanu przedcukrzycowego do cukrzycy.

Test doustnego obciążenia glukozą, może być wykorzystany w grupie osób ze zwiększonym ryzykiem rozwoju cukrzycy typu 2, do oceny osobniczej podatności na stres oksydacyjny.

## 9. Summary

The growing global obesity problem along with associated epidemic of type 2 diabetes (T2DM) and increasing risk of cardiovascular disease (CVD), forces to undertake the specific preventive management. Priority is given to early detection of diabetes i.e. using the oral glucose tolerance test (OGTT), which can identify the normal glucose tolerance (NGT), prediabetes or diabetes mellitus. Prediabetes can be manifested as impaired fasting glucose (IFG) or as postprandial disturbances (impaired glucose tolerance, IGT). Insulin resistance is a key pathogenic factor in the development of obesity-related dysglycaemia. In fact, we do not know all the mechanisms of conversion from NGT to dysglycaemia and mechanisms of progression from prediabetes to T2DM. Categories of increased risk for diabetes precede the occurrence of T2DM and may initiate the development of chronic diabetic complications, like neuropathy and angiopathy. Discussing pathobiochemistry of late diabetic complications, oxidative stress (OS) is considered to join other components of atherosclerosis.

The aim of the study was:

- to evaluate some markers of oxidative stress in the blood of patients who make a (population-based) model of increasing risk of type 2 diabetes, using the idea of oral glucose tolerance test,
- to analyze the cooperation between intra- and extracellular antioxidant defense in the prevention of oxidative stress in the study model created,
- to assess the impact of cardiovascular risk factors on oxidative stress markers in the study population,
- to evaluate the diagnostic value of insulin resistance and insulin sensitivity indices as well as oxidative stress parameters in the differentiation of an increased risk of T2DM.

The study included individuals at increased risk of type 2 diabetes, male and female Caucasians, aged 30 to 63 years. Complex clinical assessment was performed and those who smoke, use special diet or treatment as well as subjects with acute or chronic disorders i.e. coronary heart disease, stroke, chronic inflammatory diseases, kidney and liver diseases, autoimmune diseases, endocrinopathies, were excluded from the study to avoid factors which could influence oxidant-antioxidant balance or modify immunity.

After initial testing, including liver and kidney function tests, routine urinalysis, complete blood count and high sensitivity C-reactive protein (hsCRP), patients with the results of above parameters indicating no pathology and with

fasting plasma glucose concentration < 126 mg/dL, were qualified to the next step of the study.

Based on BMI and results of 75 g OGTT the study population (n = 140) composed of similar-age subjects with hsCRP < 8 mg/L was divided into following groups:

- Group 1 - normal glucose tolerance (NGT) and normal body mass index (BMI 19–24,9 kg/m<sup>2</sup>), n = 24,
- Group 2 - NGT and overweight (BMI 25,0–29,9 kg/m<sup>2</sup>), n = 24,
- Group 3 - NGT and obesity (BMI 30,0–39,9 kg/m<sup>2</sup>), n = 24,
- Group 4 - Impaired Fasting Glycemia (IFG) and overweight/obesity, n = 22,
- Group 5 - Impaired Glucose Tolerance (IGT) and overweight/obesity, n = 24,
- Group 6 - newly diagnosed type 2 diabetes and overweight/obesity, n = 22.

In this way a research model of increasing risk of type 2 diabetes was created.

During oral glucose tolerance test (0 and 120 minute) the concentrations of plasma glucose, lipid peroxides as thiobarbituric reacting substances (TBARS), total antioxidant status (TAS) and serum insulin, as well as activity of superoxide dismutase-1 in erythrocytes (SOD) and expression of gene for superoxide dismutase-1 in peripheral blood mononuclear cells (xSOD) using real time-PCR, were all measured. Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) and insulin sensitivity indices derived from dynamic tests were calculated. Plasma lipids, HbA1c in blood and serum hsCRP were measured fasting only.

Index  $R_{75}$  was proposed to assess the body response to the stimulus of 75 g glucose, according to the parameters evaluated.

The study subjects did not differ in a context of their age. Patients differed in their waist circumference, concentrations of glucose, HbA1c levels, and insulin sensitivity-resistance (IS-IR) indices, due to background of the study. The comparison of clinical and metabolic parameters among the study groups (1–6) showed the systematic collection of risk factors for atherosclerosis, however with a different intensity for particular parameter. Similarity between obese people with NGT (group 3) and those in prediabetes (groups 4 and 5) was demonstrated.

For the first time a special diagnostic meaning of Gutt index, among different IS-IR indices evaluated in Polish population, has been reported. Gutt index differentiated each step of increasing risk for T2DM comparing excessive body mass subjects (groups 2 and 3) and prediabetic individuals (groups 4 and 5).

The investigation on SOD suggested increasing activity of SOD at 0. min of OGTT, parallel with increasing BMI, with highest levels in IGT subjects (group 5). This is accompanied by lowering of the increase of SOD activity in response to 75 g glucose, started from overweight through prediabetes up to T2DM. Several-fold increase in gene expression of SOD-1 in response to 75 g glucose may be characteristic for normal human metabolism (the observation in groups 1 and 2). Along with increasing BMI and increasing glucose disturbances, the ability to ele-

vate gene expression during OGTT was decreased. The parallel changes of gene expression (xSOD) and SOD activity were found in two different lines of cells (WBC and RBC). That observation promotes SOD activity as a parameter reflecting intracellular antioxidant capacity in patients with increased risk of T2DM.

The basic plasma TAS concentrations increased steadily with increasing BMI up to the prediabetic hyperglycemia, IFG especially. Index TAS-R<sub>75</sub> was similar in groups 1 and 2, and undergo fluctuations in groups 3 and 4, then the reduction from group 4 to group 6.

The concentrations of TBARS, comparable to those with the group 1 and 2, were increased in groups 3, 4, 5 and 6. Relatively stable TBARS-R<sub>75</sub> in groups 1–5, has increased in group 6 of diabetic patients. An index of oxidant-antioxidant balance during OGTT (TAS-R<sub>75</sub>/TBARS-R<sub>75</sub>), comparable in the groups 1, 2 and 4, was reduced in groups 3, 5 and 6.

The mutual correlation of OS markers found in NGT patients with increased body mass, can indicate a metabolic characteristics of these groups, to avoid transition to prediabetes. Subsequent statistical analysis, correlations in group 2 especially (SOD-0 & G-120; SOD-0' & HbA1c), pointed to the efficacy of SOD to maintain NGT in overweight subjects.

Different relationships between cardiovascular risk factors and markers of OS were found in IFG and IGT individuals, while these groups were similar in a context of carbohydrate and lipid metabolism, and pro-inflammatory markers.

Based on the above analysis, it could be concluded that the evaluation of the dynamic changes of OS markers in blood during OGTT, in the research model, discovers sequences in pathobiochemistry of prediabetes.

75 g stimulus influences activity and expression of erythrocyte SOD-1 during oral glucose tolerance test.

An increase of SOD expression and activity during OGTT, in NGT/normal-BMI and NGT/overweigh subjects, may protect oxidative-antioxidant balance in the short-term increase in blood glucose concentrations.

Obese but normal glucose tolerance individuals, were determined with the values of the investigated markers of the metabolic stress similar to dysglycaemia subjects.

Dysglycemic individuals represent the increasing oxidative stress with different participation of intra- and extracellular antioxidant capacity.

The mechanisms of insulin resistance are responsible for enhancing the metabolic disorders with an increased risk for type 2 diabetes, before the diagnosis of T2DM is made. The oxidative stress is responsible for the conversion of prediabetes to diabetes.

Oral glucose tolerance test may be used in patients with an increased risk of type 2 diabetes, for the assessment of individual susceptibility to oxidative stress.

