

**UNIwersytet Jagielloński
Collegium Medicum**

ANNA SKALSKA

**AKTYWNOŚĆ WYBRANYCH ENZYMOW ANTYOKSYDACYJNYCH
ORAZ STĘŻENIA: SELENU, MIEDZI, CYNKU I ŻELAZA
W ERYTROCYTACH ORAZ W OSOCZU LUDZI W WIEKU PODESZŁYM.**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych wykonana w Klinice Geriatrii Katedry Gerontologii i Medycyny Rodzinnej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

PROMOTOR: PROF. DR HAB. MED. JÓZEF KOCEMBA

Bibl. Medyczna CM UJ



1816095188

KRAKÓW 1997

Spis treści:

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | Wstęp..... | 4 |
| 1.1. | Proces starzenia w świetle teorii wolnorodnikowej | 4 |
| 1.2. | Wolne rodniki tlenowe - ich źródła i efekty działania..... | 5 |
| 1.2.1. | Reaktywne formy tlenu a mitochondrialny DNA..... | 7 |
| 1.2.2. | Reaktywne formy tlenu a białka..... | 8 |
| 1.2.3. | Reaktywne formy tlenu a lipidy | 9 |
| 1.3. | Antyoksydacyjne mechanizmy obronne | 10 |
| 1.3.1. | Rodzaje obrony | 10 |
| 1.3.2. | Dysmutazy ponadtlenkowe..... | 12 |
| 1.3.3. | Katalaza..... | 13 |
| 1.3.4. | Peroksydaza glutationowa..... | 13 |
| 1.4. | Metale jako prooksydanty i antyoksydanty..... | 15 |
| 2. | Założenia i cel pracy..... | 18 |
| 3. | Materiał i metodyka | 20 |
| 3.1. | Osoby badane | 20 |
| 3.2. | Metodyka badań biochemicznych..... | 21 |
| 3.2.1. | Przygotowanie materiału do badań..... | 21 |
| 3.2.2. | Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej..... | 22 |
| 3.2.3. | Oznaczanie aktywności katalazy..... | 24 |
| 3.2.4. | Oznaczanie aktywności peroksydazy glutationowej..... | 24 |
| 3.2.5. | Oznaczanie stężenia selenu w erytrocytach i osoczu | 26 |
| 3.2.6. | Oznaczanie stężenia żelaza w osoczu | 27 |
| 3.2.7. | Oznaczanie stężenia miedzi i cynku w erytrocytach i osoczu | 27 |
| 3.3. | Metody analizy statystycznej..... | 28 |
| 4. | Wyniki..... | 29 |
| 4.1. | Aktywność enzymów antyoksydacyjnych..... | 33 |
| 4.1.1. | Peroksydaza glutationowa..... | 33 |
| 4.1.2. | Dysmutaza ponadtlenkowa..... | 35 |
| 4.1.3. | Katalaza..... | 35 |
| 4.2. | Stężenia selenu, miedzi, cynku i żelaza | 36 |
| 4.2.1. | Selen w osoczu i erytrocytach | 36 |
| 4.2.2. | Miedź w osoczu i krwinkach czerwonych..... | 37 |
| 4.2.3. | Cynk w osoczu i erytrocytach | 38 |
| 4.2.4. | Żelazo w osoczu..... | 39 |
| 4.3. | Aktywność enzymów a stężenia badanych pierwiastków | 40 |
| 4.3.1. | Peroksydaza glutationowa..... | 40 |
| 4.3.2. | Dysmutaza ponadtlenkowa..... | 45 |
| 5. | Omówienie wyników | 46 |
| 5.1. | Aktywność enzymów antyoksydacyjnych a procesy starzenia | 46 |
| 5.2. | Aktywność enzymów antyoksydacyjnych a stężenia metali | 53 |
| 6. | Wnioski | 62 |
| 7. | Streszczenie..... | 64 |
| 8. | Piśmiennictwo | 68 |
| 9. | Spis tabel i rycin | 82 |

Wykaz zastosowanych w tekście skrótów i symboli:

| | |
|-----------------|---|
| MLS - | maximum life span - maksymalne trwanie życia |
| WRT - | wolne rodniki tlenowe |
| RFT - | reaktywne formy tlenu |
| O_2^{\cdot} - | rodnik ponadtlenkowy |
| H_2O_2 - | nadtlenek wodoru |
| $\cdot OH$ - | rodnik wodorotlenowy |
| 1O_2 - | tlen singletowy |
| mtDNA - | mitochondrialny kwas dezoksyrybonukleinowy |
| 8-OH-dG - | 8-hydrokso-2'deoksyguanozyna |
| GSH - | glutation w formie zredukowanej |
| GSSG - | glutation w formie utlenionej (disulfid glutationu) |
| Cu,Zn-SOD - | miedziowo-cynkowa dysmutaza ponadtlenkowa |
| Mn-SOD - | mangano-zależna dysmutaza ponadtlenkowa |
| EC-SOD - | dysmutaza ponadtlenkowa przestrzeni pozakomórkowej |
| Cat - | katalaza |
| GSH-Px - | peroksydaza glutatinowa |
| GSH-PHGPx - | peroksydaza glutatinowa wodorotlenków fosfolipidów |
| Se - | selen |
| Fe - | żelazo |
| Cu - | miedź |
| Zn - | cynk |

1. WSTĘP

1.1. Proces starzenia w świetle teorii wolnorodnikowej.

Starzenie się człowieka jest procesem fizjologicznym, chociaż patrząc na jego następstwa bardziej odpowiednim wydaje się określenie proces fizjo-patologiczny. Polega on bowiem na stopniowo postępującej akumulacji w komórkach, tkankach i narządach charakterystycznych zmian strukturalnych, które powodują zaburzenia czynności i przyczyniają się do upośledzenia zdolności adaptacyjnych, zwiększonej podatności na choroby i wzrastającego prawdopodobieństwa śmierci [47,50,56,151].

Starzenie w świecie ożywionym cechuje się, między innymi, znacznym różnicowaniem gatunkowym, osobniczym, a nawet układowym. Czynniki warunkujące zapoczątkowanie i dynamikę starzenia pozostają od lat przedmiotem dociekań naukowych, choć ogólnie przyjmuje się, iż rozwój tzw. *"zmian starczych"* należy łączyć zarówno z zapisem genetycznym jak i warunkami środowiskowymi. Za istnieniem programu genetycznego, warunkującego tzw. *"wewnętrzny proces starzenia"* (intrinsic aging) [57] przemawia fakt, że starość nadchodzi zawsze, nawet w optymalnych warunkach życiowych, bez współdziałania chorób, a osobnicy tego samego gatunku charakteryzują się jednakowym tzw. maksymalnym trwaniem życia (maximum life span - MLS) [47,50].

Proces starzenia obejmuje całość organizmu - od poziomu molekularnego do poszczególnych układów, lecz do dnia dzisiejszego brak nam podstawowej wiedzy o czynnikach inicjujących starzenie i sterujących jego przebiegiem. Liczne tzw. teorie starzenia interpretują co prawda wiele z odkrytych mechanizmów tego zjawiska, ale żadna z dotychczasowych hipotez nie dotarła do istoty przyczyny sprawczej i nie została powszechnie zaakceptowana [47,50,56,57, 60,175,197].

Teorie starzenia dzieli się na dwie zasadnicze grupy [175]. Teorie stochastyczne stwierdzają, że starzenie się jest uwarunkowane wieloma zjawiskami o charakterze zewnętrznym i przypisują zasadniczą rolę zmiennym lub stałym, ale o zmiennym

nasileniu, a nawet przypadkowym oddziaływaniom otoczenia. Zgodnie z teoriami niestochastycznymi wszystkie elementy procesu starzenia są genetycznie uwarunkowane. Teorie te zakładają, że starzenie, podobnie jak różnicowanie i rozwój, jako składowa część ontogenezy jest zaprogramowane w kodzie genetycznym, a kolejne etapy wdrażane są w określonej kolejności poprzez aktywację lub hamowanie odpowiednich genów [197].

W świetle różnych, dopełniających się częściowo teorii, rodzi się jednak kolejne pytanie - czy obserwowane zmiany są bezpośrednią przyczyną starzenia, czy też istotnego stymulatora tego procesu nie należy poszukiwać na jeszcze bardziej podstawowym, uniwersalnym dla całego świata ożywionego poziomie?

Atrakcyjną pod tym względem propozycją jest wolnorodnikowa teoria Denhama Harmana, uwzględniająca zarówno metabolizm, który przez J.Śniadeckiego uznany został za główny atrybut bytu materii ożywionej jak i wpływy środowiskowe oraz genetyczne zaprogramowanie zmienności i rozwoju istot żywych [55]. Starzenie, według D.Harmana, jest rezultatem gromadzenia w komórkach (a powodowanych przez wolne rodniki tlenowe) szkodliwych defektów na poziomie molekularnym: uszkodzeń DNA, denaturacji białek, czy peroksydacji lipidów, które prowadzą do zaburzeń czynnościowych i do zmian zwyrodnieniowych oraz do stopniowego obumierania komórek [56,57,195]. Wzrastająca po 1956r. liczba dowodów udziału wolnych rodników w wywoływaniu różnych uszkodzeń molekularnych oraz w patogenezie chorób towarzyszących starości (zaćma, miażdżyca, zwyrodnienie stawowe, powikłania naczyniowe w cukrzycy, zaburzenia immunologiczne, nowotwory, choroba Parkinsona oraz choroba Alzheimera) sprawia, że ich rola w fizjo-patologicznych zmianach starczych budzi poważne zainteresowanie [9,29, 53,54,70,146].

1.2. Wolne rodniki tlenowe - ich źródła i efekty działania.

Wolne rodniki są to atomy, grupy atomów lub cząsteczki zdolne do samodzielnego istnienia, posiadające jeden lub więcej niesparowanych elektronów.

Obecność takiego elektronu decyduje o dużej reaktywności, a przez to o krótkim czasie przetrwania rodnika [9,54,70]. W procesach starzenia najważniejszą rolę odgrywać mają wolne rodniki tlenowe (WRT), powstające w wyniku stopniowej, jednoelektronowej redukcji tlenu. W wyniku przyłączenia 1 elektronu do cząsteczki tlenu powstaje rodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\dot{-}}$), który przyłączając kolejny elektron, w obecności protonów, tworzy nadtlenek wodoru (H_2O_2). Dalsza redukcja nadtlenku wodoru jest źródłem najbardziej reaktywnego rodnika wodorotlenowego ($\cdot OH$) [11,45,50,53,102,167]. Tylko $O_2^{\dot{-}}$ i $\cdot OH$ są, zgodnie z definicją, wolnymi rodnikami, ale ze względu na stosunkowo dużą reaktywność nadtlenek wodoru i powstający również w ustroju tlen singletowy 1O_2 obejmowane są razem z poprzednimi nazwą reaktywne formy tlenu (RFT) [11]. Mogą one powstawać pod wpływem działania czynników zewnętrznych jak promieniowanie jonizujące i promieniowanie nadfioletowe, ultradźwięki, pod wpływem niektórych leków (hydrałazyna, izoniazyd, gentamycyna, cefalorydyna, paracetamol, chloramfenikol, nitrofurazon, sulfasalazyna, menadion, mitomycyna C, adriamycyna), palenia tytoniu, ale co najistotniejsze, wytwarzane są w toku prawidłowego metabolizmu, a głównym ich źródłem w organizmach jest mitochondrialny łańcuch oddechowy [5,9,11,45,53,70,102]. Reaktywne formy tlenu reagując ze związkami wchodzącymi w skład struktur komórkowych powodują ich uszkodzenia. Szczególnie ważne dla funkcji komórek są reakcje wolnych rodników z kwasami nukleinowymi, białkami i lipidami, które są przyczyną mutacji, denaturacji białek, inaktywacji enzymów i peroksydacji lipidów [11,15,17,20,36,46,48,53,70,80,104,164,167].

Już na początku naszego stulecia Rubner [wg 11,110] zwrócił uwagę, że maksymalny czas trwania życia gatunku jest odwrotnie proporcjonalny do tempa przemiany materii, a więc do ilości zużywanego tlenu. Gatunki krótkożyjące jak insekty, gryzonie, charakteryzują się szybkim tempem metabolizmu, co wiąże się z dużym zużyciem tlenu w przeliczeniu na jednostkę masy ciała i stwarza potencjalne warunki do wytwarzania znacznych ilości wolnych rodników [6,33,160]. Obserwacje Rubnera potwierdzono współcześnie. Maksymalny czas życia zwierząt

doświadczalnych (muszka owocowa, domowa, chomiki) hodowanych w najniższych tolerowanych przez nie temperaturach wydłużał się istotnie, najpewniej na drodze zwolnienia metabolizmu i zmniejszenia zużycia tlenu [39,91,106]. Stwierdzono w tych samych warunkach niższe stężenia wydychanych alkanów, metabolitów powstających podczas peroksydacji lipidów. Podobnie MLS zwierząt pozbawionych możliwości swobodnego poruszania się, wydatkujących przez to mniej energii i zużywających mniej tlenu ulegał wydłużeniu prawie dwukrotnie [160].

Opisane przez wielu autorów biologiczne skutki działania wolnych rodników zdają się również potwierdzać ich udział w wywoływaniu zmian starczych.

1.2.1. Reaktywne formy tlenu a mitochondrialny DNA.

Najistotniejszą rolę w inicjowaniu starzenia przypisuje się uszkodzeniom DNA mitochondrialnego (mtDNA) [41,87,107], który w obrębie tej samej ultrastruktury znajduje się w bezpośrednim sąsiedztwie łańcucha oddechowego - głównego miejsca wykorzystania tlenu i wytwarzania reaktywnych form tlenu w komórce, a pozbawionego jednocześnie mechanizmów ochronnych i zdolności naprawy. Dlatego w mitochondrialnym DNA mutacje występują 10-16 razy częściej niż w DNA jądrowym, obok również rozpowszechnionych pęknięć lub delecji fragmentów nici genomu [11,59,87,138]. Występowanie licznych ubytków mtDNA w miocytach serca, mięśni szkieletowych i komórkach mózgu ludzi w wieku podeszłym w badaniach Arnheima i Cortopassi'ego [7] oraz Hayakawy [59] korelowały z narastającym wraz z wiekiem stężeniem 8-hydrokso-2'-deoksyguanozyny (8-OH-dG), produktu reakcji reaktywnych form tlenu z DNA. Ilość oksydacyjnych uszkodzeń DNA, mierzonych stężeniem 8-OH-dG, jest znacznie większa u gatunków ssaków charakteryzujących się krótkim czasem trwania życia i wysokim tempem przemiany materii (np. szczury), niż u gatunków, u których tempo przemiany materii jest wolniejsze, a maksymalny czas trwania życia długi, co sugeruje wpływ działania wolnych rodników tlenowych [6]. Stężenie wydalanego z moczem metabolitu wzrasta nie tylko w warunkach zwiększonego narażenia na działanie prooksydantów, ale również przy niedoborze niektórych antyoksydantów, np. w stanach niedoboru glutationu w wątrobie [6].

Na skutek nagromadzenia uszkodzeń mtDNA zmniejsza się aktywność kodowanych przez niego enzymów łańcucha oddechowego, a co za tym idzie upośledzona zostaje zdolność syntezy ATP, koniecznego nie tylko do utrzymania podstawowych funkcji życiowych, ale i do wyspecjalizowanych funkcji komórki oraz podziałów mitochondriów [26,59,176]. Postępująca z czasem akumulacja komórek o mniejszej ilości czynnych mitochondriów jest przyczyną komórkowego deficytu ATP, a ten niedobór ma być kluczowym czynnikiem procesu starzenia [7,41,59,107]. Poparciem hipotezy o roli ubytków mtDNA w postępujących narządowych zmianach degeneracyjnych towarzyszących starzeniu może być fakt znalezienia analogicznych, ale znacznie częstszych (0,1% vs 60%) delecji mtDNA w chorobach degeneracyjnych mięśni (choroba Kearns-Sayre) [7]. Również Massie [99] obserwował zmniejszenie wraz z wiekiem ilości mtDNA u *Drosophila melanogaster*, a Miquel i wsp. malejącą liczbę mitochondriów w postmitotycznych komórkach ludzi i zwierząt [107].

1.2.2. Reaktywne formy tlenu a białka.

Stadtman powiązał działanie reaktywnych form tlenu ze zwiększeniem ilości utlenionych, nieaktywnych białek, których zawartość może sięgać 40% puli białkowej komórek, upośledzając ich funkcje fizjologiczne [164]. Zależność pomiędzy wiekiem a zawartością utlenionych białek potwierdzili w swoich pracach Oliver [119], Starke-Reed [166] i Carney [22]. Badania Olivera wykazały ponadto utratę aktywności większości badanych przez niego enzymów poddanych działaniu wolnych rodników, co jest zgodne z obserwacjami Stadtmana, według którego aktywność enzymów obniża się wraz z wiekiem do ok. 40-50% [165].

Potwierdzeniem udziału wolnorodnikowej modyfikacji białek w procesie starzenia może być stwierdzenie wyższej zawartości utlenionych białek w komórkach osób z zespołami przedwczesnego starzenia - progerią i Zespołem Wernera, w porównaniu z komórkami zdrowych ludzi w tym samym wieku. Ilość grup karbonylowych (C=O), będących miernikiem utlenienia białek, w fibroblastach pacjentów z zespołami przedwczesnego starzenia odpowiada ich zawartości w fibroblastach zdrowych 80-latków [164].

Carney przyjmuje związek przyczynowy pomiędzy działaniem wolnych rodników tlenowych i gromadzeniem utlenionych białek a upośledzeniem pamięci świeżej - typowym zaburzeniem ośrodkowego układu nerwowego w wieku podeszłym [22]. Dwutygodniowe podawanie substancji wiążącej wolne rodniki (N-tert-butylalfahenylnitron-PBN) powodowało nie tylko zmniejszenie ilości utlenionych białek do wartości porównywalnych z osobnikami młodymi, ale też jednoczesną poprawę funkcji mózgu badanych zwierząt.

1.2.3. Reaktywne formy tlenu a lipidy.

U osobników starych stwierdza się wyższe stężenia nadtlenków lipidów, dwualdehydu malonowego i pentanu, świadczących o większej intensywności procesu peroksydacji lipidów [17,30,31,66,116,135,160]. Sohal i wsp. twierdzą, że ilość wydychanego pentanu jest funkcją wieku. Wzrost jego stężenia w powietrzu wydychanym łącznie ze wzrastającą wraz z wiekiem wartością ilorazu utlenionej formy glutationu do jego formy zredukowanej (GSSG/GSH), świadczyć ma o zwiększonym natężeniu stresu oksydacyjnego w okresie starości [160].

Na rolę reaktywnych form tlenu i peroksydacji lipidów w starzeniu się organizmu wskazuje gromadzenie lipofuscyny zwanej barwnikiem starości. Powstaje ona w wyniku reakcji grup aminowych białek, aminokwasów oraz kwasów nukleinowych z wolnymi rodnikami tlenowymi i aldehydami pochodzącymi z peroksydacji lipidów, także w wyniku polimeryzacji aldehydowych produktów utleniania kwasów tłuszczowych [11,17]. Według Miquela lipofuscyna pochodzi z degenerujących pod wpływem działania reaktywnych form tlenu mitochondriów i jej gromadzenie ma miejsce przede wszystkim w wyspecjalizowanych komórkach postmitotycznych [107]. Sohal i Thaw wykazali, że gromadzenie lipofuscyny zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia tlenu w otaczającej atmosferze [wg 48,157], wskazując, że przyczyną tego zjawiska może być stres oksydacyjny, rozumiany jako zaburzenie równowagi prooksydacyjno - antyoksydacyjnej, prowadzące do podwyższenia stacjonarnych stężeń reaktywnych form tlenu [9,11,48]. Potwierdzeniem udziału wolnych rodników tlenowych w powstawaniu i gromadzeniu starczego barwnika jest też fakt nasilenia tych

procesów przy karmieniu zwierząt dietą ubogą w Vit.E oraz ich redukcja przy wysokiej zawartości Vit.E w paszy [17].

Reaktywne formy tlenu odpowiedzialne są za widoczne efekty starzenia się skóry poddanej działaniu promieniowania ultrafioletowego, które wyzwała reakcje wolnorodnikowe. Skóra części ciała narażonych na działanie promieni słonecznych zawiera więcej nadtlenków lipidów i produktów ich peroksydacji niż skóra części osłoniętych [38,172].

1.3. Antyoksydacyjne mechanizmy obronne.

1.3.1. Rodzaje obrony.

Ze względu na ogromne zagrożenie, jakie wolne rodniki tlenowe stanowią dla struktury i funkcji komórek, organizmy tlenowe wykształciły w toku ewolucji sprawne mechanizmy obronne, które nie dopuszczają do wytwarzania i do utrzymywania zbyt dużych stężeń reaktywnych form tlenu. O wadze przeciwdziałania wpływom wolnych rodników świadczy wytworzenie 3-stopniowej obrony, na którą składają się [11]:

- I° Zdolność rozkładania RFT i blokowanie ich reakcji ze związkami biologicznymi.
- II° Możliwość przerywania już zapoczątkowanych łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych.
- III° Naprawa lub usuwanie powstałych pod wpływem RFT uszkodzeń biomolekuł.

Ad I Pierwsze zadanie zapewniają tzw. **antyoksydanty prewentywne**, do których wg Bartosza i Van Acker'a zalicza się:

1. Enzymy antyoksydacyjne:
 - a) dysmutazy ponadtlenkowe katalizujące reakcję dysmutacji rodnika ponadtlenkowego,
 - b) katalazy unieczynnijające nadtlenuk wodoru,
 - c) peroksydazy glutationowe, podobnie jak katalazy rozkładające nadtlenuk wodoru [11,180].

2. Białka wiążące jony żelaza i miedzi, przez co zapobiegają powstawaniu rodnika wodorotlenowego na drodze reakcji Fentona:
 - a) białka wiążące zarówno jony żelaza jak i związki, które mogą być jego potencjalnymi źródłami: transferyna, laktoferyna, ferrytyna, hemosyderyna, haptoglobina, hemopeksyna [11,51,149],
 - b) białka wiążące jony miedzi: ceruloplazmina, albumina, metalotioneina [11,17, 86].
3. Antyoksydanty niskocząsteczkowe: glutation, kwas askorbinowy (Vit.C), aminokwasy siarkowe, końcowe produkty metabolizmu np. bilirubina, kwas moczowy, kreatynina [11,17,44,104,143,144,152].

Ad II Łańcuchową reakcję wolnorodnikową przerywać mogą **antyoksydanty interwencyjne** [11,180].

Głównymi przedstawicielami tej drugiej linii obrony są:

1. Zredukowany koenzym Q (ubihydrochinon),
2. Tokoferole, głównie tokoferol α , który stanowi 88% osoczowej puli Vit.E [152,169,177,180].
3. Vit.A i będące jej prekursorami karotenoidy, które mogą działać, podobnie jak Vit.E, również w pierwszej linii obrony [152,177].

Ad III Trzecią linię obrony stanowi **aparatus naprawczy** uszkodzonych przez wolne rodniki cząsteczek. Należą do niej:

1. Enzymy naprawiające lub eliminujące uszkodzenia DNA:
 - a) glikozylazy odszczepiające uszkodzone zasady,
 - b) endonukleazy umożliwiające wycięcie uszkodzonego fragmentu genomu,
 - c) ligazy łączące pęknięte nici helisy oraz
 - d) polimerazy odtwarzające usunięte fragmenty DNA na podstawie informacji zawartej w nici komplementarnej [11].
2. Za inne zabezpieczenia przed skutkami wolnorodnikowych uszkodzeń uznaje się:

- a) nadwyżkę informacji genetycznej w postaci jej wielokrotnego powtórzenia (redundancja),
- b) obecność fragmentów niekodujących oraz
- c) osłonowe połączenia z białkami [41, 87].

Upośledzenie lub wyczerpanie zdolności naprawczych powoduje, że wraz z upływem czasu uszkodzenia DNA kumulują się w komórce.

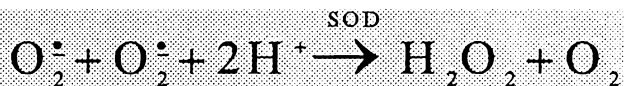
Pierwszą a zarazem główną linię obrony antyoksydacyjnej tworzą jednak wspomniane powyżej (I-1.) enzymy: dysmutazy nadadtlenkowe, unieczynnijające rodnik nadadtlenkowy oraz katalaza i peroksydazy glutationowe rozkładające nadadtlenki, w tym również nadadtlenek wodoru będący w znaczącej części produktem uprzedniego zadziałania dysmutaz.

1.3.2. Dysmutazy nadadtlenkowe (SOD).

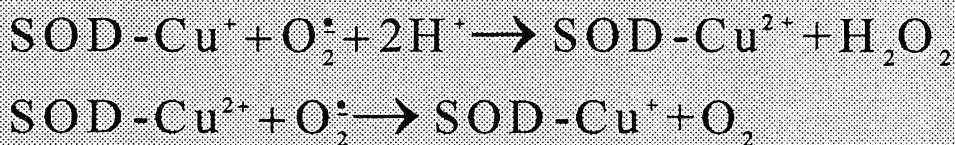
Człowiek dysponuje trzema różnymi i różnie zlokalizowanymi dysmutazami [25,58,77]. Są to:

1. Miedziowo-cynkowa dysmutaza nadadtlenkowa (Cu,Zn-SOD), obecna w cytoplazmie i przestrzeni międzybłonowej mitochondriów [101].
2. Miedziowo-cynkowa dysmutaza nadadtlenkowa (EC-SOD) występująca w przestrzeni pozakomórkowej [97] oraz
3. Mangano-zależna dysmutaza (Mn-SOD) - działająca w macierzy mitochondriów [188].

Dysmutazy nadadtlenkowe katalizują reakcję dysmutacji rodnika nadadtlenkowego (O_2^{\cdot}), która w obecności enzymu przebiega 10^9 razy szybciej niż reakcja spontaniczna [45]. W wyniku reakcji dysmutacji z dwóch cząsteczek O_2^{\cdot} , z udziałem protonów, powstaje nadadtlenek wodoru i tlen [9,25,45].



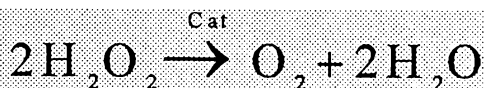
O szybkości katalizowanej przez SOD reakcji decyduje tempo dotarcia substratu do aktywnego centrum enzymu zawierającego Cu^{2+} oraz Zn^{2+} . Cytoplazmatyczną Cu,Zn-SOD zawierają wszystkie komórki organizmu, najobficiej występuje w wykazujących duże tempo metabolizmu hepatocytach. Enzym ten charakteryzuje się dość znaczną stabilnością i opornością na działanie temperatury, proteaz i zmiany pH. Utrzymanie stabilności enzymu przypisuje się obecnym w centrum aktywnym jonom cynku [45], podczas gdy jony miedzi (lub manganu) dzięki zdolności do zmiany stopnia utlenienia, biorą udział w unieczynnianiu O_2^{\cdot} , ulegając pod wpływem jednej jego cząsteczki utlenieniu, a pod wpływem kolejnej redukcji [25, 45, 101].



Mające nieco inną budowę dysmutazy: pozakomórkowa (EC-SOD) oraz mitochondrialna (z Mn zamiast Cu i Zn) wypełniają podobne zadania.

1.3.3. Katalaza (Cat).

W ciągu 1 sekundy cząsteczka katalazy zdolna jest do rozłożenia ok. 200 tys. cząsteczek H_2O_2 zgodnie z reakcją [11,25]:

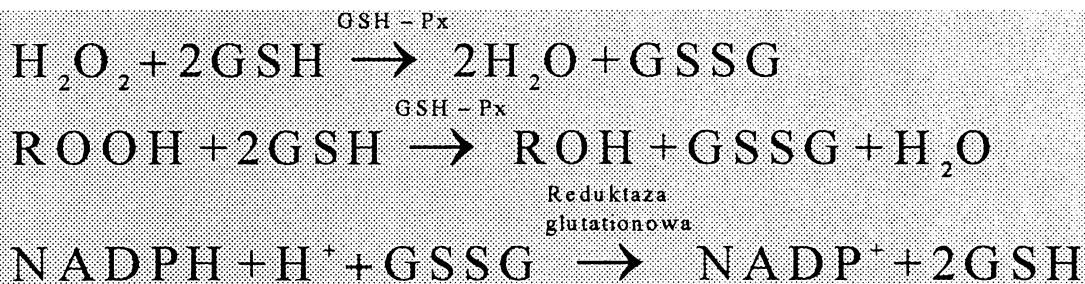


Jest ona hemoproteiną występującą u ssaków we wszystkich typach komórek; w cytoplazmie jako typowa (Cat T), oraz w peroksysomach - jako atypowa (Cat A) [17, 58,86]. Zbudowana jest z 4 podjednostek, z których każda zawiera grupę hemową z Fe^{3+} .

1.3.4. Peroksydaza glutationowa (GSH-Px).

Jest obok katalazy drugim enzymem unieczynnającym nadtlenuk wodoru. Katalizuje rozkład H_2O_2 przy jego niskich stężeniach [86,125]. Peroksydaza

glutationowa działa również na wodoronadtlenki lipidowe redukując je do alkoholi [25]. W reakcjach katalizowanych przez GSH-Px donorem elektronu jest glutation (GSH), a warunkiem prawidłowego funkcjonowania tego układu jest możliwość powrotu glutationu do formy zredukowanej dzięki reakcji katalizowanej przez reduktazę glutationową [11,17,25].



Objaśnienia symboli:

| | |
|-------------------|---|
| GSH | - zredukowana forma glutationu, |
| GSSG | - utleniona forma glutationu, |
| NADP ⁺ | - fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, |
| NADPH | - zredukowana forma tego nukleotydu, |
| ROOH | - wodoronadtlenek organiczny, |
| ROH | - alkohol organiczny. |

Niedobór GSH lub koniecznego do jego odzyskania NADPH może ograniczać wydolność systemu, czego wyrazem jest gromadzenie GSSG [144]. Źródłem NADPH jest cykl pentozowy przemiany glukozy, którego kluczowym enzymem jest dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa [167].

Cząsteczka GSH-Px zawiera selenocysteinę, której obecność w centrum aktywnym enzymu umożliwia dwuelektronowe utlenianie glutationu [11,125]. Opisano dwie formy peroksydazy glutationowej: wewnątrzkomórkową i osoczną. Prawie 2/3 aktywności GSH-Px działającej wewnątrz komórek przypada na cytoplazmę, pozostała 1/3 stwierdzana jest w mitochondriach, brak jej natomiast w peroksosomach [25]. Drugą formą selenozależnej peroksydazy glutationowej jest enzym występujący w osoczu krwi. Ta postać enzymu jest glikoproteina [58], a głównym źródłem jego syntezy są komórki cewek proksymalnych nerek [8]. W 1982r. odkryta została trzecia forma, a mianowicie peroksydaza glutationowa wodoronadtlenków fosfolipidów (GSH-PHGPx), rozkładająca nadtlarki związane z fosfolipidami błon komórkowych [173,178].

Aktywność peroksydaz glutationowych zależy od dostępności selenu i może służyć jako wskaźnik zaopatrzenia organizmu w selen [25,96,181]. Wykazano również związek pomiędzy aktywnością GSH-Px a zaopatrzeniem ustroju w miedź i żelazo [24, 65,92,118,134,142].

1.4. Metale jako prooksydanty i antyoksydanty.

Sprawność opisanej dotychczas pierwszej linii obrony przed szkodliwościami wolnych rodników tlenowych zależy od obecności metali jako koenzymów w ośrodkach aktywności enzymatycznej. Do pierwiastków tych należą selen, żelazo, miedź i cynk.

Selen (Se) jest mikroelementem, którego ilość w organizmie zależy od jego zawartości w glebie, skąd czerpią go rośliny, a wraz z nimi spożywany jest przez zwierzęta i ludzi. Od lat 30-tych naszego stulecia znana była toksyczność selenu przy nadmiernej na niego ekspozycji, ale wraz z identyfikacją najpierw w 1973r. selenozależnej peroksydazy glutationowej [42], a w 1982r. peroksydazy wodoronadtlenków fosfolipidów [178] poznano niezwykle ważną funkcję antyoksydacyjną selenu. O niezbędnej roli selenu w ustroju człowieka świadczy występowanie szeregu patologii w stanach jego niedoboru. Niskim stężeniom Se w osoczu ($< 25 \mu\text{g/l}$) towarzyszy młodzieńcza kardiomiopatia zwana chorobą Keshan oraz osteoartropatia - choroba Kashin-Beck, obie występują endemicznie w Chinach i we wschodniej Syberii, na terenach o bardzo małej zawartości selenu w glebie [124,189]. Badania epidemiologiczne wskazują także na zwiększoną zapadalność wśród ludzi z niedoborami selenu na nowotwory, szczególnie przewodu pokarmowego oraz chorobę niedokrwinną serca [124,148,163,186].

Przyjętym wskaźnikiem zaopatrzenia organizmu w selen jest jego stężenie w osoczu. Zmienia się ono już w 1-3 tygodnie od zmniejszenia lub zwiększenia dowozu selenu w diecie, nadaje się więc do oceny *"krótkoterminowego statusu selenowego"* [96,113,181]. Innym wskaźnikiem może być stężenie selenu w krwinkach czerwonych lub płytkach krwi. W erytrocytach selen związany jest z hemoglobina, a także (ok.12-15%) stanowi składową peroksydazy glutationowej krwinek czerwonych [181].

Stężenie selenu w erytrocytach jest bardziej stabilne, co wiąże się ze stosunkowo długim czasem ich życia. "Długoterminowy status selenowy" organizmu określa zawartość Se w paznokciach i we włosach, choć ten ostatni pomiar wg Salbe i Levandera nie zawsze koreluje z zawartością tego pierwiastka w innych narządach [147]. Zaopatrzenie w selen determinuje aktywność peroksydazy glutationowej. Na ogół wykazywano zależność pomiędzy stężeniem selenu w osoczu, a aktywnością osoczowej GSH-Px [12,113,150,156,181,194]. Według niektórych autorów również aktywność enzymu erytrocytarnego koreluje ze stężeniem Se w pełnej krwi [12], w osoczu [127] i w krwinkach czerwonych [113,136], choć wzrost aktywności zarówno osoczowej jak i erytrocytarnej GSH-Px obserwowano tylko do pewnej progowej wartości stężenia selenu w osoczu i krwinkach, powyżej którego badana aktywność już nie wzrasta [12,113,155,181].

Żelazo, miedź i cynk należą do metali ziem przejściowych. W mechanizmach równowagi prooksydacyjno - antyoksydacyjnej ustroju pełnią rolę dwojaką. Jako składniki enzymów antyoksydacyjnych należą do układu antyoksydantów. Z drugiej jednak strony jony tych metali występują na różnych stopniach utlenienia, a to oznacza, że mogą także brać udział w reakcjach prowadzących do powstawania wolnych rodników w charakterze prooksydantów [104]. Najważniejszą jest reakcja Fentona:



Wyjątkiem w tej grupie metali jest cynk, który zawsze występuje na drugim stopniu utlenienia.

Żelazo (Fe) jest niezbędnym i najobficiej występującym w ustroju metalem przejściowym. Wchodzi ono w skład hemoglobiny, mioglobiny, cytochromów oraz wielu enzymów, między innymi katalazy rozkładającej nadtlenek wodoru [51]. Poza istotną rolę fizjologiczną, jony żelaza, mogąc zmieniać stopień utlenienia, uczestniczą w generowaniu najbardziej toksycznego rodnika wodorotlenowego na drodze wspomnianej już reakcji Fentona [11,50,52].

Najpewniej dlatego ustrój broni się przed występowaniem wolnych jonów żelaza przez wykształcenie szeregu białek wiążących żelazo i jego potencjalne źródła.

Utrzymuje się pogląd, iż w starości stężenie żelaza w surowicy jest obniżone, choć nie wyjaśniono, czy jest to zmiana fizjologiczna, czy wynika z zaburzeń czynności przewodu pokarmowego [72].

Miedź (Cu), podobnie jak żelazo, jest pierwiastkiem niezbędnym dla człowieka jako składnik wielu enzymów: oksydazy cytochromowej, oksydazy lizynowej, beta-hydroksylazy dopaminowej oraz dysmutazy ponadtlenkowej dezaktywującej rodnik ponadtlenkowy. Jony miedzi, które podobnie jak jony żelaza mogą katalizować reakcje powstawania wolnych rodników [83] związane są w osoczu głównie z ceruloplazminą. Białko to wiąże ponad 90% miedzi osocza, a także wykazuje słabą aktywność dysmutazy [11,17] i aktywność ferooksydazy utleniając jony żelazawe (Fe^{2+}) do mniej aktywnych jonów żelazowych (Fe^{3+}) [51,149]. Pozostała część jonów miedzi związana jest z albuminami i aminokwasami, które również wykazują aktywność dysmutacyjną [162]. W erytrocytach 60% zawartej w nich miedzi związane jest z dysmutazą ponadtlenkową [117].

Cynk (Zn) jest składnikiem dysmutazy ponadtlenkowej, a także polimerazy RNA, anhydrazy węglanowej, fosfatazy zasadowej, ale w odróżnieniu od jonów żelaza i miedzi, jony cynku nie wykazują własności proooksydacyjnych.

Antyoksydacyjna rola cynku, poza udziałem w stabilizacji cząsteczki dysmutazy ponadtlenkowej, polega na stymulowaniu syntezy metalotioneiny, białka magazynującego i biorącego udział w homeostazie cynku i miedzi [82]. Wiążąc jony miedzi lub cynku cząsteczka metalotioneiny może dzięki ich obecności, a także obecności grup tiolowych, reagować z rodnikami ponadtlenkowymi i wodorotlenowymi, chroniąc struktury komórki przed ich uszkadzającym działaniem. Cynk stabilizuje błony komórkowe biorąc udział w ochronie grup SH i zapobiega tworzeniu wolnych rodników konkurując z metalami przejściowymi [82].

Ogromna złożoność mechanizmów starzenia oraz istnienie dowodów na współdziałanie w tym procesie reaktywnych form tlenu zachęcają do śledzenia zachowania się chociażby fragmentu obrony antyoksydacyjnej ustroju w wieku podeszłym.

2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY.

Z bogatego piśmiennictwa tematu wynika, że u starych osobników, zarówno ludzi jak i zwierząt, stężenia reaktywnych form tlenu oraz substancji będących wynikiem ich reakcji z biomolekułami są wyższe niż u młodych [17,30,31,66,116, 135,160], a także gromadzi się u nich więcej wolnorodnikowych uszkodzeń składników komórkowych [7, 10, 15, 20, 22, 36, 46, 48, 59, 70, 80, 87, 104, 107,119, 138,164,166]. Powstające pod wpływem wolnych rodników zmiany w cząsteczkach kwasów nukleinowych, białek oraz lipidów powodują upośledzenie funkcji, degenerację i obumieranie komórek.

Kwestią otwartą pozostaje, który z przeciwstawnych elementów równowagi oksydacyjnej odgrywać może zasadniczą rolę - czy wzrost wytwarzania wolnych rodników tlenowych, czy upośledzenie obrony antyoksydacyjnej.

Według Sohal i Orr [160] istotny jest niedostatek obrony antyoksydacyjnej, przy którym czynniki prooksydacyjne podnoszą poziom stresu oksydacyjnego, a narządy i tkanki mogą znajdować się pod jego działaniem nawet w normalnych, fizjologicznych warunkach. Autorzy ci wykazali dodatnią korelację pomiędzy aktywnością niektórych enzymów antyoksydacyjnych a maksymalnym czasem trwania życia 6 różnych gatunków ssaków [159]. Podobną zależność w stosunku do dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy, a także β -karotenu i α -tokoferolu, wykazał Cutler [33]. Podobnie jak Sohal, uważa on, że długość życia zależy od wydajności obrony antyoksydacyjnej, stąd najdłuższą wśród ssaków długość życia naszego gatunku (*Homo sapiens*) wiąże z najlepiej wykształconymi jej mechanizmami [32].

Większość przeprowadzonych w tej dziedzinie doświadczeń i opracowań dotyczyła zwierząt. Badania aktywności enzymów antyoksydacyjnych u ludzi są mniej liczne, a prezentowane wyniki niejednolite. Według autorów, którzy nie znajdowali różnic pomiędzy aktywnością enzymów antyoksydacyjnych ludzi starych i młodych, starzenie nie zależy od zmniejszenia ich aktywności [12,21,28,89,145]. Inni wiążą starość z obniżeniem aktywności poszczególnych enzymów wraz z wiekiem [49,115,128,150,

174], chociaż niektórzy autorzy wykazywali nawet wzrost ich aktywności [68,184]. Podnosi się także w piśmiennictwie, że kierunek zmian może zależeć od badanej tkanki [66,67,68,128,185].

Obniżenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych może mieć różny mechanizm. Przyczyną może być uszkodzenie zawiadujących ich syntezą genów, zaburzenie koordynacji genowej, upośledzona synteza białek, inaktywacja przez wolne rodniki, ale także niedobór metali, które pełnią funkcje kofaktorów. Uwzględniając powyższe wątpliwości celem przedstawionej pracy było: 1 - zbadanie aktywności głównych enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy glutationowej u zdrowych osób w wieku podeszłym w porównaniu z aktywnością tych enzymów u ludzi młodych, a także 2 - określenie w osoczu i w erytrocytach stężeń selenu, żelaza, miedzi i cynku, ponieważ funkcja każdego z badanych enzymów związana jest z obecnością metalu wbudowanego w aktywne centrum, (dysmutaza-Cu i Zn, katalaza-Fe, a peroksydaza-Se). Kolejnym problemem badawczym było: 3 - uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy aktywność badanych enzymów zależy od stężeń tych pierwiastków.

3. MATERIAŁ I METODYKA

3.1. Osoby badane.

Badania przeprowadzono u 93 osób w wieku od 21 do 102 lat, w tym u 63 kobiet i u 30 mężczyzn, których podzielono w zależności od wieku i płci na przedstawione poniżej grupy:

Grupę I (porównawczą) - tworzyło 40 osób młodych w wieku 21-44 lata

($\bar{x}=32,03\pm 6,25$ l.), w której wydzielono:

a) podgrupę młodych kobiet - K_I - ($n=23$) w wieku 26-42 lata, ($\bar{x}=33,4\pm 4,65$ l.),

b) podgrupę młodych mężczyzn - M_I - ($n=17$) w wieku 21-44 lata ($\bar{x}=30,2\pm 7,73$ l.).

Grupę II - osób starszych, stanowiło 53 badanych w wieku od 61 do 102 lat,

($\bar{x}=79,68\pm 9,64$ l.), którą podzielono na:

a) podgrupę starszych kobiet - K_{II} - ($n=40$) w wieku 61-102 lat ($\bar{x}=80,7\pm 10,13$ l.),

b) podgrupę starszych mężczyzn - M_{II} - ($n=13$) w wieku 64-91 lat ($\bar{x}=76,5\pm 7,69$ l.).

Tab. 1. Wiek i liczebność badanych

| Badane grupy | Płeć/liczebność (n) | Wiek badanych w latach | |
|-----------------------------------|--------------------------|------------------------|-----------------|
| | | zakres | $\bar{x}\pm SD$ |
| Grupa I (n=40) osób młodych | K_I (n=23) | 26-42 | 33,4±4,65 |
| | M_I (n=17) | 21-44 | 30,2±7,73 |
| Grupa I (ogółem) | $K_I + M_I$ (n=40) | 21-44 | 32,03±6,25 |
| Grupa II (n=53) osób starszych | K_{II} (n=40) | 61-102 | 80,7±10,13 |
| | M_{II} (n=13) | 64-91 | 76,5±7,69 |
| Grupa II (ogółem) | $K_{II} + M_{II}$ (n=53) | 61-102 | 79,68±9,64 |

Do badań kwalifikowano osoby klinicznie zdrowe, które nie podawały poważniejszych dolegliwości, nie zażywały w ostatnim okresie przed badaniem leków,

były sprawne zarówno umysłowo jak i fizycznie, samowystarczalne w zakresie codziennych czynności i samoobsługi i nie wykazywały odchyłań od stanu prawidłowego, u których ani wcześniej, ani w chwili badania nie rozpoznawano przewlekłej choroby. Podstawą doboru był wywiad, badanie fizykalne oraz wybrane badania dodatkowe: morfologia krwi, ogólne badanie moczu, glikemia i stężenie cholesterolu na czczo. Funkcję nerek oceniano na podstawie stężenia mocznika i kreatyniny, a wątroby - stężenia bilirubiny oraz transaminaz alaninowej i asparaginianowej. Badania te wykonywane były przy pomocy powszechnie przyjętych metod chemii klinicznej. U każdej kwalifikowanej osoby wykonywano spoczynkowy zapis EKG, radiologiczne zdjęcie przeglądowe klatki piersiowej i badanie ultrasonograficzne jamy brzusznej.

Badanych w starszym wieku dobrano spośród pensjonariuszy trzech domów rencistów w Krakowie uzyskując ich zgodę na przebadanie. Porównawczą grupę osób młodszych stanowili ochotnicy spośród pracowników Kliniki Geriatrii Collegium Medicum UJ.

3.2. Metodyka badań biochemicznych.

3.2.1. Przygotowanie materiału do badań.

Krew żylną pobierano na czczo, w godzinach porannych (7³⁰-8⁰⁰), do trzech heparynizowanych probówek, w ilości po 5ml, stosując 100j heparyny sodowej na 1ml krwi (Heparyna/Polfa). Krew wirowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej przy 300 × g. Następnie osocze przenoszono do osobnych probówek i ponownie wirowano przy 3000 × g przez 15 minut celem oddzielenia od pozostałych elementów morfotycznych. Tak uzyskane osocze służyło do oznaczeń:

- aktywności selenozależnej peroksydazy glutationowej,
- stężenia żelaza, cynku, miedzi i selenu.

Z dolnej warstwy pierwszej probówki zawierającej krwinki czerwone i pozostałe jeszcze po pierwszym wirowaniu inne elementy morfotyczne, pobierano około 80% jej zawartości, przenoszono do następnej probówki i wirowano przy 3000 × g przez 15

minut. Uzyskane w ten sposób krwinki czerwone pobierano z dna, przenoszono do kolejnej probówki i przemywano je trzykrotnie 150mM/l roztworem NaCl, wirując każdorazowo przez 10 minut przy $3000 \times g$. Uzyskane po ostatnim płukaniu krwinki czerwone były prawie całkowicie pozbawione innych elementów morfotycznych krwi, co sprawdzono wykonując rozmazy i barwiąc je w taki sam sposób jak do oznaczania wzoru odsetkowego krwinek białych. Otrzymane erytrocyty przeznaczone do oznaczeń enzymów antyoksydacyjnych i selenu przechowywano w temperaturze $0^{\circ}C$ do czasu poddania ich hemolizie w redestyłowanej wodzie w stosunku objętościowym 1:4, stosując trzykrotnie powtarzane zamrażanie (w mieszaninie suchego lodu i alkoholu absolutnego) i rozmrażanie w temperaturze pokojowej. Hemolizaty wirowano następnie przez 10min., w temp. $+4^{\circ}$ stosując $7000 \times g$, a następnie w nadsączu oznaczano białko oraz:

- aktywność enzymów:

dysmutazy ponadtlenkowej

katalazy

selenozależnej peroksydazy glutationowej

- stężenia selenu, miedzi i cynku.

Celem oznaczenia stężenia miedzi i cynku w erytrocytach przygotowano hemolizaty mieszając 0,2ml przemytych krwinek czerwonych z 1,8ml roztworu Triton X-100.

(Oznaczenia aktywności enzymów i stężenia selenu wykonano w Katedrze i Zakładzie Biochemii i Chemii Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach, stężenia żelaza, miedzi i cynku oznaczono w Pracowni Chemii Klinicznej Zakładu Biochemii Klinicznej Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii CM UJ w Krakowie)

3.2.2. Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD E.C. 1.15.1.1) w erytrocytach.

Aktywność SOD oznaczano metodą Misry i Fridovicha [108], która wykorzystuje fakt powstawania rodników ponadtlenkowych w procesie samoutleniania

adrenaliny do adrenochromu. Enzym dodawany do roztworu adrenaliny katalizuje dysmutację rodników, co prowadzi do zahamowania samoutleniania. Próbę badaną, ślepą i kontrolną przygotowywano wg schematu:

Tab. 2. Schemat przygotowania prób do badania aktywności dysmutazy ponadtlenkowej:

| Składnik | Próba badana (ml) | Próba ślepa (ml) | Próba kontrolna (ml) |
|--------------------------|-------------------|------------------|----------------------|
| 1) Na ₂ EDTA | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 2) Bufor | 1,9 | 2,0 | 1,9 |
| Próba badana - hemolizat | 0,1 | - | - |
| 3) Adrenalina | 0,1 | - | 0,1 |

1) 11,2mg% Na₂EDTA

2) 0,05 M/l bufor węglanowy o pH 10,2

3) 170mg% roztwór winianu adrenaliny w 0,02 N HCl [Adrenalinum hydrotartaricum (Polfa)]

Przed dodaniem adrenaliny, próby inkubowano przez 5min. w temp.30°C. Absorbancję próby badanej i kontrolnej mierzono wobec próby ślepej, stosując spektrofotometr Beckman UV 5260 (USA), przy długości fali 480nm. Pomiarów wykonywano w ciągu 5min., co 30s od momentu dodania adrenaliny do próby badanej i kontrolnej. Obliczenia wykonano wg wzoru:

$$\% \text{inhibicji} = [(D_{AK} - D_{AB}) / D_{AK}] \times 100\%$$

D_{AK} - przyrost ekstynkcji dla próby kontrolnej

D_{AB} - przyrost ekstynkcji dla próby badanej,

a za 1 jednostkę SOD przyjęto ilość enzymu zdolną do 50% inhibicji redukcji adrenochromu w warunkach metody. Wynik aktywności dysmutazy ponadtlenkowej wyrażono w U/mg białka erytrocytów.

3.2.3. Oznaczanie aktywności katalazy (CAT.E.C.1.11.1.6.) w erytrocytach:

Aktywność katalazy oznaczano wg metody podanej przez Aebi [1], wykorzystującej możliwość śledzenia rozkładu H_2O_2 przez enzym poprzez pomiar spadku absorbancji, przy długości fali $\lambda=240\text{nm}$, w paśmie charakterystycznym dla nadtlenu wodoru.

Próbę badaną i ślepa przygotowano wg schematu:

Tab. 3. Schemat przygotowania prób do badania aktywności katalazy:

| Składnik | Próba badana (ml) | Próba ślepa (ml) |
|-------------|-------------------|------------------|
| 1) Bufor | 1,9 | 2,9 |
| Hemolizat | 0,1 | 0,1 |
| 2) H_2O_2 | 1,0 | - |

1) 0,05 M bufor fosforanowy o pH 7,0

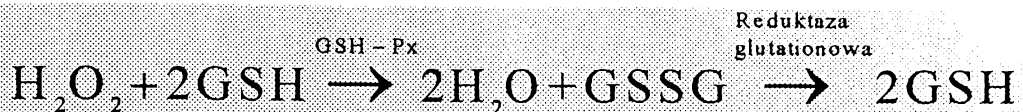
2) 30 mM nadtlenek wodoru

Pomiarów absorbancji próby badanej dokonywano wobec próby ślepej w temp. 25°C. Pierwszy odczyt absorbancji miał miejsce natychmiast po dodaniu H_2O_2 do próby (A_1), następny po 15s. (A_2). Stosowano spektrofotometr Beckman UV 5260 (USA).

Aktywność katalazy wyrażano w jednostkach k/mg białka erytrocytów, gdzie k jest stałą szybkości reakcji I rzędu przeprowadzonej przez katalazę ($k=0,153 \times \log A_1/A_2$).

3.2.4. Oznaczanie aktywności selenozależnej peroksydazy glutationowej (GSH-Px, E.C.1.11.1.9) w erytrocytach i w osoczku.

Aktywność GSH-Px oznaczano metodą Paglia i Valentine'a [123] w modyfikacji Lawrence'a i Burka [81], w której wykorzystuje się współdziałanie peroksydazy glutationowej i reduktazy glutationowej.



Utleniany w pierwszej fazie glutation (GSSG) jest z kolei redukowany (do GSH) w reakcji katalizowanej przez reduktazę glutationową, która stanowi jeden ze składników mieszaniny reakcyjnej. Redukcji utlenionego glutationu towarzyszy utlenienie NADPH do NADP, któremu towarzyszy spadek absorbancji przy długości fali $\lambda=340\text{nm}$.

Próby badaną i ślepą przygotowano wg schematu:

Tab. 4. Schemat przygotowania prób do badania aktywności peroksydazy glutationowej:

| Składnik | Próba badana (ml) | Próba ślepa (ml) |
|----------------------------------|-------------------|------------------|
| 1) Bufor | 2,5 | 2,9 |
| Próba badana (osocze, hemolizat) | 0,1 | 0,1 |
| 2) NADPH | 0,1 | - |
| 3) GSH | 0,1 | - |
| 4) NaN_3 | 0,1 | - |
| 5) Reduktaza GSSG | 0,005 (1 U) | - |
| 6) H_2O_2 | 0,1 | - |

- 1) 0,15 M bufor fosforanowy o pH 7,0 + 0,005 M Na_2EDTA
- 2) NADPH 3mg/ml buforu firmy Fluka (Szwajcaria)
- 3) GSH 4,65mg/ml buforu firmy Fluka (Szwajcaria)
- 4) 0,56 Mol/l roztwór azydku sodu
- 5) reduktaza glutationowa firmy Fluka (Szwajcaria)
- 6) Nadtlenek wodoru 45 μl 30% $\text{H}_2\text{O}_2/100\text{ml}$ buforu

Przed dodaniem H_2O_2 próbę inkubowano przez 5min. w temp. 25°C. Po dodaniu nadtlenu wodoru mierzono absorbancję próby badanej wobec próby ślepej w 2 i 4 minucie reakcji. Obliczenia aktywności peroksydazy glutationowej dokonano w oparciu o współczynnik ekstynkcji molowej NADPH.

Aktywność GSH-Px została wyrażona w μmolach utlenionego NADPH/ min/mg białka.

$$\text{Aktywność GSH-Px} = \frac{D_A \times 3,005 \times 6,22 \times 10^{-3}}{c \times t}$$

D_A - różnica absorbancji

c - stężenie białka w próbce

t - czas reakcji

3,005 - objętość mieszaniny

wsp. ekstynkcji molowej - $6,22 \times 10^{-3} \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

3.2.5. Oznaczanie stężenia selenu w erytrocytach i w osoczu.

Stężenie selenu oznaczano metodą spektrofotometryczną, opisaną przez Lalonde i wsp.[78]. Zasada oznaczenia polega na przeprowadzeniu selenu (Se^{VI}) zawartego w zmineralizowanej na mokro próbce w selenin (Se^{IV}), który daje w środowisku kwaśnym o $\text{pH}=1-2$ połączenie kompleksowe z 2,3 diaminonaftalenem. Połączenie to po ekstrakcji cykloheksanem pozwala na ilościowe oznaczenie selenu w próbkach.

Przygotowanie próbek.

Do mineralizacji pobierano po 0,2ml osocza lub hemolizatu, które dodawano do 4ml 60% roztworu kwasu nadchlorowego (HClO_4 7+3). Po zmieszaniu próbki ogrzewano w mineralizatorze typu Meditherm TH-3 przez 15min. w temp. 100°C , następnie przez 30min. w temp. 150°C . Właściwa mineralizacja zachodziła przy ogrzewaniu przez 1,5 godz. w temp. 190°C . Nadmiar kwasu nadchlorowego usuwano ogrzewając próby przez 30min. w temp. 210°C . Po ostudzeniu do próbek dodawano po 0,5ml wody destylowanej i ogrzewano ponownie w temp. 210°C do chwili pojawienia się białych dymów. Po kolejnym ostudzeniu do prób dodawano po 1ml 1 M kwasu solnego i ogrzewano we wrzącej łaźni wodnej przez 1 godz. w celu redukcji selenianów do seleninów. Aby uzyskać właściwe pH reakcji kompleksowania, do próbek dodawano po 2,5ml roztworu EDTA i hydroksylaminy (9,03 g Na_2EDTA + 1 g hydroksylaminy /l) i 3 krople 0,02% czerwieni krezolowej, a następnie miareczkowano roztworem amoniaku

(1+1) do żółtego zabarwienia roztworu. Proces kompleksowania prowadzono po dodaniu do próbek 0,5ml 0,4% roztworu 2,3 diaminonaftalenu w 0,1 M HCl, ogrzewając próbki przez 30min. w temp. 40°C. Schłodzone próby poddawano ekstrakcji przy pomocy 5ml cykloheksanu. Selen oznaczano spektrofluorymetrycznie aparatem firmy Perkin-Elmer LS-30. Długość fali wzbudzenia wynosiła 365nm, a długość emisyjna 520nm.

Próbę ślepą (0,2ml wody destylowanej) oraz wzorcową (20ng Se w próbce) poddawano mineralizacji i postępowano jak z próbkami badanymi. Uzyskane wyniki przeliczano na 1ml osocza lub na g białka erytrocytów.

3.2.6. Oznaczanie stężenia żelaza w osoczu.

Badanie stężenia żelaza w osoczu wykonywano na automatycznym analizatorze firmy Kodak 700 XR. Zasada oznaczeń oparta jest na metodzie kolorymetrycznej, w której uwolnione z transferyny, w pH = 4,0, jony żelazowe (Fe^{3+}) ulegają redukcji pod wpływem kwasu askorbinowego do jonów żelazowych (Fe^{2+}), a te łącząc się z barwnikiem tworzą barwny kompleks. [73].

W ramach kontroli jakości stosowano surowice kontrolne Codatrol I T 1340 i Codatrol II U 1342 firmy Kodak.

3.2.7. Oznaczanie stężenia miedzi i cynku w erytrocytach i osoczu.

Stężenie miedzi i cynku oznaczano metodą spektrofotometrii absorpcji atomowej [4,27,126], korzystając z aparatu firmy Perkin Elmer 2380, metodą płomieniową, stosując jako źródło światła wieloparametryczną katodową lampę próżniową (HCL).

Celem oznaczenia stężenia obu pierwiastków do badanej próbki 0,5ml osocza dodawano 2ml wody redestylowanej (rozcieńczenie 1:5) i po wymieszaniu umieszczano w aparacie. Próbkę ślepą (tło) stanowił 5% wodny roztwór glicerolu. Jako kalibratory stosowano roztwory wzorcowe dla miedzi i cynku o stężeniach 0,5 i 1,0mg/l firmy WZORMAT (Polish Committee for Standardization Measures and Quality Control).

Jako kontrolę jakości pomiarów stosowano surowice kontrolne Validate N firmy Organon Teknika USA, serii 5B308.

Przed rozpoczęciem oznaczeń próbek badanych, oznaczano poziom miedzi i cynku w surowicach kontrolnych, a uzyskane wartości zaznaczano w karcie kontroli metody, sprawdzając czy mieszczą się w wymaganym zakresie $\bar{x} \pm 2SD$ (dla Cu $\bar{x}=0,79\text{mg/l}\pm 0,024$; dla Zn $\bar{x}=2,33\text{mg/l}\pm 0,22$).

Przygotowany wg opisanego powyżej schematu hemolizat erytrocytów w ilości 0,5ml, rozcieńczano w stosunku 1:5 dodając 2,0ml wody redestylowanej i wprowadzano do aparatu celem oznaczenia pierwiastka.

Pozostałą część oznaczeń i kontroli wykonywano tak samo jak przy oznaczaniu Cu i Zn w osoczu.

3.3. Metody analizy statystycznej:

Obliczenia statystyczne zostały przeprowadzone przy pomocy komputera IBM, z wykorzystaniem zintegrowanego pakietu statystycznego Statgraphics.

Porównując dystrybuanty rzeczywiste (z próby) z teoretyczną w laplaso-regularnym układzie współrzędnych, stwierdzono, że oceniane parametry mają rozkłady normalne.

Wyniki badanych stężeń pierwiastków i aktywności enzymów przedstawiono w postaci średnich arytmetycznych i odchyłeń standardowych dla poszczególnych analizowanych grup. Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi obliczonymi dla poszczególnych podgrup kobiet i mężczyzn osób młodych i starszych zbadano stosując test dla dwóch średnich oparty na rozkładzie t (test t Studenta dla małych grup).

Zależności aktywności enzymów od stężenia pierwiastków będących ich kofaktorami określono podając równania prostych regresji (regresja liniowa) wyznaczonych metodą najmniejszych kwadratów, a następnie wyliczając współczynniki korelacji liniowej Pearsona. Istotność obliczonych współczynników zbadano porównując ich wartości z wartościami krytycznymi wyznaczonymi przy pomocy rozkładu t.

4. WYNIKI.

Aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz stężenia selenu oznaczono u wszystkich badanych, zarówno w grupie osób młodszych jak i starszych wiekiem, natomiast stężenia żelaza, cynku i miedzi - u 15 kobiet i 11 mężczyzn grupy I oraz u 26 kobiet i u 7 mężczyzn grupy II.

Porównanie średnich wartości badanych parametrów obliczonych oddzielnie dla kobiet i mężczyzn wykazało, że płeć nie różnicuje wyników probantów tak w obrębie grupy osób młodszych jak i starszych. (Tab. 5,6,7,8). Jednakże przez wzgląd na różne proporcje płci w składach obu grup oraz istotne różnice pomiędzy niektórymi analizowanymi wariacjami (Fe w grupie młodych, Cu w erytrocytach), wyniki oznaczeń kobiet i mężczyzn analizowano w całej pracy oddzielnie.

Tab. 5. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (Cat) i peroksydazy glutationowej (GSH-Px) w erytrocytach i osoczu osób młodych.

| Aktywność enzymu | Badane osoby | Zakres wartości | Wartość średnia $\bar{x} \pm SD$ | Istotność |
|--|-----------------------|-----------------|----------------------------------|-----------|
| SOD w erytrocytach (U/mg białka) | K _I (n=23) | 0,52-1,59 | 0,95±0,30 | nz |
| | M _I (n=17) | 0,40-1,49 | 0,83±0,29 | |
| Cat w erytrocytach (k/mg białka) | K _I (n=23) | 0,063-0,162 | 0,12±0,04 | nz |
| | M _I (n=17) | 0,05-0,19 | 0,11±0,03 | |
| GSH-Px w erytrocytach (U/mg białka x 10 ⁻³) | K _I (n=23) | 6,0-12,9 | 8,68±2,06 | nz |
| | M _I (n=17) | 6,0-12,7 | 8,80±1,71 | |
| GSH-Px w osoczu (U/ml) | K _I (n=23) | 0,063-0,178 | 0,11±0,03 | nz |
| | M _I (n=17) | 0,05-0,16 | 0,11±0,03 | |

K_I - kobiety grupy młodej, M_I - mężczyźni grupy młodej, nz - nieznamienne

Tab. 6. Stężenia żelaza (Fe), cynku (Zn), miedzi (Cu) i selenu (Se) w osoczu i erytrocytach osób młodych.

| Stężenia metali | Osoby badane | Zakres wartości | Wartość średnia $\bar{x} \pm SD$ | Istotność |
|--------------------------------------|------------------------|-----------------|----------------------------------|-----------|
| Fe w osoczu ($\mu\text{Mol/l}$) | K _I (n=15) | 8,30-31,50 | 18,74 \pm 7,73 | nz |
| | M _I (n=11) | 12,70-22,0 | 18,66 \pm 2,84 | |
| Zn w osoczu (mg/l) | K _I (n= 15) | 0,83-1,21 | 1,0 \pm 0,12 | nz |
| | M _I (n=11) | 0,69-1,14 | 0,92 \pm 0,14 | |
| Zn w erytrocytach (ng/mg białka) | K _I (n=15) | 6,46-30,27 | 17,69 \pm 7,02 | nz |
| | M _I (n=11) | 6,15-23,85 | 14,74 \pm 5,47 | |
| Cu w osoczu (mg/l) | K _I (n=15) | 0,62-1,19 | 0,83 \pm 0,18 | nz |
| | M _I (n=11) | 0,63-1,0 | 0,77 \pm 0,11 | |
| Cu w erytrocytach (ng/mg białka) | K _I (n=15) | 0,93-2,04 | 1,51 \pm 0,33 | nz |
| | M _I (n=11) | 0,65-2,48 | 1,65 \pm 0,62 | |
| Se w osoczu (ng/ml) | K _I (n=23) | 42,46-97,25 | 64,06 \pm 16,43 | nz |
| | M _I (n=17) | 39,45-87,25 | 61,84 \pm 12,86 | |
| Se w erytrocytach (ng/g białka) | K _I (n=23) | 54,25-227,04 | 148,37 \pm 52,72 | nz |
| | M _I (n=17) | 43,31-262,33 | 157,79 \pm 64,99 | |

K_I - kobiety grupy młodej, M_I - mężczyźni grupy młodej, nz - nieznamiennie

Tab. 7. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (Cat) i peroksydazy glutationowej (GSH-Px) w erytrocytach i osoczu osób starszych.

| Aktywność enzymu | Badane osoby | Zakres wartości | Wartość średnia $\bar{x} \pm SD$ | Istotność |
|---|------------------------|-----------------|----------------------------------|-----------|
| SOD w erytrocytach (U/mg białka) | K _{II} (n=40) | 0,17-1,33 | 0,74 \pm 0,28 | nz |
| | M _{II} (n=13) | 0,40-1,44 | 0,82 \pm 0,32 | |
| Cat w erytrocytach (k/mg białka) | K _{II} (n=40) | 0,047-0,210 | 0,11 \pm 0,04 | nz |
| | M _{II} (n=13) | 0,07-0,20 | 0,13 \pm 0,05 | |
| GSH-Px w erytrocytach (U/mg białka x 10 ⁻³) | K _{II} (n=40) | 4,80-11,80 | 7,55 \pm 1,80 | nz |
| | M _{II} (n=13) | 5,30-10,20 | 7,43 \pm 1,59 | |
| GSH-Px w osoczu (U/ml) | K _{II} (n=40) | 0,05-0,14 | 0,086 \pm 0,02 | nz |
| | M _{II} (n=13) | 0,05-0,15 | 0,087 \pm 0,03 | |

K_{II} - kobiety grupy starszej, M_{II} - mężczyźni grupy starszej, nz - nieznamiennie

Tab. 8. Stężenia żelaza (Fe), cynku (Zn), miedzi (Cu) i selenu (Se) w osoczu i erytrocytach osób starszych.

| Stężenia metali | Osoby badane | Zakres wartości | Wartość średnia $\bar{x} \pm SD$ | Istotność |
|--------------------------------------|------------------------|-----------------|-------------------------------------|-----------|
| Fe w osoczu ($\mu\text{Mol/l}$) | K _{II} (n=26) | 12,1-26,20 | 17,59 \pm 3,68 | nz |
| | M _{II} (n=7) | 13,3-27,80 | 20,24 \pm 4,83 | |
| Zn w osoczu (mg/l) | K _{II} (n=26) | 0,68-1,10 | 0,89 \pm 0,11 | nz |
| | M _{II} (n=7) | 0,76-0,99 | 0,85 \pm 0,09 | |
| Zn w erytrocytach (ng/mg białka) | K _{II} (n=26) | 6,02-27,30 | 16,29 \pm 5,61 | nz |
| | M _{II} (n=7) | 7,80-23,40 | 14,16 \pm 5,16 | |
| Cu w osoczu (mg/l) | K _{II} (n=26) | 0,72-1,23 | 0,96 \pm 0,13 | nz |
| | M _{II} (n=7) | 0,78-1,21 | 0,98 \pm 0,14 | |
| Cu w erytrocytach (ng/mg białka) | K _{II} (n=26) | 0,80-2,62 | 1,62 \pm 0,49 | nz |
| | M _{II} (n=7) | 1,20-2,75 | 1,83 \pm 0,58 | |
| Se w osoczu (ng/ml) | K _{II} (n=40) | 33,90-104,70 | 60,71 \pm 18,05 | nz |
| | M _{II} (n=13) | 42,24-101,50 | 67,07 \pm 18,60 | |
| Se w erytrocytach (ng/g białka) | K _{II} (n=40) | 36,34-179,34 | 97,95 \pm 38,63 | nz |
| | M _{II} (n=13) | 29,30-155,04 | 104,03 \pm 32,72 | |

K_{II} - kobiety grupy starszej, M_{II} - mężczyźni grupy starszej, nz - nieznamienne

Celem oceny wpływu wieku na aktywność wybranych enzymów antyoksydacyjnych, a także na stężenie pierwiastków we krwi porównano średnie wartości badanych parametrów pomiędzy grupami kobiet i mężczyzn młodych i w wieku podeszłym. Zestawienie wartości średnich z odchyleniami standardowymi oraz poziomem istotności ich różnic przedstawiono w tabelach (Tab. 9 i 10).

Tab. 9. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (Cat) i peroksydazy glutationowej (GSH-Px) w erytrocytach (E) i w osoczu w poszczególnych grupach.

| Aktywność enzymu | Kobiety | | Istotność p | Mężczyźni | | Istotność p |
|---|-----------------------|-------------------------|-------------|------------------------|------------------------|-------------|
| | młode $\bar{x}\pm SD$ | starsze $\bar{x}\pm SD$ | | młodzi $\bar{x}\pm SD$ | starsi $\bar{x}\pm SD$ | |
| SOD w E (U/mg białka) | 0,95±0,30 | 0,74±0,28 | p≤0,01 | 0,83±0,29 | 0,82±0,32 | nz |
| Cat w E (k/mg białka) | 0,12±0,04 | 0,11±0,04 | nz | 0,11±0,03 | 0,13±0,05 | nz |
| GSH-Px w E (U/mg białka ×10 ⁻³) | 8,68±2,06 | 7,55±1,80 | p≤0,05 | 8,80±1,71 | 7,43±1,59 | p≤0,05 |
| GSH-Px w osoczu (U/ml) | 0,11±0,03 | 0,086±0,02 | p≤0,001 | 0,11±0,03 | 0,087±0,03 | p≤0,05 |

Tab. 10. Stężenia żelaza (Fe), cynku (Zn), miedzi (Cu) i selenu (Se) w osoczu i erytrocytach (E) w poszczególnych grupach.

| Stężenia metali | Kobiety | | Istotność p | Mężczyźni | | Istotność p |
|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-------------|------------------------|------------------------|-------------|
| | młode $\bar{x}\pm SD$ | starsze $\bar{x}\pm SD$ | | młodzi $\bar{x}\pm SD$ | starsi $\bar{x}\pm SD$ | |
| Fe w osoczu (μMol/l) | 18,74±7,73 | 17,59±3,68 | nz | 18,66±2,84 | 20,24±4,83 | nz |
| Zn w osoczu (mg/l) | 1,0±0,12 | 0,89±0,11 | p.≤0,01 | 0,92±0,14 | 0,85±0,09 | nz |
| Zn w E (ng/mg białka) | 17,69±7,02 | 16,29±5,61 | nz | 14,74±5,47 | 14,16±5,16 | nz |
| Cu w osoczu (mg/l) | 0,83±0,18 | 0,96±0,13 | p≤0,01 | 0,77±0,11 | 0,98±0,14 | p≤0,005 |
| Cu w E (ng/mg białka) | 1,51±0,33 | 1,62±0,49 | nz | 1,65±0,62 | 1,83±0,58 | nz |
| Se w osoczu (ng/ml) | 64,06±16,43 | 60,71±18,05 | nz | 61,84±12,86 | 67,07±18,60 | nz |
| Se w E (ng/g białka) | 148,37±52,72 | 97,95±38,63 | p≤0,0001 | 157,79±64,99 | 104,03±32,72 | p≤0,01 |

\bar{x} - wartość średnia, SD - odchylenie standardowe, nz - nieznamiennie

4.1. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych.

Aktywność enzymów antyoksydacyjnych była w analizowanych grupach wiekowych zróżnicowana. (Tab. 9 oraz Ryc. 1,2,3).

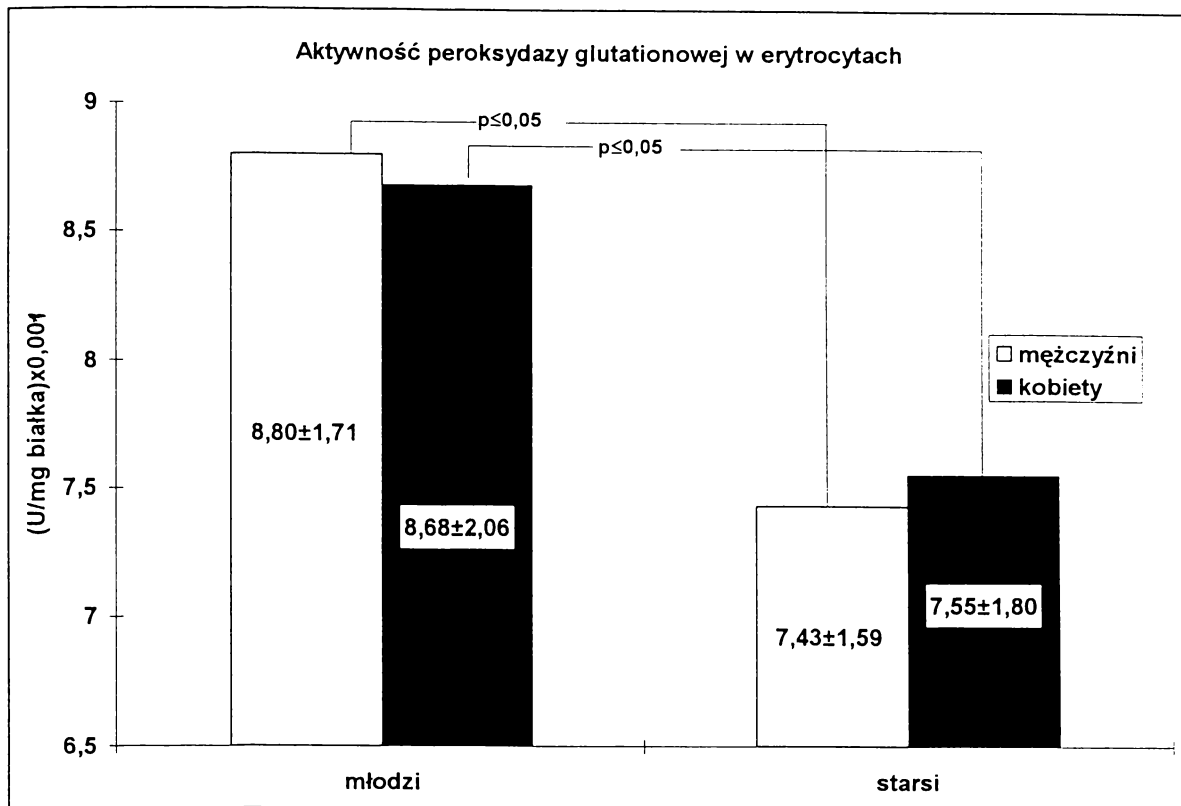
4.1.1. Peroksydaza glutationowa.

Aktywność peroksydazy glutationowej w erytrocytach i w osoczu była zarówno u kobiet jak i u mężczyzn istotnie niższa u osób w wieku podeszłym.

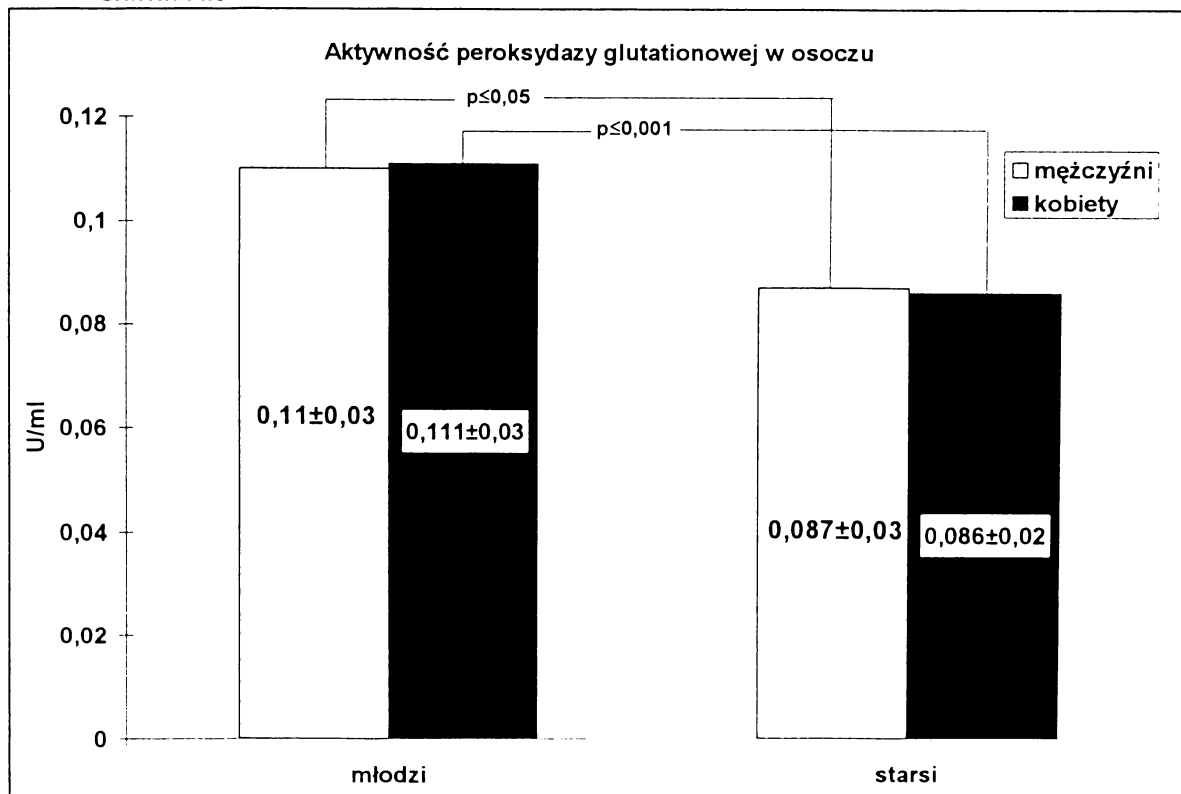
Średnia wartość aktywności GSH-Px w krwinkach czerwonych starszych kobiet wynosiła $7,55 \pm 1,8$ U/mg białka $\times 10^{-3}$, podczas gdy u kobiet młodych $\bar{x}=8,68 \pm 2,06$ U/mg białka $\times 10^{-3}$ ($p \leq 0,05$). Podobne zachowanie się aktywności peroksydazy krwinkowej obserwowano u mężczyzn. Aktywność GSH-Px w grupie starszej wynosiła średnio $7,43 \pm 1,59$ U/mg białka $\times 10^{-3}$, a u mężczyzn młodszych - $8,8 \pm 1,71$ U/mg białka $\times 10^{-3}$, ($p \leq 0,05$). (Ryc.1).

Aktywność peroksydazy glutationowej w osoczu była w młodszych grupach kobiet i mężczyzn bardzo podobna ($\bar{x}=0,11 \pm 0,03$ U/ml) i znamienne wyższa w porównaniu z aktywnością tego enzymu u starszych kobiet ($\bar{x}=0,086 \pm 0,02$ U/ml; $p \leq 0,001$) i mężczyzn ($\bar{x}=0,087 \pm 0,03$; $p \leq 0,05$). (Ryc.2).

Ryc. 1. Aktywność peroksydazy glutationowej w erytrocytach - wartości średnie i odchylenia standardowe.



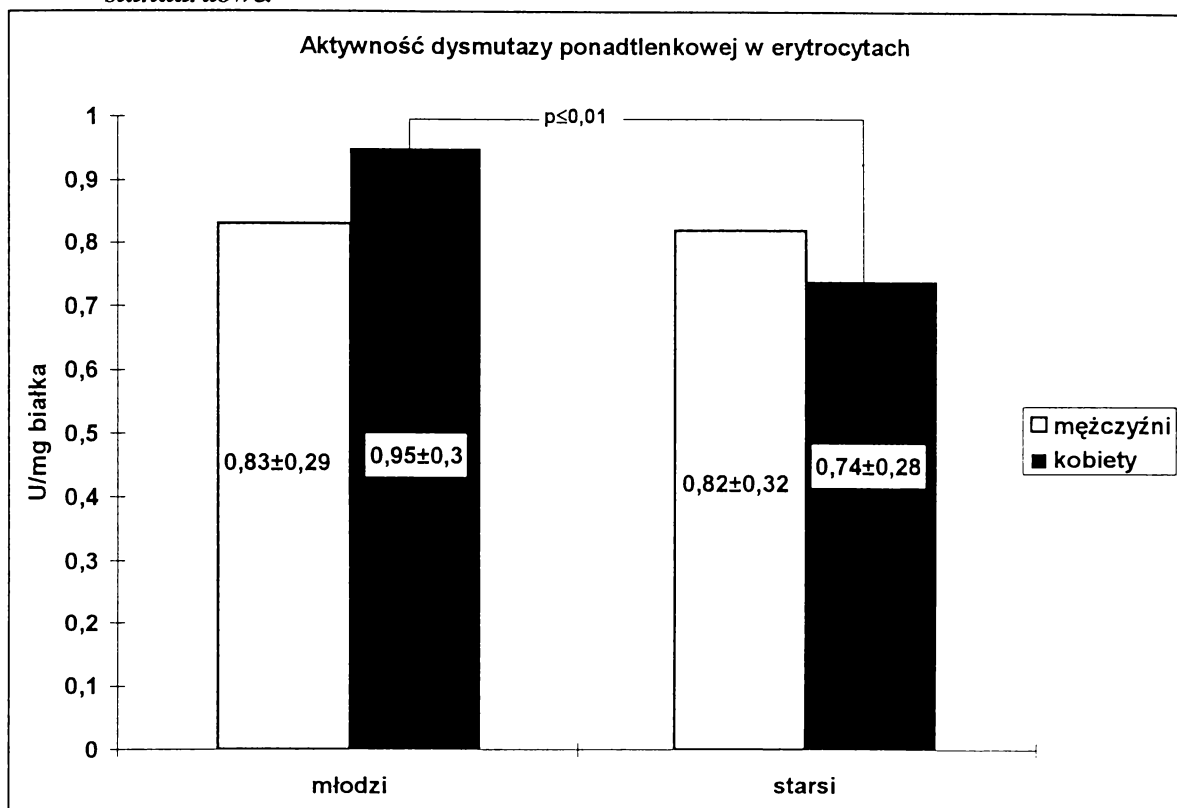
Ryc. 2. Aktywność peroksydazy glutationowej w osoczu - wartości średnie i odchylenia standardowe.



4.1.2. Dysmutaza ponadtlenkowa.

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w erytrocytach młodych kobiet wynosiła średnio $0,95 \pm 0,3$ U/mg białka i była istotnie wyższa ($p \leq 0,01$) niż aktywność tego enzymu w grupie kobiet starszych, u których $\bar{x} = 0,74 \pm 0,28$ U/mg białka. U mężczyzn natomiast aktywność SOD nie różniła się i wynosiła średnio $0,83 \pm 0,29$ U/mg białka u młodych i $0,82 \pm 0,32$ U/mg białka w wieku starszym. (Ryc.3).

Ryc. 3. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w erytrocytach - wartości średnie i odchylenia standardowe.



4.1.3. Katalaza.

We wszystkich badanych grupach stwierdzono zbliżoną aktywność katalazy w erytrocytach; $\bar{x} = 0,11 \pm 0,04$ k/mg białka w grupie starszych kobiet i młodych mężczyzn, $0,12 \pm 0,04$ k/mg białka u młodych kobiet i $0,13 \pm 0,05$ k/mg białka u starszych mężczyzn. (Tab. 9.)

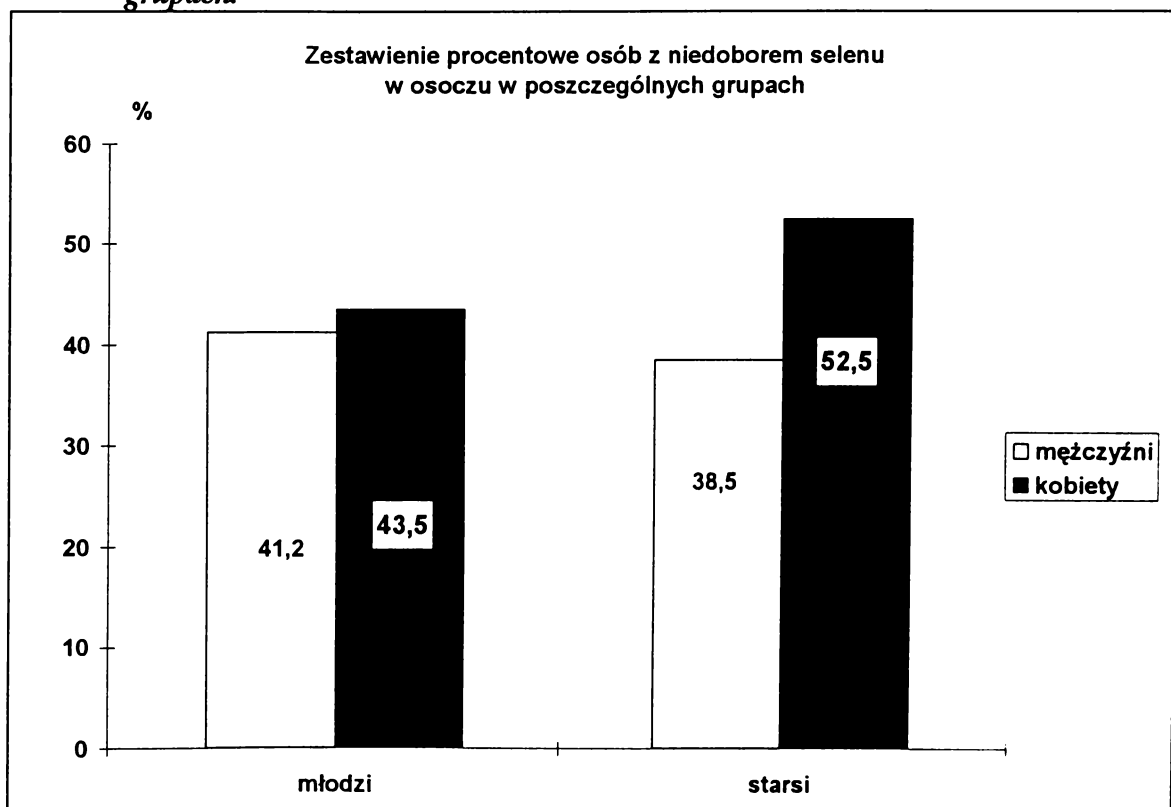
4.2. Stężenia selenu, miedzi, cynku i żelaza.

4.2.1. Selen w osoczu i erytrocytach.

We wszystkich podgrupach kobiet i mężczyzn średnie stężenia selenu w osoczu były podobne, najniższe $60,71 \pm 18,05 \text{ ng/ml}$ u starszych kobiet, najwyższe $67,07 \pm 18,6 \text{ ng/ml}$ w osoczu starszych mężczyzn. (Tab. 10).

Natomiast ocena indywidualnych jego stężeń w osoczu wykazała duże zróżnicowanie. W odniesieniu do prawidłowego stężenia selenu pomiędzy 60 a 120 ng/ml , stwierdzono u 43 osób (46% wszystkich badanych) stężenia poniżej normy, w tym najczęściej u kobiet w wieku podeszłym (u 52,5%). (Ryc.4).

Ryc. 4 Zestawienie procentowe osób z niedoborem selenu w osoczu w poszczególnych grupach.

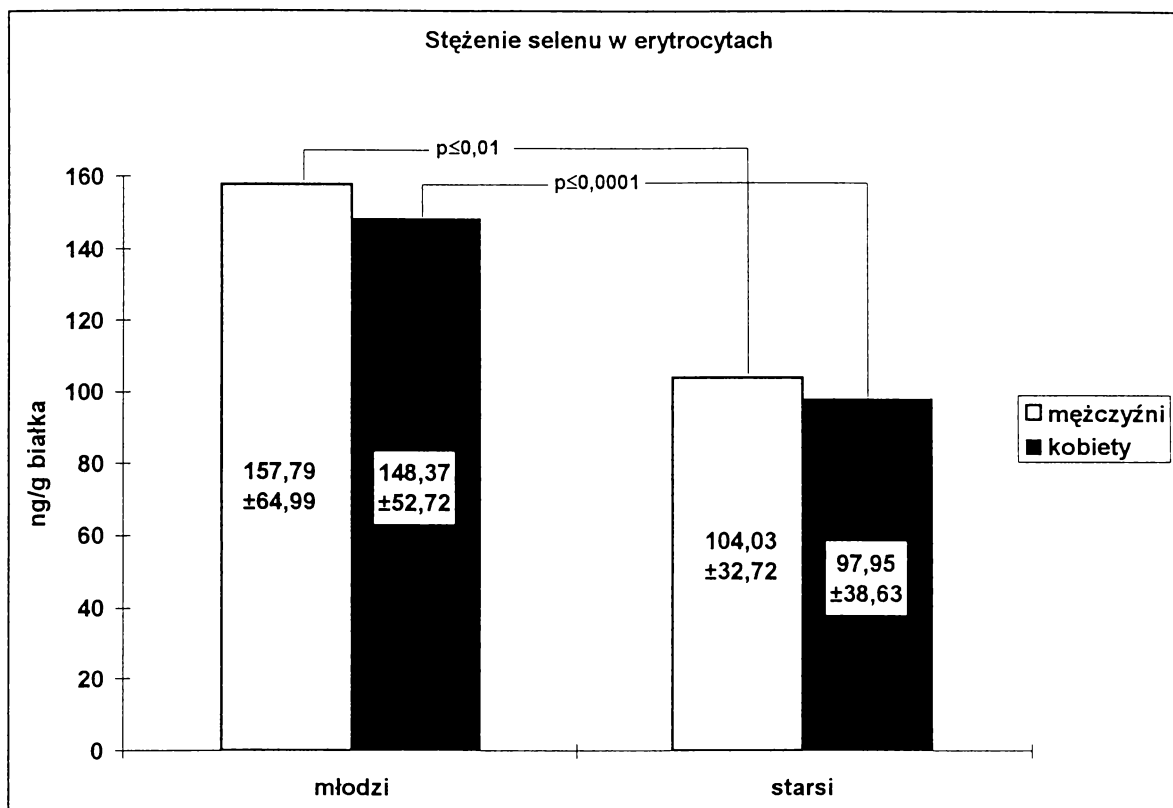


Inaczej natomiast zachowywały się średnie stężenia selenu w erytrocytach.

W krwinkach czerwonych kobiet w wieku podeszłym wynosiło ono $97,95 \pm 38,63 \text{ ng/g}$ białka i było istotnie niższe w porównaniu ze średnim stężeniem selenu w erytrocytach

kobiet młodych $\bar{x}=148,37\pm 52,72\text{ng/g}$ białka, ($p\leq 0,0001$). Różnica średnich stężeń Se w erytrocytach mężczyzn starszych ($\bar{x}=104,03\pm 32,72\text{ng/mg}$ białka) i młodych ($\bar{x}=157,79\pm 64,99\text{ng/g}$ białka) jest również istotna, $p\leq 0,01$. (Ryc.5).

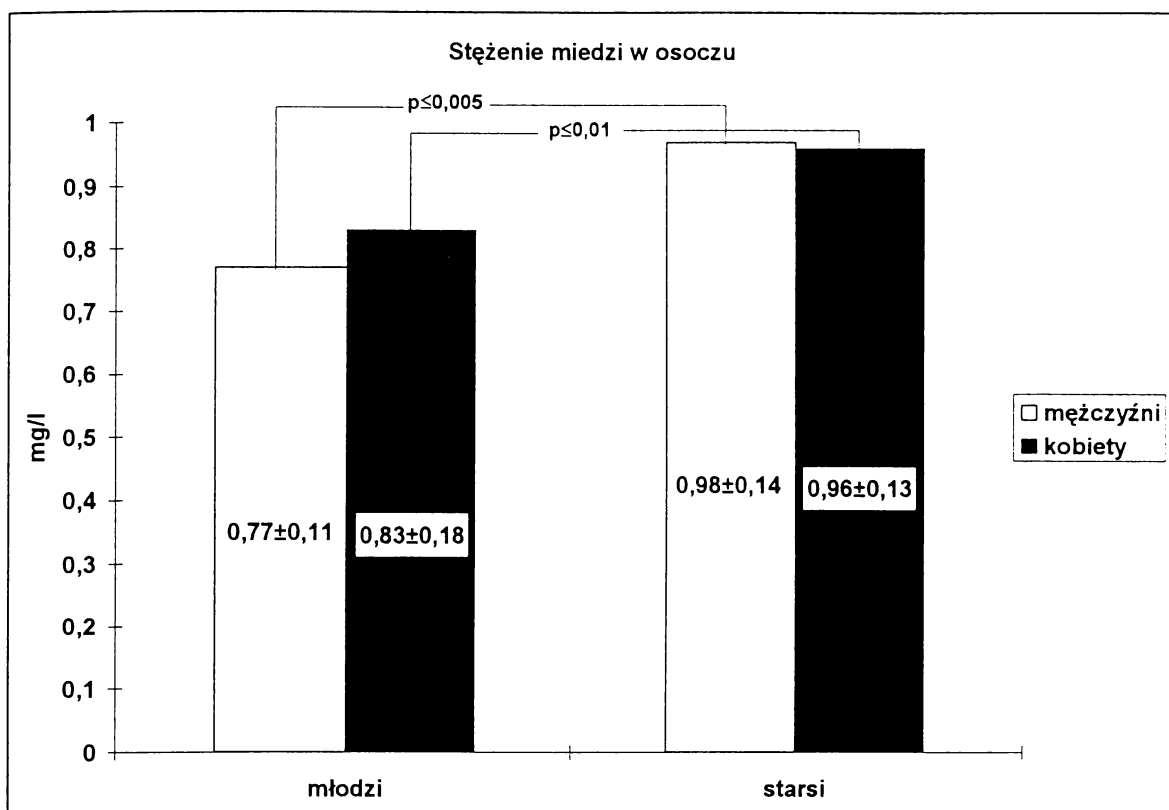
Ryc. 5. Stężenie selenu w erytrocytach w poszczególnych grupach - wartości średnie i odchylenia standardowe.



4.2.2. Miedź w osoczu i krwinkach czerwonych.

W osoczu zakres indywidualnych stężeń miedzi zawierał się w granicach od 0,62 do 1,23mg/l. U pięciu młodych osób (3 kobiet i 2 mężczyzn) stwierdzono stężenia nieco niższe (0,62-0,68mg/l) od prawidłowego, które zgodnie z zakresem referencyjnym pracowni powinny wynosić 0,7-1,4mg/l. U kobiet i mężczyzn w wieku podeszłym stężenie miedzi w osoczu było istotnie wyższe w porównaniu z osobami młodymi tej samej płci; dla mężczyzn $p\leq 0,005$, a dla kobiet $p\leq 0,01$. (Ryc.6).

Ryc. 6 Stężenie miedzi w osoczu w poszczególnych grupach - wartości średnie i odchylenia standardowe.

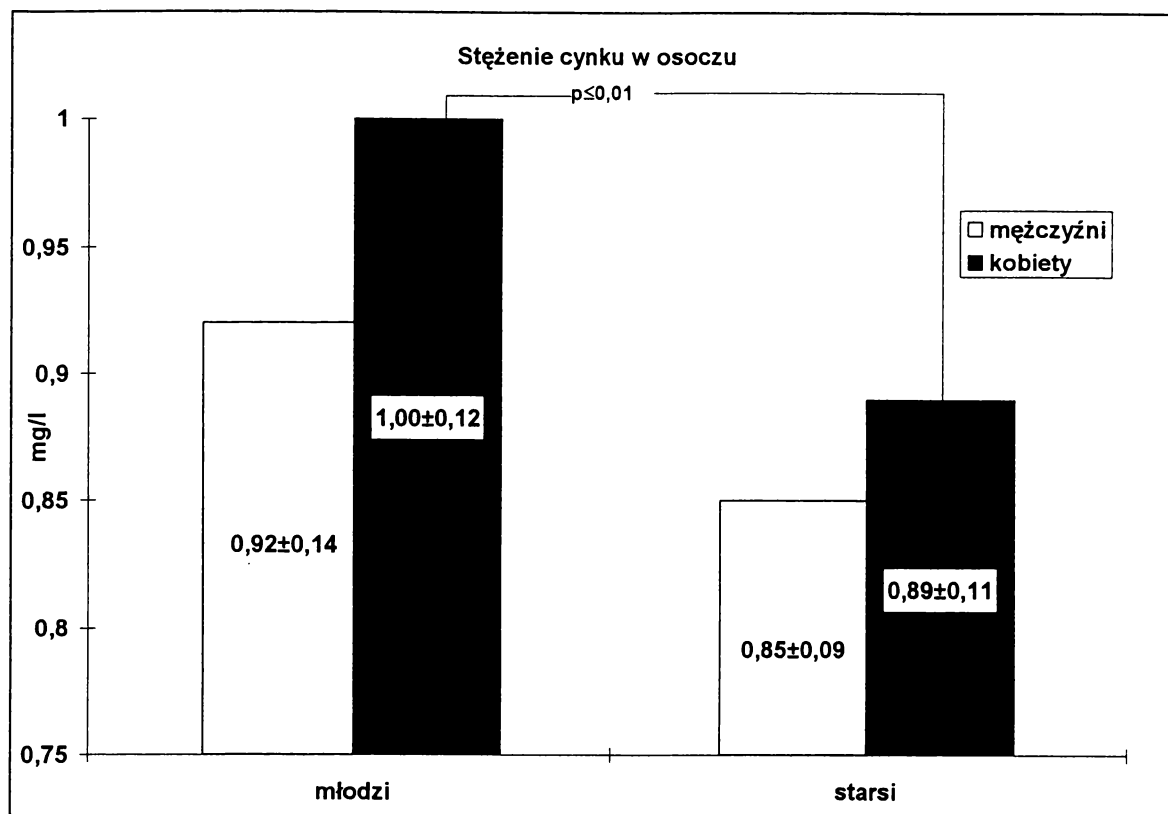


Pomimo znamiennej różnicy w osoczu, stężenia miedzi w krwinkach czerwonych były we wszystkich badanych podgrupach podobne (Tab. 10).

4.2.3. Cynk w osoczu i erytrocytach.

Stężenia cynku w osoczu wynosiły od 0,68 do 1,2mg/l i nie przekroczyły zakresu normy pracowni (0,5-1,2mg/l). Były one niższe u osób starszych obojga płci przy czym różnica u kobiet osiągnęła znamienność statystyczną przy $p \leq 0,01$. (Ryc.7).

Ryc. 7. Stężenie cynku w osoczu w poszczególnych grupach - wartości średnie i odchylenia standardowe.



Stężenie cynku w erytrocytach nie różniło się istotnie w poszczególnych grupach, kształtując się od $14,16 \pm 5,16$ ng/mg białka w grupie starszych mężczyzn do $17,69 \pm 7,02$ ng/mg białka w grupie młodych kobiet. (Tab. 10)

4.2.4. Żelazo w osoczu.

U wszystkich badanych stężenia żelaza w osoczu wynosiły od 8,3 do 31,5 $\mu\text{mol/l}$ mieszcząc się w zakresie wartości referencyjnych (6,6-32,4 $\mu\text{mol/l}$) [73].

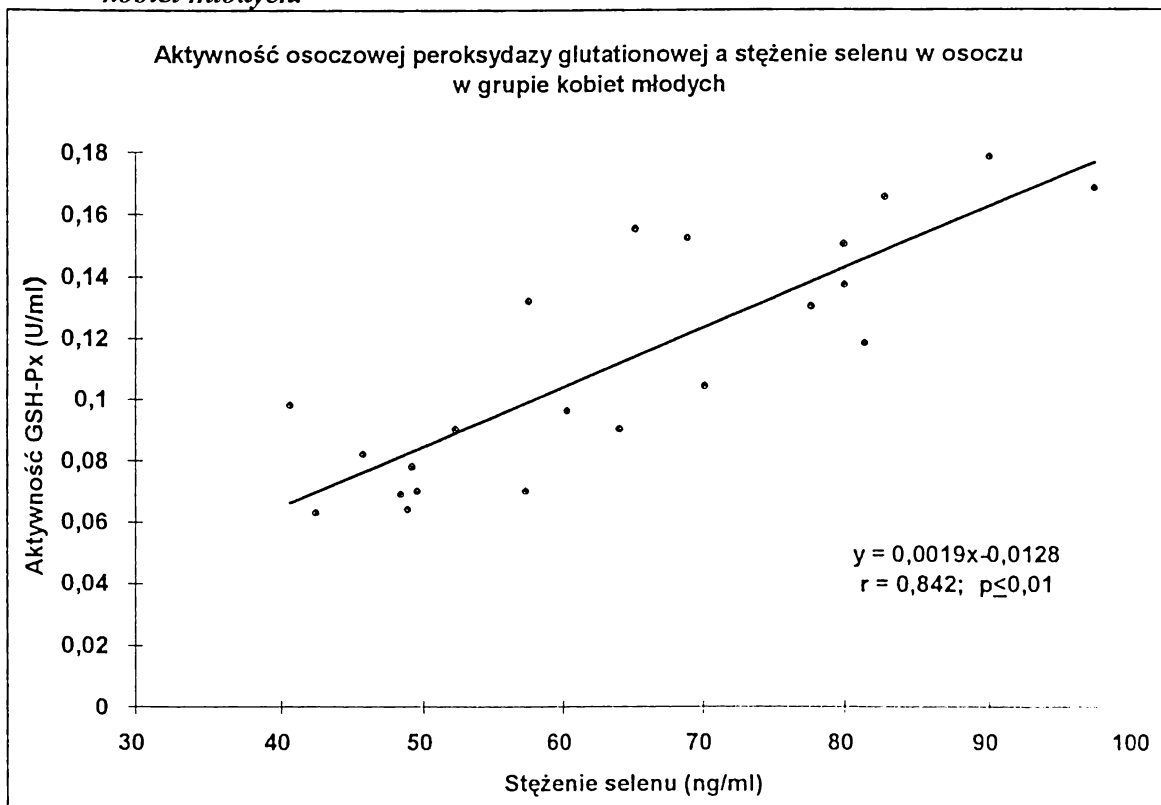
Aczkolwiek średnie stężenie żelaza było najniższe u kobiet starszych ($17,59 \pm 3,68$ $\mu\text{mol/l}$), a najwyższe - $20,24 \pm 4,84$ $\mu\text{mol/l}$ - w grupie starszych mężczyzn, to różnice pomiędzy grupami wiekowymi, podobnie jak między płcią męską i żeńską nie były statystycznie istotne. (Tab. 10).

4.3. Aktywność enzymów a stężenia badanych pierwiastków.

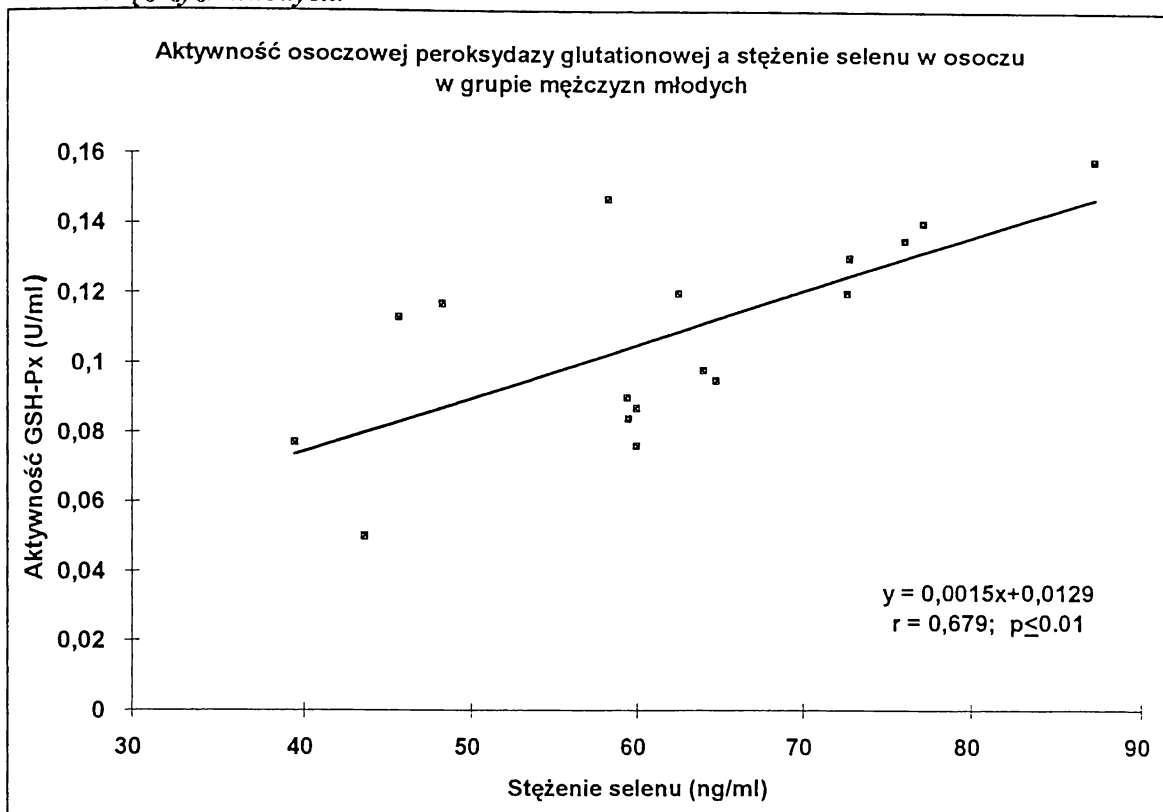
4.3.1. Peroksydaza glutationowa.

Badając korelację pomiędzy stężeniem selenu w osoczu a aktywnością osoczowej peroksydazy glutationowej stwierdzono istotny ($p \leq 0,01$) związek jej aktywności ze stężeniem selenu we wszystkich badanych grupach kobiet i mężczyzn. Najwyższy współczynnik korelacji ($r=0,842$) występował w grupie młodych kobiet, współczynniki korelacji w pozostałych grupach były do siebie zbliżone. Wykresy prostych regresji wraz z równaniami i współczynnikami korelacji liniowej przedstawiono na ryc. 8-11.

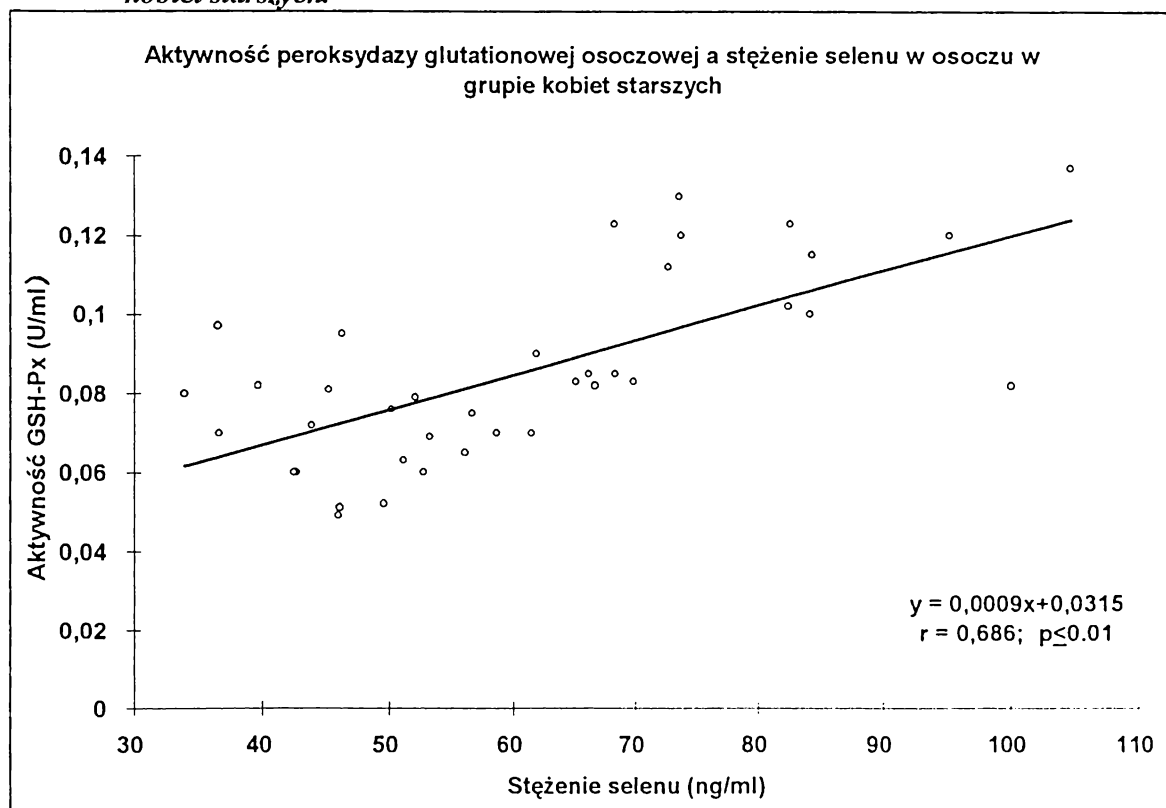
Ryc. 8. Aktywność osoczowej peroksydazy glutationowej a stężenie selenu w osoczu w grupie kobiet młodych.



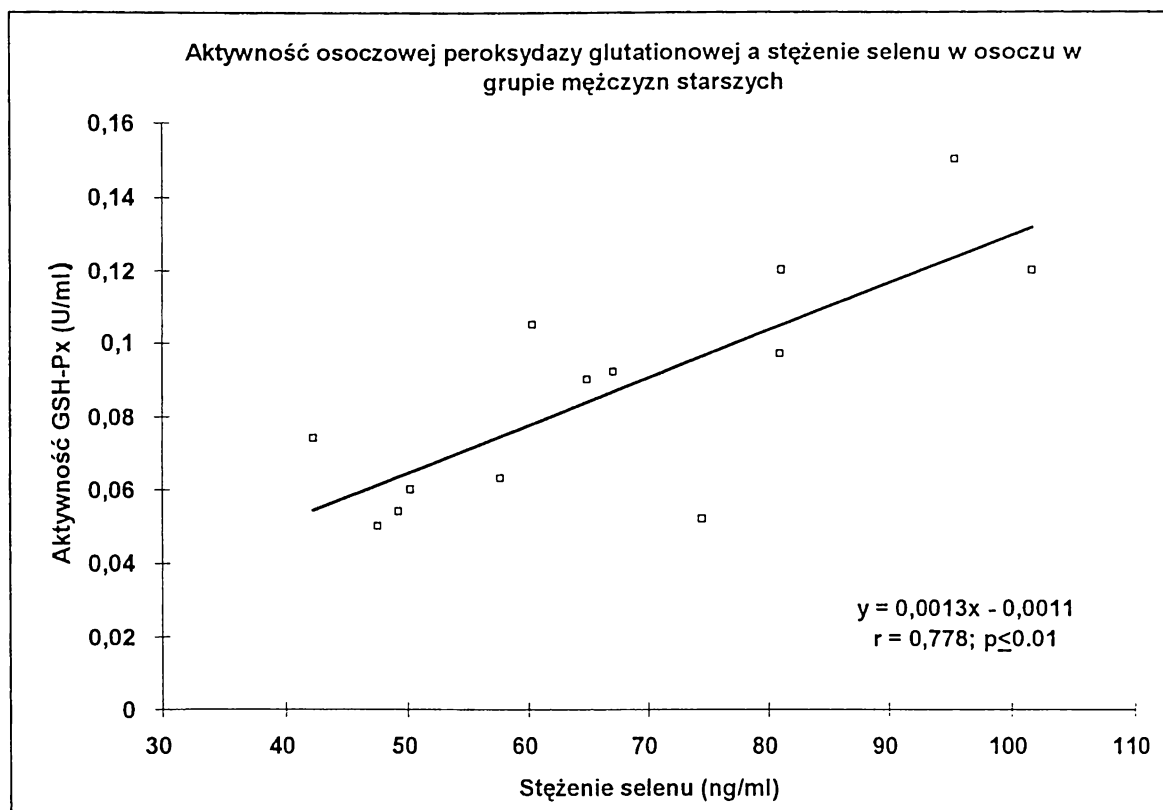
Ryc. 9. Aktywność osoczowej peroksydazy glutationowej a stężenie selenu w osoczu w grupie mężczyzn młodych.



Ryc. 10. Aktywność osoczowej peroksydazy glutationowej a stężenie selenu w osoczu w grupie kobiet starszych.

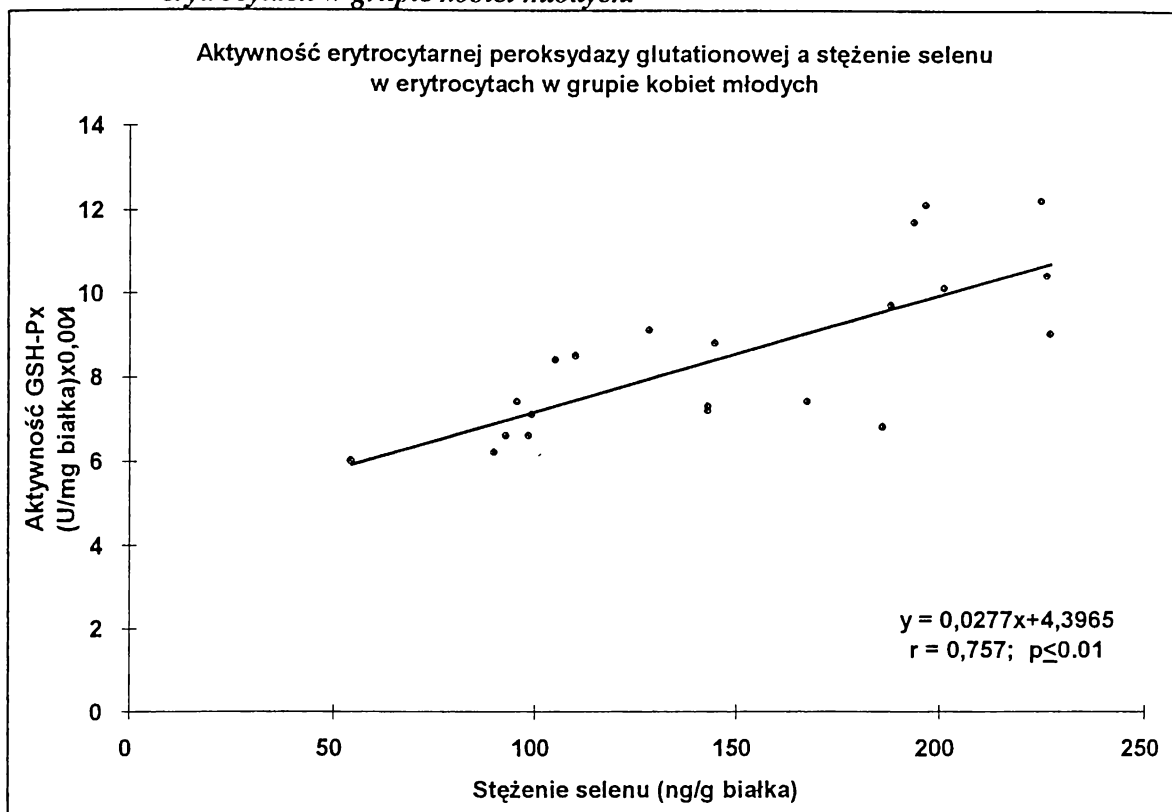


Ryc. 11. Aktywność osoczowej peroksydazy glutationowej a stężenie selenu w osoczu w grupie mężczyzn starszych.

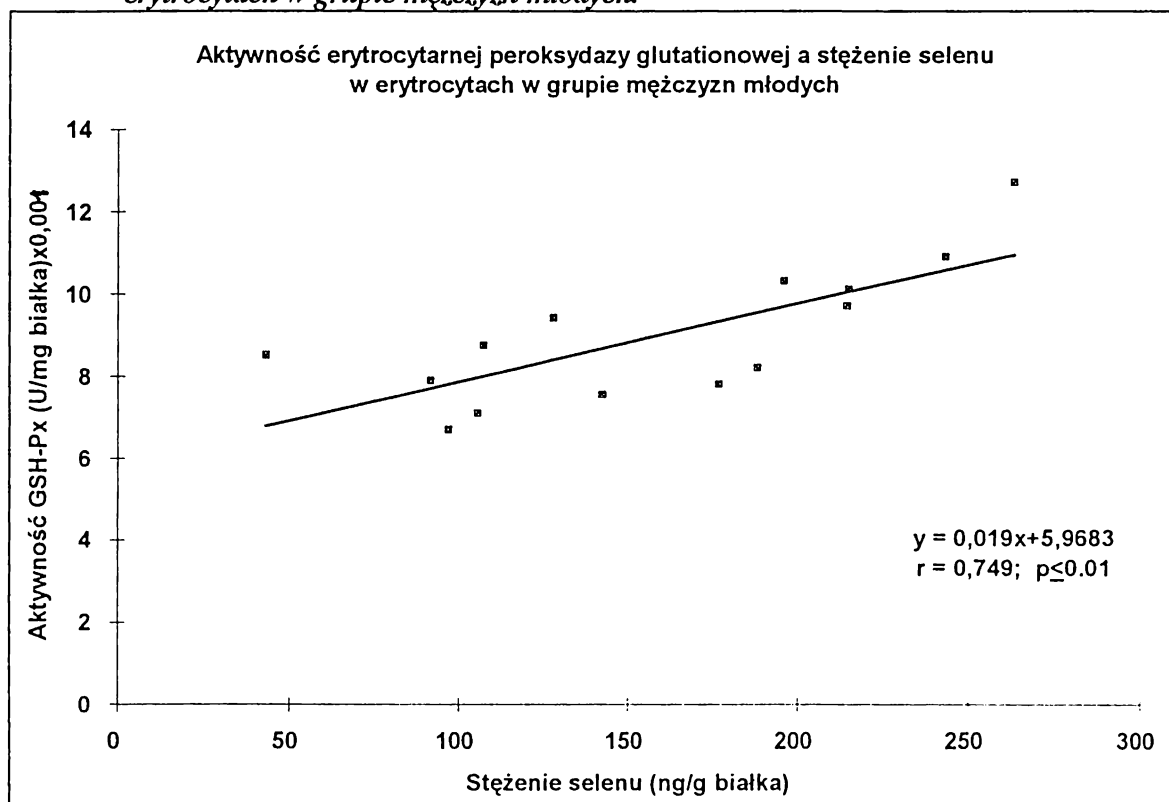


Zestawienie stężenia selenu w erytrocytach z aktywnością erytrocytamej peroksydazy glutationowej także wykazało związek aktywności enzymu krwinkowego ze stężeniem pierwiastka będącego jego kofaktorem. Zależność tę obserwowano zarówno w grupie osób młodych (tak wśród kobiet $r=0,757$, jak i mężczyzn $r=0,749$), jak i w grupie starszej (odpowiednio $r=0,643$ dla kobiet i $r=0,744$ dla mężczyzn), przy poziomie istotności $p \leq 0,01$. Ryciny 12-15 ilustrują równania i proste regresji oraz współczynniki korelacji w poszczególnych badanych grupach.

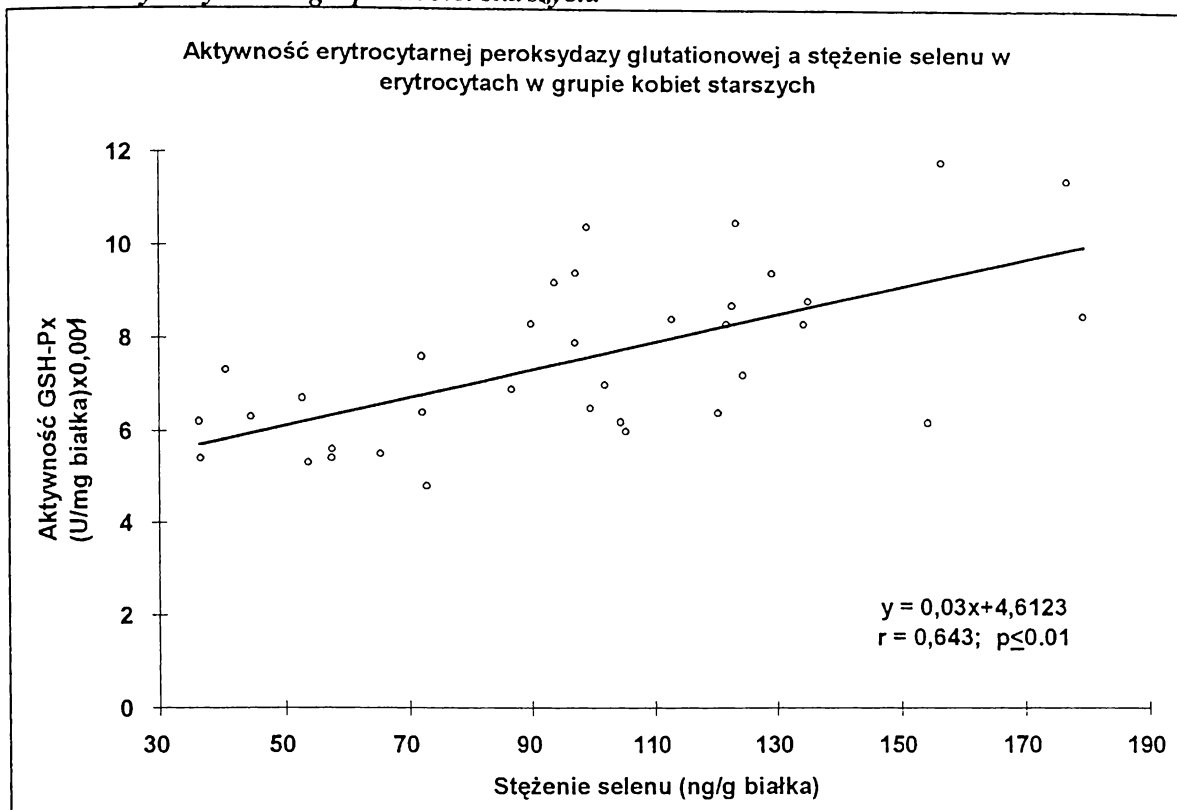
Ryc. 12. Aktywność erytrocytarnej peroksydazy glutationowej a stężenie selenu w erytrocytach w grupie kobiet młodych.



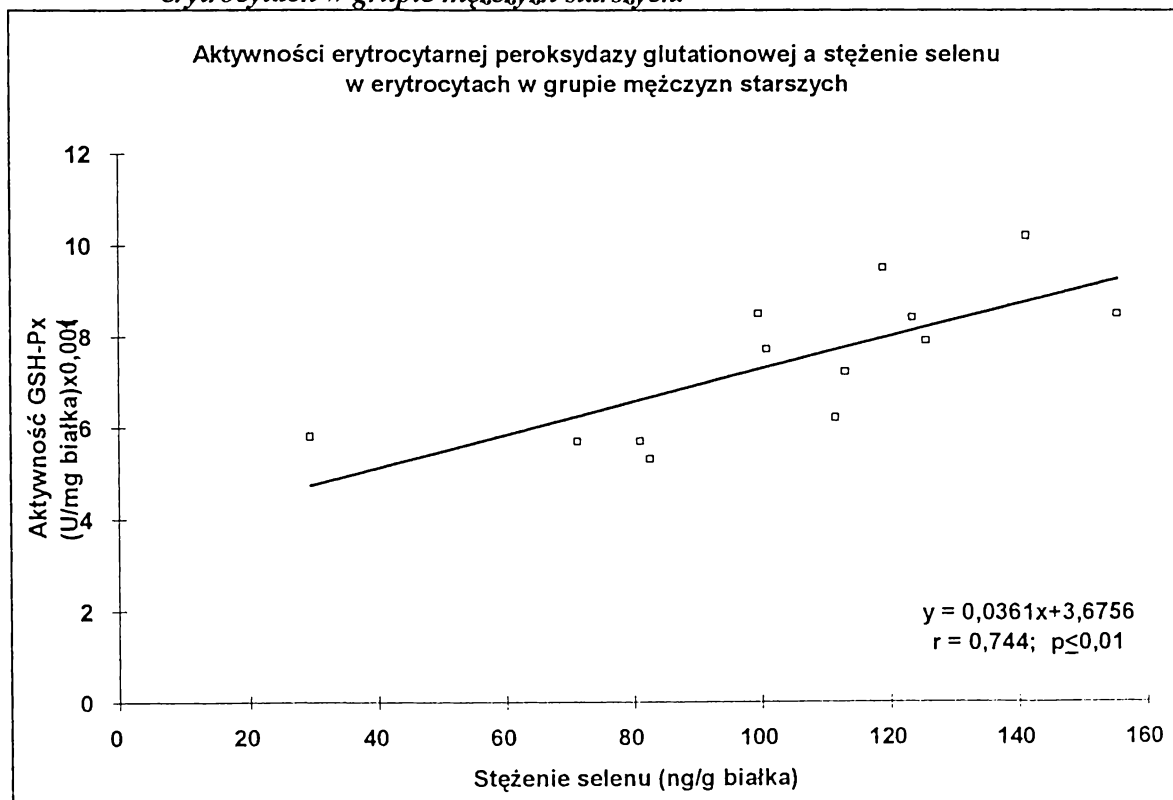
Ryc. 13. Aktywność erytrocytarnej peroksydazy glutationowej a stężenie selenu w erytrocytach w grupie mężczyzn młodych.



Ryc. 14. Aktywność erytrocytarnej peroksydazy glutationowej a stężenie selenu w erytrocytach w grupie kobiet starszych.



Ryc. 15. Aktywność erytrocytarnej peroksydazy glutationowej a stężenie selenu w erytrocytach w grupie mężczyzn starszych.

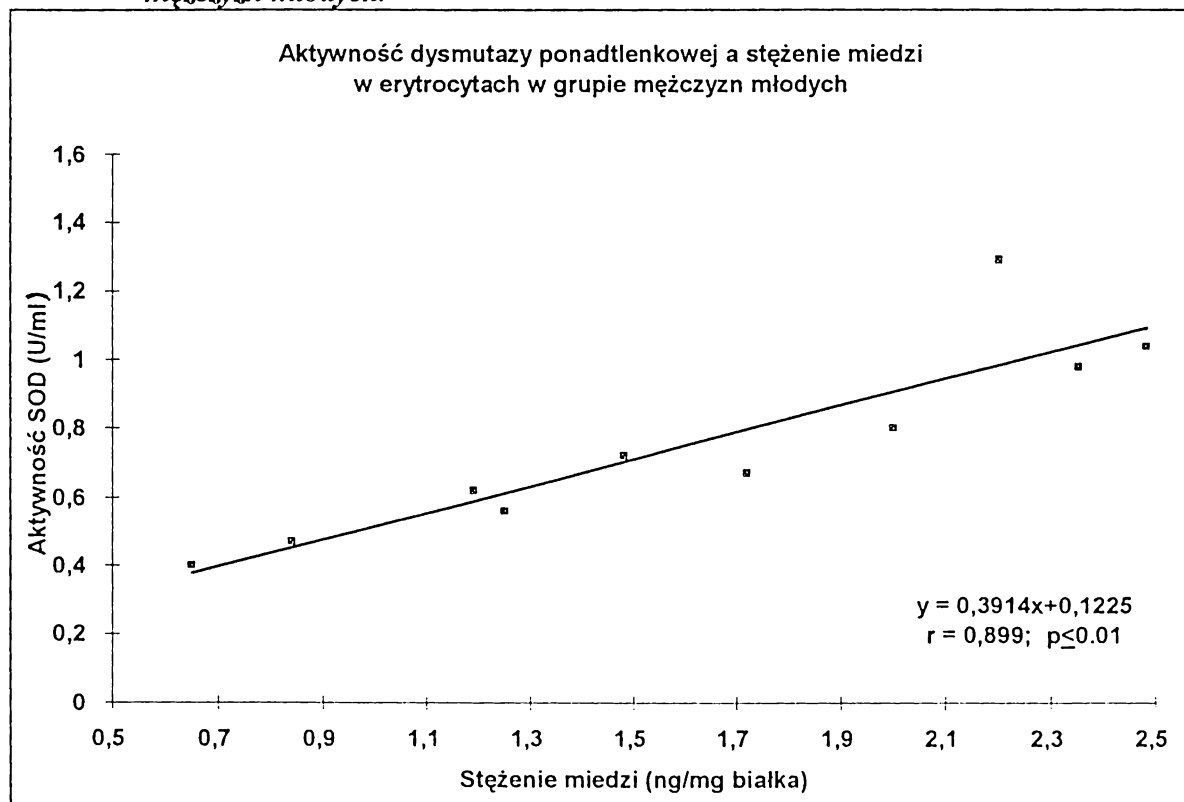


Nie stwierdzono znamiennej powiązania aktywności erytrocytarnej peroksydazy glutationowej ze stężeniami żelaza (wsp. korelacji wynosiły $r=0,078$ i $0,166$ w podgrupach starszych i młodych kobiet i $r=0,004$ i $0,324$ w podgrupach starszych i młodych mężczyzn) jak i miedzi w osoczu ($r=0,222$ i $0,412$ dla starszych i młodszych kobiet oraz $r=0,456$ i $0,183$ dla starszych i młodszych mężczyzn). Podobnie nie obserwowano związku pomiędzy stężeniami żelaza a aktywnością katalazy ($r=0,139$ i $0,047$ w podgrupach kobiet, $r=0,487$ i $0,376$ w podgrupach mężczyzn).

4.3.2. Dysmutaza ponadtlenkowa.

Tylko w grupie młodych mężczyzn obserwowano korelację ($r=0,899$; $p\leq 0,01$) pomiędzy aktywnością SOD a stężeniem miedzi w erytrocytach. Zależność tę ilustruje Ryc. 16. Nie znaleziono podobnej korelacji w pozostałych badanych grupach. W przeprowadzonych badaniach nie występowała również zależność między aktywnością SOD a stężeniem cynku tak w osoczu jak i w erytrocytach.

Ryc. 16. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej a stężenie miedzi w erytrocytach w grupie mężczyzn młodych.



5. OMÓWIENIE WYNIKÓW

5.1. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych a procesy starzenia.

Od czasu ogłoszenia w 1956r. przez D. Harmana wolnorodnikowej teorii starzenia [55] wiele wysiłku włożono w poszukiwanie związków pomiędzy działaniem reaktywnych form tlenu a rozwojem zmian starczych, a także w określenie znaczenia obrony antyoksydacyjnej w procesie starzenia. Zależność pomiędzy maksymalnym czasem trwania życia a aktywnością niektórych enzymów antyoksydacyjnych i stężeniami innych antyoksydantów jak β -karotenu, α -tokoferolu czy kwasu moczowego wykazali w swoich badaniach Cutler [33] i Sohal [159]. Uważając, że długość życia jest ograniczona zdolnością organizmu do przeciwdziałania reaktywnym formom tlenu, Cutler nazwał geny zawiadujące syntezą i aktywnością enzymów antyoksydacyjnych: peroksydazy glutationowej, dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy genami "determinującymi długość życia" (longevity determinant genes), a różnice dotyczące tempa starzenia tłumaczył zaburzeniami koordynacji i różną ekspresją tych genów [33]. Kolejne badania wpływu aktywności poszczególnych enzymów na długość życia zdają się potwierdzać te hipotezy. Hodowla mutantów *Neurospora crassa* i *Drosophila melanogaster* z niedoborem enzymów antyoksydacyjnych wykazała, że żyją one znacznie krócej niż osobniki tego gatunku z prawidłową aktywnością enzymów [93,112,129], a podwyższenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy powoduje wydłużenie maksymalnego trwania życia o 110% u w/wym. nicieni i o 1/3 u muszki owocowej [121].

Badania aktywności enzymów antyoksydacyjnych u ludzi nie przyniosły dotychczas jednoznacznej odpowiedzi na temat roli poziomu obrony antyoksydacyjnej w procesie starzenia się organizmu.

Własne badania aktywności głównych enzymów antyoksydacyjnych: peroksydazy glutationowej, dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy przeprowadzone w grupie młodych osób zdrowych w porównaniu z wynikami u zdrowych, ale o ok. 47 lat starszych kobiet i mężczyzn pozwalają na wycinkowy wgląd w zachodzące z wiekiem

różnice aktywności enzymatycznej obrony antyoksydacyjnej. Oddzielne rozpatrywanie kobiet i mężczyzn w obrębie badanych grup pozwoliło na wyeliminowanie ewentualnego wpływu płci na badane parametry. Nieco niższy wiek mężczyzn w obu grupach oraz ich mniejsza liczebność były dodatkowymi czynnikami przemawiającymi za wyosobnieniem podgrup kobiet i mężczyzn.

Uzyskane wyniki własne wykazały rzeczywiście istnienie różnic w aktywności dwóch enzymów antyoksydacyjnych pomiędzy grupą osób młodych i starszych. W porównaniu z osobami młodymi u ludzi w podeszłym wieku stwierdzono:

- 1a- istotnie niższą aktywność erytrocytarnej peroksydazy glutationowej (GSH-Px) zarówno u kobiet jak i u mężczyzn ($p \leq 0,05$),
- 1b- istotnie niższą aktywność peroksydazy osoczowej, u kobiet $p \leq 0,001$, u mężczyzn - $p \leq 0,05$,
- 2 - istotnie niższą aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w krwinkach czerwonych u starszych kobiet ($p \leq 0,01$), natomiast w obu grupach mężczyzn aktywność tego enzymu była podobna.
- 3- aktywność katalazy nie różniła się pomiędzy grupą osób młodych i starszych.

Włączenie do badań tylko osób zdrowych pozwoliło na wyeliminowanie wpływu chorób na stan prooksydacyjno-antyoksydacyjny ustroju. Etiologia wielu schorzeń, uważanych ze względu na częstość występowania jako typowe dla okresu starości, wiązana jest z działaniem wolnych rodników [9,29,53,54,70,146]. Badanie osób, u których wykluczono obecność takich chorób, do których zalicza się cukrzycę z jej powikłaniami naczyniowymi, reumatoidalne zapalenie stawów, rozedmę płuc, miażdżycę, schorzenia nowotworowe, pozwala przypuszczać, że stwierdzone obniżenie aktywności erytrocytarnej i osoczowej peroksydazy glutationowej można jednoznacznie wiązać z wiekiem podeszłym, co jednak nie stanowi bezpośredniego dowodu zależności procesu starzenia od niższej ich aktywności. Liczebność badanych grup jak również przekrojowy charakter badań nie pozwoliły na prześledzenie aktywności poszczególnych enzymów w kolejnych dekadach życia, co mogłoby pogłębić ocenę zależności procesów starzenia od malejącej aktywności enzymów antyoksydacyjnych.

Trudności doboru zdrowych mężczyzn w wieku podeszłym były przyczyną zebrania najmniejszej liczby osób stanowiących grupę starszych mężczyzn (n=13), co może być przyczyną nie znalezienia u nich istotnych zmian aktywności dysmutazy ponadtlenkowej.

Prezentowane w piśmiennictwie rezultaty badań nad aktywnością enzymów antyoksydacyjnych w okresie starości są zróżnicowane, często nawet rozbieżne (Tab.11).

Wyniki własne są najbardziej zbliżone do danych Guemouri i wsp. [49]. Autorzy ci przebadali 1836 osób zdrowych, w wieku 4-97 lat stwierdzając, że do około 65 roku życia aktywność peroksydazy glutationowej, dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy utrzymuje się na stałym poziomie, a powyżej 65r.ż. następuje spadek aktywności tych enzymów. Aktywność peroksydazy glutationowej była, podobnie jak w materiale własnym, obniżona tak w erytrocytach jak i w osoczu, z tym, że różnica dla osoczowej GSH-Px była istotna tylko u kobiet.

Także w badaniach innych autorów aktywność peroksydazy obniżała się z wiekiem [115,128,150,174] i tylko Lloyd [89], Campbell [21] i Berr [12] nie obserwowali u ludzi starszych zmian aktywności erytrocytarnej formy enzymu, a Verlinden i wsp. [184] oraz Józwiak i Jasnowska [68] donosili nawet o podwyższeniu jej aktywności w starości.

Zmniejszenie u ludzi starszych aktywności drugiego badanego enzymu tj. dysmutazy ponadtlenkowej obserwowali również Perrin [128], Guemouri [49], Józwiak i Jasnowska [68], ale inni autorzy nie znajdowali zależnych od wieku zmian aktywności tego enzymu w krwinkach czerwonych [12,28,35,145].

W badaniach własnych aktywność trzeciego badanego enzymu tj. katalazy nie różniła się pomiędzy grupą osób młodych i starszych wiekiem, co odpowiada wynikom Guemouri i wsp. [49], którzy wykazali tylko nieznaczne obniżenie aktywności katalazy u ludzi powyżej 65r.ż. w porównaniu z osobami w trzeciej dekadzie życia. Takie zachowanie się katalazy w materiale własnym odbiega tak od wyników Józwiak i Jasnowskiej [68], jak i Perrin [128] i Y.Niwy [115]. Ten ostatni wykazał, że starości towarzyszy obniżenie aktywności katalazy, ale aktywność enzymu badał w krwinkach

białych.

Niższa aktywność peroksydazy glutationowej w erytrocytach i osoczu u osób starszych obojga płci oraz dysmutazy ponadtlenkowej w erytrocytach starszych kobiet wskazują na obniżenie wydolności enzymatycznej obrony antyoksydacyjnej w starości, co potwierdzają wyniki części opracowań [49,68,115,128,150,174], zestawionych w Tab.11.

Tab. 11. Zachowanie się aktywności enzymów antyoksydacyjnych w krwinkach osób starszych w porównaniu z młodymi - przegląd piśmiennictwa.

| Autor/Rok | Lokalizacja badanego enzymu | Zachowanie się aktywności enzymów w starości w porównaniu z osobami młodymi | | |
|-------------------------------|-----------------------------|---|------|------|
| | | GSH-Px | Cat | SOD |
| Thomson i wsp. 1977[174] | erytrocyty | ↓ | | |
| Saito i wsp. 1982 [145] | erytrocyty | | | bz |
| Verlinden i wsp. 1983[184] | erytrocyty | ↑ | | |
| Lloyd i wsp. 1983 [89] | erytrocyty | bz | | |
| Józwiak, Jasnowska 1985 [68] | erytrocyty | ↑ | ↑ | ↓ nz |
| | osocze | ↓ | | |
| Campbell i wsp. 1987 [21] | erytrocyty | bz | | |
| | płytki | bz | | |
| Schafer i wsp. 1990 [150] | erytrocyty | bz | | |
| Perrin i wsp. 1990 [128] | erytyrocyty | ↓ | ↓ | ↓ |
| | osocze | | | bz |
| Guemouri i wsp. 1991 [49] | erytrocyty | ↓ | ↓ nz | ↓ |
| | osocze | M↓ nz, K↓ | | ↓ nz |
| Ciechanowski i wsp. 1991 [28] | erytrocyty | | | bz |
| Berr i wsp. 1993 [12] | erytrocyty | bz | | bz |
| Niwa i wsp. 1993 [115] | leukocyty i limfocyty | ↓ | ↓ | bz |
| De Lustig i wsp. 1993 [35] | erytrocyty | | | bz |

bz - aktywność bez zmian, - ↑wzrost aktywności, ↓ - spadek aktywności, nz - nieznamienny, M- mężczyźni, K - kobiety

Podobnie niejednolite wyniki uzyskiwano badając aktywność omawianych enzymów w hodowlach tkankowych i komórkach zwierzęcych.

Tab. 12. Zachowanie się aktywności enzymów antyoksydacyjnych w tkankach starych zwierząt doświadczalnych - przegląd piśmiennictwa.

| Autor/Rok | Gatunek | Narząd | Zachowanie się aktywności enzymów antyoksydacyjnych w tkankach starych zwierząt | | |
|------------------------------|--------------------|-------------|---|-----|-----|
| | | | GSH-Px | Cat | SOD |
| Pinto i wsp. 1969 [131] | szczury | wątroba | bz | | |
| Kellogg, Fridovich 1967 [71] | szczury | wątroba | | | bz |
| | | mózg | | | bz |
| Remacle 1980 [137] | hodowla komórek | fibroblasty | | bz | bz |
| Vertechy i wsp. 1989 [185] | szczury | serce | ↑ | bz | ↑ |
| | | mięśnie | ↑ | ↑ | bz |
| Ji, Dillon, Wu 1990 [66] | szczury | wątroba | ↑ | bz | ↓ |
| | | mięśnie | ↑ | ↑ | ↑ |
| Rao i wsp. 1990 [135] | szczury 28 vs 4 m. | wątroba | bz | ↓ | ↓ |
| | szczury 21 vs 4 m. | wątroba | ↑ | | |
| Sohal i wsp. 1990 [159] | szczury, myszy, | mózg | ↑ | ↑ | ↑ |
| | krowy, | serce | ↓ | ↑ | ↑ |
| | świnie | wątroba | ↓ | ↑ | ↑ |
| Mote i wsp. 1990 [111] | szczury | wątroba | | ↓ | ↓ |
| Pigeolet, Remacle 1991 [130] | hodowla komórek | fibroblasty | bz | | |
| Ji 1992 [67] | szczury | wątroba | ↑ | bz | ↓ |
| | | serce | cytopl.↓ mitochond.↑ | | ↓ |
| | | mięśnie | ↑ | ↑ | ↑ |
| Lopez-Torres i wsp. 1993[90] | żaby | wątroba | bz | bz | bz |
| | | nerki | bz | bz | bz |

bz - aktywność bez zmian, ↑ - wzrost aktywności, ↓ - spadek aktywności, m. - miesiąc

Znaczne rozbieżności zestawionych wyników tylko częściowo można tłumaczyć różnymi warunkami w jakich prowadzone były doświadczenia czy odmiennym stanem metabolicznym badanych.

Żadna z obserwowanych tendencji zachowania się enzymów: obniżenie, niezmiennosc aktywności lub jej wzrost, nie wyklucza wolnorodnikowej koncepcji starzenia.

Istotne obniżenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych, wykazane także w niniejszym opracowaniu dla peroksydazy glutationowej i w grupie kobiet - dla dysmutazy ponadtlenkowej, może dowodzić zmniejszenia wydolności obrony antyoksydacyjnej, niezależnie od ilości wytwarzanych reaktywnych form tlenu. Tłumaczyć to można tak zmniejszeniem syntezy białek w starości [67], jak i ich uszkodzeniem lub też hamowaniem przez wolne rodniki [164], gdyż dysmutaza ponadtlenkowa hamowana jest przez nadtlenek wodoru, a więc produkt swojego działania, a katalaza i peroksydaza glutationowa przez - rodnik ponadtlenkowy [11,64]. Rao oraz Sohal i ich wsp. [135,160] uważają, że synteza i aktywnosc enzymów antyoksydacyjnych podlegają zmianom w okresie starzenia na poziomie transkrypcji. Stwierdzali oni nie tylko niższą aktywnosc enzymów u starych szczurów ale i niższe stężenia kodujących je mRNA. Autorzy ci podkreślają przy tym znaczenie restrykcji kalorycznej w powiązaniu z wolnymi rodnikami. Udowodnili oni, że ograniczenia żywieniowe, których rezultatem jest zmniejszenie ilości powstających wolnych rodników i powodowanych przez nie szkód wolnorodnikowych (szacowanych zmniejszeniem ilości produktów peroksydacji lipidów i gromadzeniem lipofuscyny) hamują spadek stężenia mRNA i aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy glutationowej w hepatocytach starych szczurów w porównaniu ze zwierzętami karmionymi dowolną ilością paszy [135,158]. Ponieważ nie wszyscy autorzy potwierdzają fakt mniejszego wytwarzania reaktywnych form tlenu przy zachowaniu restrykcyjnej diety [98,187], można mniejszą ilość produktów reakcji wolnorodnikowych u tych zwierząt przypisać wyższej niż u zwierząt karmionych dowolnie aktywności enzymów antyoksydacyjnych.

Także niezmiennosc aktywności enzymów w starości (w badaniach własnych taki model zachowania dotyczy katalazy) nie wyklucza udziału wolnych rodników w procesie starzenia, gdyż utrzymywanie tego samego poziomu obrony antyoksydacyjnej

może być relatywnie niedostateczne wobec zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu, narażając ustrój na przewlekły stres oksydacyjny.

Trzecie najrzadziej stwierdzane w wieku podeszłym zachowanie się enzymów antyoksydacyjnych w postaci wzrostu ich aktywności tłumaczone jest przez Ji adaptacją komórek do narastającego z wiekiem stresu oksydacyjnego [67]. Najczęściej wzrost aktywności wszystkich trzech enzymów obserwowano w mięśniach szkieletowych [66,67,185], a wzrost manganu-zależnej dysmutazy nadadtlenkowej i peroksydazy glutationowej również w komórkach mięśniowych serca [67] i neuronach mózgu [182]. Wzrost aktywności enzymów towarzyszył wzmożonej w tych przypadkach produkcji wolnych rodników szacowanej wyższym stężeniem dwualdehydu malonowego i zgromadzonej lipofuscyny. Hipotezy o enzymatycznej adaptacji do stresu oksydacyjnego nie potwierdzono we wszystkich badaniach. O ile stres oksydacyjny wywołany obciążeniem wysiłkowym powodował wzrost aktywności enzymów w mięśniach szkieletowych szczurów, takiej indukcji nie obserwowano w komórkach ani serca ani wątroby [67]. Prawdopodobnie zdolność indukcji aktywności enzymatycznej pod wpływem zadziałania wolnych rodników jest także obniżona u osobników starszych, co wykazali Niwa i wsp. porównując aktywność dysmutazy nadadtlenkowej, katalazy i peroksydazy glutationowej leukocytów i limfocytów ludzi młodych i starszych w warunkach podstawowych oraz po poddaniu ich działaniu związków uwalniających wolne rodniki [115].

Przedstawiony brak jednoznacznego zachowania się obrony antyoksydacyjnej sugeruje, że procesu starzenia nie można tłumaczyć wyłącznie zmniejszeniem jej wydolności. Tym niemniej szereg doświadczeń nie pozwala pominąć zmian aktywności enzymów antyoksydacyjnych w procesie starzenia. Jak już wspomniano mutanty *Neurospora crassa* i *Drosophila melanogaster* charakteryzujące się niedoborami enzymów antyoksydacyjnych żyją zdecydowanie krócej niż osobniki normalne [93,112,129]. Z drugiej jednak strony podwyższenie aktywności tylko jednego z enzymów nie wpływa na długość życia. Próby takie podejmowane były w doświadczeniach na owadach i gryzoniach [121]. Także zespół Downa, powodowany trisomią 21 lub obecnością dodatkowego fragmentu chromosomu 21 zawierającego gen

kodujący dysmutazę nadmanganową, charakteryzuje się podwyższoną o ok. 50% aktywnością dysmutazy w komórkach, a mimo to chorzy ci nie tylko żyją krócej, ale wykazują cechy przyspieszonego starzenia [11,196]. Być może dochodzi w tej sytuacji do szkodliwego wpływu nadmiaru wytwarzanego przez dysmutazę nadtlenu wodoru. Pośrednim dowodem takiej koncepcji jest możliwość wydłużenia życia owadów przy jednoczesnym podwyższeniu aktywności zarówno dysmutazy jak i katalazy, która rozkłada wytwarzany przez dysmutazę w zwiększonej ilości nadtlenek wodoru [121]. Wydaje się więc, że w przeciwdziałaniu skutkom stresu oksydacyjnego bardzo ważne jest nie tylko utrzymanie odpowiedniej do potrzeb aktywności enzymów ale też ich zrównoważone współdziałanie. Wypada także podkreślić, że enzymy stanowią jedynie fragment obrony antyoksydacyjnej. W piśmiennictwie można spotkać doniesienia o obniżonym stężeniu glutationu czy działających antyoksydacyjnie witamin [3,17,109,153,154,183], ale w prezentowanej pracy czynniki te nie były badane.

5.2. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych a stężenia metali.

Odrębne badanie w niniejszym opracowaniu stanowi zależność aktywności wybranych enzymów antyoksydacyjnych od stężeń pierwiastków wbudowanych w ich aktywne centra. Analiza stężeń selenu, miedzi, cynku i żelaza oznaczonych wśród ludzi młodych i starszych wykazała:

- 1 - brak istotnych różnic pomiędzy średnimi stężeniami selenu w osoczu w grupach ludzi młodych a osobami starszymi, ale u 46% badanych stwierdzono jego stężenie poniżej 60ng/ml; przy czym najwięcej osób z niedoborem selenu w osoczu stwierdzono w grupie starszych kobiet (52,5%),
- 2 - istotnie niższe stężenie selenu w krwinkach czerwonych u starszych kobiet ($p \leq 0,0001$) jak i u starszych mężczyzn ($p \leq 0,01$) w porównaniu ze stężeniami selenu w erytrocytach osób młodych,

- 3 - zbliżone w obu grupach wiekowych stężenia miedzi w erytrocytach, a istotnie wyższe jej stężenia w osoczu ludzi starszych, zarówno mężczyzn $p \leq 0,005$ jak i kobiet $p \leq 0,01$,
- 4 - stężenia cynku w osoczu, mimo, że mieściły się w granicach wartości prawidłowych, były niższe u ludzi starszych, osiągając istotność statystyczną w grupie kobiet ($p \leq 0,01$), natomiast w erytrocytach nie różniły się znacząco w poszczególnych grupach,
- 5 - brak istotnych różnic pomiędzy stężeniami żelaza w osoczu ludzi młodych i starszych.

Badane pierwiastki, niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu, należą, z wyjątkiem żelaza, do tzw. pierwiastków śladowych, na które zapotrzebowanie jest niewielkie, z reguły pokrywane przez każdy rodzaj mieszanej diety.

Selen jest mikroelementem, którego zawartość w organizmie zależy od zasobności gleby i wody.

Stężenia selenu w osoczu osób badanych były bardzo różne i prawie u połowy (46% osób) stwierdzono niskie ($< 60 \text{ ng/ml}$) stężenia tego pierwiastka w osoczu. Niedobór ten (u 41,2% młodych mężczyzn, 43,6% młodych kobiet, 38,5% starszych mężczyzn i u 52,5% starszych kobiet) wynikać może z jego niskiej zawartości w diecie, gdyż według nie publikowanych danych w Polsce, podobnie jak w innych krajach Europy zawartość selenu w glebie jest niska [193].

Osobnicze zróżnicowanie stężenia selenu w osoczu ludzi młodych i starszych nie znalazły odzwierciedlenia w wartościach średnich, zbliżonych w obu grupach wiekowych. Podobne rezultaty uzyskali Lassen i Horder [79], Willet [190] i Marchaluk [96]. Tylko Valentine [179] badając dwie populacje amerykańskie obejmujące zarówno dzieci jak i osoby powyżej 60 r.ż. znacząco wyższe stężenia selenu stwierdził w grupie osób najstarszych. Jednak w większości przeprowadzonych analiz stężenia selenu u osób powyżej 60 r.ż. były niższe niż u osób młodszych [12,13,21,31,43,89,100,103,109,120,170,174,184].

Odrębnym nieco problemem jest zawartość selenu w krwinkach czerwonych. Stwierdzone w badaniach własnych istotnie niższe stężenie selenu w erytrocytach ludzi

w podeszłym wieku opisywane było już wcześniej przez Lloyda [89], Thomsona [174] i Millera [103], a tendencję do spadku jego stężenia opisał Berr [12], choć spotyka się doniesienia o wyższym [184] lub niezmiennym [21] stężeniu selenu w krwinkach czerwonych ludzi starszych.

Autorzy wykazujący niższe stężenia selenu w erytrocytach ludzi starszych nie podejmują prób tłumaczenia tego zjawiska. Rozważyć można upośledzenie mechanizmów odpowiedzialnych za transport błonowy i wiązanie selenu w erytrocytach, zwłaszcza przy stosunkowo niskich stężeniach selenu w osoczu.

W opracowaniu własnym nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniem selenu w osoczu i w erytrocytach, mimo iż taka zależność była podnoszona przez innych autorów [12,184,194]. Podobnie jak w badaniach Zachary i wsp. stężenia selenu były wyższe w krwinkach czerwonych niż w osoczu we wszystkich badanych grupach [194].

Antyoksydacyjna rola selenu *in vivo* wiąże się głównie z jego obecnością w centrum aktywnym peroksydazy glutationowej, ale nie można wykluczyć też znaczenia jego związków z innymi białkami osocza. Świadczyć może o tym ochrona wątroby szczurów przed nekrozą po zadziałaniu dikwatu, związku stymulującego reakcje wolnorodnikowe, przez wcześniejsze podanie selenu, chociaż aktywność peroksydazy w tym doświadczeniu wzrosła tylko nieznacznie, co świadczy, iż korzystny wpływ selenu wynikał nie tylko z podwyższonej aktywności enzymu [18]. Odkryte najpierw w 1987r. w surowicy szczurów [191], a w 1993r. z surowicy ludzkiej wyosobnione przez Burk'a i Hill'a [19] osoczowe białko zawierające selen, nazwane selenoproteiną P wiąże ok. 36% selenu osocza [2], (a według Eberle nawet do 60% [37]). Marchaluk i wsp. wykazali istotną zależność pomiędzy stężeniami selenu i selenoproteiny P w surowicy [96]. Wydaje się, że jest ona szczególnie chroniona w stanach niedoboru selenu. Przy umiarkowanym deficycie selenu w paszy zwierząt laboratoryjnych stężenie selenoproteiny P ulega w mniejszym stopniu obniżeniu niż aktywność peroksydazy, a z kolei uzupełnianie niedoboru selenu powoduje duży jej przyrost, przy mniejszym wpływie na aktywność GSH-Px [192]. Jak dotychczas fizjologiczna funkcja selenoproteiny P nie jest jeszcze poznana i być może jest ona tylko białkiem transportującym.

Wykonane badania ujawniły, że od stężenia selenu zależy aktywność unieczynniającej nadtlenuk wodoru peroksydazy glutationowej. Zależność ta występowała we wszystkich badanych grupach wiekowych kobiet i mężczyzn i dotyczyła zarówno enzymu osocznego (współczynniki korelacji $r=0,842$ i $r=0,686$ odpowiednio w grupie młodych i starszych kobiet oraz $r=0,679$ i $r=0,778$ w grupie młodych i starszych mężczyzn) jak i krwinkowego ($r=0,757$ i $0,643$ w grupach młodych i starszych kobiet, $r=0,749$ i $0,744$ w grupach młodych i starszych mężczyzn; Ryc.8-15). Zależność aktywności osoczowej lub krwinkowej peroksydazy od stężenia selenu stwierdzali także Snook [156], Schafer [150] i Rea [136], ale inni autorzy nie znajdowali podobnej korelacji [16,62,89,168]. W badaniach Zachary występowała zależność pomiędzy stężeniem selenu a aktywnością peroksydazy glutationowej w osoczu, natomiast nie znalazł on korelacji pomiędzy stężeniem selenu a aktywnością enzymu w erytrocytach [194].

Utrzymuje się pogląd, że aktywność peroksydazy glutationowej zależy od selenu tylko do pewnego jego stężenia. Według dokonanego przez Neve przeglądu piśmiennictwa dla aktywności peroksydazy osoczowej i krwinkowej "graniczną" wartością wydają się stężenia selenu w osoczu od 60-71ng/ml [113]. Własne wyniki charakteryzuje zależność aktywności peroksydazy glutationowej od stężenia selenu o większym zasięgu, aż do 104ng/ml (co może być związane z niezbyt wysokimi stężeniami selenu wśród badanych osób).

Nie stwierdziłam natomiast opisywanej przez Perona i wsp. [127], Macdougall [92], Cellerino [24] i Rodviena [142] zależności aktywności erytrocytarnej peroksydazy glutationowej od stężenia żelaza (współczynniki korelacji w poszczególnych grupach $r=0,078$, $0,166$, $0,324$, $0,004$). Brak takiej zależności w wynikach własnych można tłumaczyć prawidłowymi stężeniami żelaza u badanych, podczas gdy wspomniane zmniejszenie aktywności enzymu wykazywano w warunkach niedoboru żelaza w osoczu.

W organizmie człowieka znajduje się ok. 100-150mg miedzi [74,95]. W dużych ilościach występuje ona w wątrobie, mięśniach i w kościach, a ponadto stwierdza się ją w osoczu, w którym w ok. 90-95% związana jest z ceruloplazminą [95], a także z

albuminami i aminokwasami [162]. Występuje też miedź w krwinkach czerwonych, wchodząc przede wszystkim (w 60%) w skład dysmutazy nadtlenkowej [117].

W badaniach własnych stężenia miedzi w osoczu były istotnie wyższe u ludzi starszych, (kobiety $p \leq 0,01$, mężczyźni $p \leq 0,005$), ale nie przekroczyły one, wynoszącej 1,4mg/l, górnej granicy zakresu referencyjnego.

Doniesienia na temat zachowania się stężeń miedzi w starości nie są zbyt liczne [61,75,84,85,94,132], ale w badaniach wszystkich autorów, podobnie jak we własnych, stężenie miedzi w osoczu było wyższe u osób starszych. Wzrost stężenia miedzi w osoczu może występować co prawda w przebiegu różnych stanów chorobowych jak reumatoidalne zapalenie stawów, zapalenie wątroby, kolagenozy, żółtaczka mechaniczna, w ostrych i przewlekłych zakażeniach, w niedokrwistościach, w chorobach nowotworowych [74,95,105,171], ale zastosowana procedura doboru badanych wyklucza u nich obecność wymienionych chorób. Jako przyczyna wyższych stężeń miedzi w osoczu ludzi starszych rozważana była również ontogenetycznie zmniejszona zdolność wydalnicza wątroby w tej grupie wiekowej [75], jako, że główną drogą eliminacji miedzi z ustroju jest jej wydalanie z żółcią [74]. Wyniki podstawowych wskaźników wydolności wątroby były u wszystkich prawidłowe, co oczywiście nie wyklucza utajonego upośledzenia funkcji narządu, towarzyszącego podeszłemu wiekowi, które nie powoduje objawów klinicznych.

Nawiązując do koncepcji udziału wolnych rodników w procesie starzenia, niektórzy autorzy [34,63] tłumaczą wyższe stężenia miedzi w osoczu ludzi starszych zwiększeniem ilości nieenzymatycznych związków miedzi o działaniu dysmutacyjnym, do których należą jej połączenia z albuminami i aminokwasami. Związki te mając niższą masę cząsteczkową niż dysmutaza nadtlenkowa, łatwiej penetrują do wnętrza komórek, gdzie mogą unieczynniać rodnik nadtlenkowy. Taką reakcję podwyższenia stężenia miedzi w osoczu obserwował Danch i wsp. u szczurów pod wpływem podawanego im prokainamidu, którego metabolity indukują reakcje wolnorodnikowe [34].

Pomimo istotnie wyższych wartości stężenia miedzi w osoczu ludzi starszych, stężenia tego metalu w erytrocytach nie różniły się istotnie pomiędzy badanymi grupami

oraz nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniem miedzi w osoczu i w krwinkach czerwonych.

Badanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w zestawieniu ze stężeniem miedzi w erytrocytach wykazało obecność takiej korelacji tylko w jednej grupie, a mianowicie u młodych mężczyzn ($r=0,899$). Obserwacje wpływu stężenia miedzi na aktywność dysmutazy poczynił Okahata badając dzieci z niedoborem miedzi [117]. Również Prohaska [133,134] i Jenkinson i wsp. [65] stwierdzali obniżoną aktywność SOD w tkankach myszy i szczurów z deficytem miedzi. Na podstawie badań komórek drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) prowadzonych przez Carri i wsp. przypuszcza się, że jony miedzi współuczestniczą w regulacji genu odpowiedzialnego za syntezę SOD na etapie transkrypcji, a także mogą być regulatorem posttranslacyjnym aktywując zmagazynowany w komórce apoenzym [23].

Mimo podnoszonego wpływu stężenia miedzi na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, we własnych badaniach aktywność SOD (z wyjątkiem grupy młodych mężczyzn) nie była zależna od stężeń metalu w erytrocytach, co może być związane z brakiem jego niedoborów. Występowanie tej zależności tylko w grupie młodych mężczyzn pozostaje trudne do wyjaśnienia. Średnie stężenie miedzi w krwinkach czerwonych młodych mężczyzn nie różniło się od stężeń w pozostałych grupach, a średnia aktywność dysmutazy była zbliżona do jej aktywności w grupie starszych mężczyzn. Co prawda stężenie miedzi w osoczu młodych mężczyzn było najniższe spośród badanych grup, ale z kolei nie stwierdzono zależności aktywności enzymu od stężenia miedzi w osoczu. Podobnie nie można wytłumaczyć różnicami stężeń miedzi obniżenia aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w grupie starszych kobiet ($p \leq 0,01$), gdyż aktywność ta nie pozostaje w tej grupie w związku ze zmianami jej stężenia. Tak więc zależność aktywności dysmutazy od stężenia miedzi wymaga jeszcze dalszych badań.

Dotychczasowe badania zależności aktywności enzymów antyoksydacyjnych od stężeń metali ujawniły wpływ niedoboru miedzi nie tylko na obniżenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, ale i peroksydazy glutationowej, która jest enzymem selenozależnym. Eksperymentalne badania Olin [118], Prohaski [134] i Jenkinson [65]

wykazywały obniżoną aktywność peroksydazy glutationowej w osoczu, hepatocytach i pneumocytach myszy i szczurów karmionych dietą z niską zawartością miedzi, podczas gdy w erytrocytach aktywność tego enzymu była zwiększona [69,118]. Nie wykazano jak dotychczas podobnych zależności u ludzi, również we własnych badanych grupach osób młodych i starszych nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniem miedzi w osoczu lub erytrocytach a aktywnością osoczowej i krwinkowej peroksydazy. Być może zależność taka występuje tylko przy dużych niedoborach miedzi, których nie stwierdzono wśród badanych osób. Brak też wytłumaczenia mechanizmu obniżenia aktywności peroksydazy w stanach niedoboru miedzi. Sugeruje się, że niedobór miedzi upośledza metabolizm selenu, jego wchłanianie lub gospodarkę jego zasobami [65,118]. Jenkinson i wsp. stwierdzali zwiększone wydalanie selenu z kałem u szczurów z deficytem miedzi [65]. Niedobór miedzi może też hamować wbudowywanie selenocysteiny do peroksydazy glutationowej. Innym możliwym wyjaśnieniem zmniejszenia aktywności GSH-Px w stanach niedoboru miedzi jest zmniejszenie ilości nadtlenku wodoru - substratu peroksydazy, w wyniku obserwowanego jednocześnie zmniejszenia aktywności dysmutazy ponadtlenkowej lub unieczynnianie peroksydazy przez pozostający w nadmiarze rodnik ponadtlenkowy [118].

Kolejnym metalem, którego stężenia zostały oznaczone w tej pracy w osoczu i w krwinkach czerwonych był cynk. Uważany za jeden z najważniejszych pierwiastków śladowych jest on składową częścią wielu enzymów (wg Faviera ok. 200 [40]), pełniąc w nich różnorodne role: stabilizatora, katalizatora lub aktywatora. Wykazano też udział tego pierwiastka w biosyntezie kwasów nukleinowych, białek, hemu, w procesach odpornościowych, różnicowania i podziałach komórek, we wzroście, a nawet w poczuciu smaku [40,76,139,140]. Budzi on też zainteresowanie jako stabilizator błon lizosomalnych, jak również z racji pełnienia funkcji antyoksydacyjnych.

Stężenia cynku w osoczu we wszystkich badanych grupach mieściły się w granicach normy (0,5-1,2mg/l), ale przeciwnie niż w przypadku miedzi, były u ludzi starszych niższe w porównaniu z młodymi, przy czym u kobiet różnica ta była statystycznie istotna ($p \leq 0,01$).

Niskie stężenia cynku w osoczu opisywano w przebiegu różnych stanów chorobowych: białaczek, niewydolności nerek, marskości wątroby i w chorobie alkoholowej [74,76,171], a więc w stanach wykluczonych u osób badanych w ramach tego opracowania. Tylko w badaniach Prasada [132], Licastro [84,85] i Rissanena [141] stężenie cynku w osoczu ludzi starszych nie odbiegało od wartości prawidłowych, natomiast inni uważają niedobór cynku za częsty w starości [3,14,76,94,109,139,170,183]. Vannucchi [183] i Sweeney [170] ocenili, że występuje on u 56-58% ludzi w podeszłym wieku, sprzyjając zaburzeniom odporności, większej podatności na zakażenia, gorszemu gojeniu się ran [40,140]. Niższe stężenia cynku u ludzi starszych mogą niekorzystnie odbijać się na jego funkcjach antyoksydacyjnych - stymulacji syntezy metalotioneiny, czy roli ochronnej w stosunku do grup sulfhydrylowych białek [82].

Najpewniej mieszczące się w granicach normy stężenia cynku w osoczu były wystarczające do utrzymania stężeń metalu w krwinkach czerwonych, w których znajduje się około 85% cynku zawartego we krwi [76], głównie jako składnik anhydryzy węglanowej, ale także dysmutazy ponadtlenkowej. W pracy własnej stężenia cynku w erytrocytach były we wszystkich grupach jednakowe. Przeprowadzone badania nie wykazały zależności aktywności dysmutazy ponadtlenkowej od stężenia cynku co jest zgodne z obserwacjami innych autorów [28] oraz ustaloną rolą cynku ograniczoną do stabilizowania cząsteczki dysmutazy [45].

Żelazo jest najobficiej występującym w organizmie metalem przejściowym (posiadającym niesparowane elektrony na powłokach wewnętrznych), ważnym ze względu na rolę hemoglobinowego nośnika tlenu. Poza hemoglobiną, która zawiera ok. 70% całkowitej puli żelaza w ustroju, poza żelazem zapasowym związanym z ferrytyną i hemosyderyną (27%) oraz żelazem transportowanym przez transferynę (0,2% puli), wchodzi ono w skład enzymów zawierających grupę flawinową (jak dehydrogenaza NADH czy dehydrogenaza kwasu bursztynowego) lub zawierających grupę hemową [74,95]. Ta ostatnia grupa enzymów, do których należą cytochromy, peroksydaza, oksydaza cytochromowa, katalaza, wiąże ok. 0,1% całkowitej ilości żelaza organizmu [95].

Mimo często podkreślanych różnych niedoborów żelaza u ludzi w podeszłym wieku [88,114,122,161] wynikających czy to z nie dość urozmaiconej diety czy z upośledzonego w starości wchłaniania, stężenia żelaza u wszystkich badanych mieściły się w zakresie wartości referencyjnych. Co prawda najniższą średnią stężenia żelaza stwierdzono u starszych kobiet, ale różnica w porównaniu z kobietami młodszymi nie była istotna statystycznie.

Spośród badanych enzymów antyoksydacyjnych największej zależności od stężenia żelaza możnaby się spodziewać w przypadku katalazy, która jest hemoproteiną zawierającą w centrum aktywnym 4 atomy żelaza. Zawarta w dużej ilości w erytrocytach chroni je przed litycznym działaniem powstającego w toku metabolizmu nadtlenu wodoru. Tymczasem zestawiając aktywność katalazy ze stężeniem żelaza w osoczu nie stwierdziłam istnienia zależności pomiędzy tymi parametrami w żadnej z grup wiekowych. Najpewniej nawet najniższe, ale jeszcze prawidłowe stężenia żelaza były wystarczające dla utrzymania aktywności katalazy. Zmniejszenie aktywności katalazy inni autorzy stwierdzali wyłącznie wśród ludzi z niedoborami żelaza i aktywność ta wzrastała po wyrównaniu niedoboru tego pierwiastka [92].

Uzyskane w wykonanej pracy wyniki wskazują na ograniczoną wydolność enzymatycznej obrony antyoksydacyjnej u ludzi w podeszłym wieku, i chociaż nie pozwalają interpretować roli tego niedoboru w procesie starzenia, to jednak uzasadniają przedstawienie bardziej szczegółowych wniosków.

6. WNIOSKI

1. Enzymatyczną, antyoksydacyjną obronność organizmu człowieka w jego późniejszym okresie życia charakteryzuje istotne obniżenie aktywności peroksydazy glutationowej (GSH-Px), tak w osoczu jak i w erytrocytach.
2. Dysmutazie ponadtlenkowej (SOD) można przypisać ograniczoną sprawność w okresie starości, za czym przemawia jej znamienne niższa aktywność w krwinkach czerwonych starszych kobiet, przy jednakowym jej poziomie w obu grupach przebadanych mężczyzn.
3. Aktywność katalazy (Cat) w erytrocytach okazała się we wszystkich grupach badanych jednakowa i najpewniej nie jest ona wyraźniej uzależniona od kalendarzowego wieku człowieka.
4. W naszych warunkach środowiskowo - żywieniowych nie występują u osób zdrowych, niezależnie od wieku, niedobory żelaza, miedzi i cynku we krwi, natomiast prawie u połowy (46%) badanych, zarówno młodych jak i starszych, stwierdzono w osoczu zbyt niskie stężenia selenu.
5. Starzenie wiąże się ze znamionym obniżeniem stężenia selenu w krwinkach czerwonych w porównaniu z jego stężeniem u ludzi młodych.
6. Ze stężeniem selenu w osoczu i krwinkach czerwonych jednoznacznie koreluje aktywność osoczowej i erytrocytarnej peroksydazy glutationowej.
7. Podeszłemu wiekowi towarzyszą także istotnie wyższe w porównaniu z osobami młodymi stężenia miedzi w osoczu u obu płci i niższe stężenia cynku przy statystycznej istotności różnic tylko pomiędzy grupami młodych i starszych kobiet.
8. Przy prawidłowych stężeniach żelaza, miedzi i cynku nie stwierdza się skorelowania aktywności enzymów antyoksydacyjnych: katalazy, peroksydazy glutationowej i dysmutazy ponadtlenkowej ze stężeniami tych pierwiastków, za wyjątkiem aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w relacji do stężenia miedzi w erytrocytach młodych mężczyzn.

9. Opracowanie wykazało obniżoną w okresie starości sprawność enzymatycznej obrony antyoksydacyjnej człowieka, szczególnie w odniesieniu do osoczowej i erytrocytarnej peroksydazy glutationowej, przy czym redukcja aktywności tego enzymu może pozostawać w związku z obniżeniem stężenia selenu będącego jej kofaktorem.

7. STRESZCZENIE

Jedną z teorii próbujących dotrzeć do przyczyn starzenia na poziomie molekularnym jest wolnorodnikowa teoria D.Harmana. Według jej twórcy, starzenie jest rezultatem gromadzenia w komórkach uszkodzeń kwasów nukleinowych, białek, lipidów i węglowodanów powstających w wyniku ich reakcji z wolnymi rodnikami tlenowymi.

Za udziałem reaktywnych form tlenu w procesie starzenia przemawiają:

- obserwowany przez wielu autorów wzrost ilości wolnych rodników u osobników starych, zarówno ludzi jak i zwierząt,
- odwrotnie proporcjonalna zależność maksymalnego czasu trwania życia i tempa przemiany materii, z którym związana jest ilość wytwarzanych wolnych rodników,
- wydłużenie czasu trwania życia po zastosowaniu restrykcji kalorycznej, ograniczającej produkcję wolnych rodników,
- obecność odwrotnej korelacji pomiędzy ilością rodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru wytwarzanych w mitochondriach hepatocytów a maksymalnym czasem trwania życia 6 różnych gatunków ssaków,
- wzrost w okresie starości stężeń produktów reakcji reaktywnych form tlenu z biomolekułami: nadtlenu lipidów, dwualdehydu malonowego, etanu i pentanu jako produktów peroksydacji lipidów, ilości grup karbonylowych w białkach, 8-hydrokso-2'-deoksyguanozyny w DNA, lipofuscyny,
- gromadzenie uszkodzeń w postaci utlenionych białek i lipidów, nieaktywnych enzymów, pęknięć i ubytków nici DNA, rozszczepień jego podwójnej helisy, delecji lub substytucji zasad w DNA.

Chociaż starzenie wiązane jest z zaburzeniem równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej ustroju, to nadal nie ma pewności jak zachowują się czynniki antyoksydacyjne: dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza i peroksydaza glutationowa.

Celem pracy było zbadanie aktywności głównych enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy glutationowej u zdrowych osób w

wieku podeszłym i u ludzi młodych, a także określenie w osoczu i w erytrocytach stężeń selenu, żelaza, miedzi i cynku, tj. pierwiastków wbudowanych w aktywne centra enzymów oraz przesłedzenie czy aktywność badanych enzymów zależy od stężeń pierwiastków będących ich kofaktorami.

Badaniami objęto 93 zdrowe osoby w wieku 21-102 lata, które podzielono w zależności od wieku i płci. W grupie I (porównawczej), utworzonej przez 40 osób w wieku 21-44 lata ($\bar{x}=32,03\pm 6,25$ l.) wydzielono:

- podgrupę młodych kobiet, $n=23$, w wieku $\bar{x}=33,4\pm 4,65$ l.
- podgrupę młodych mężczyzn, $n=17$, których średni wiek wynosił $\bar{x}=30,2\pm 7,73$ l.

Grupę II (osób starszych) stanowiło 53 badanych w wieku 61-102 l. ($\bar{x}=79,68\pm 9,64$ l.) podzielonych na:

- podgrupę starszych kobiet, $n=40$, w wieku $\bar{x}=80,7\pm 10,13$ oraz
- podgrupę starszych mężczyzn, $n=13$, w wieku $\bar{x}=76,5\pm 7,69$ l.

Głównymi wyznacznikami doboru był brak skarg i przewlekłych chorób w wywiadzie, brak odchyłeń w badaniu fizykalnym oraz prawidłowe wyniki wybranych badań laboratoryjnych, ekg, rtg klatki piersiowej i usg jamy brzusznej oraz wyrażenie zgody na udział w badaniu.

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (Cat) i peroksydazy glutationowej (GSH-Px) oznaczano w erytrocytach, a GSH-Px ponadto w osoczu u wszystkich badanych. W erytrocytach i w osoczu oznaczono również u wszystkich badanych stężenie selenu, natomiast u 15 kobiet i 11 mężczyzn grupy I oraz u 26 kobiet i 7 mężczyzn grupy II zbadano stężenia miedzi i cynku, a w osoczu stężenia żelaza. Do badania aktywności dysmutazy ponadtlenkowej wykorzystano metodę Misry i Fridovicha, do badania aktywności katalazy - metodę Aebi, a aktywność peroksydazy glutationowej oznaczano metodą Paglia i Valentine'a w modyfikacji Lawrence'a i Burk'a.

Stężenie selenu oznaczano metodą spektrofluorymetryczną opisaną przez Lalonde i wsp., stężenie żelaza w osoczu metodą kolorymetryczną, a stężenia miedzi i cynku - metodą spektrofotometrii absorpcji atomowej. Wyniki przedstawiono w postaci średnich arytmetycznych i odchyłeń standardowych dla poszczególnych analizowanych grup.

Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi zbadano stosując test dla dwóch średnich oparty na rozkładzie t. Zależność aktywności enzymów od stężeń pierwiastków będących ich kofaktorami określono za pomocą równań prostych regresji oraz wyliczając współczynniki korelacji liniowej Pearsona.

Porównanie średnich wartości obliczonych oddzielnie dla kobiet i mężczyzn parametrów wykazało, że płeć nie różnicuje wyników badanych, tak w obrębie grupy osób młodych jak i starszych.

Obniżenie poziomu obrony antyoksydacyjnej u zdrowych osób starszych wyraziło się istotnie niższą ($p \leq 0,05$) w porównaniu z młodymi aktywnością peroksydazy glutationowej w erytrocytach, tak u kobiet jak i u mężczyzn. Aktywność peroksydazy glutationowej była również istotnie niższa w osoczu ludzi starszych, u kobiet na poziomie $p \leq 0,001$, u mężczyzn $p \leq 0,05$.

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w krwinkach czerwonych była istotnie niższa tylko u starszych kobiet ($p \leq 0,01$), natomiast w obu grupach mężczyzn aktywność tego enzymu była podobna.

Aktywność katalazy nie różniła się pomiędzy badanymi grupami.

Badanie stężeń metali w osoczu wykazało obniżone ($< 60 \text{ ng/ml}$) stężenie selenu u 46% spośród wszystkich badanych, natomiast stężenia żelaza, cynku i miedzi mieściły się w zakresie wartości referencyjnych (tylko u 2 osób grupy młodej stężenia miedzi były nieznacznie niższe).

Przy porównaniu osób starszych z młodymi nie obserwowano różnic pomiędzy stężeniami selenu w osoczu, natomiast stężenia selenu w erytrocytach ludzi starszych były istotnie niższe zarówno u kobiet ($p \leq 0,0001$) jak i u mężczyzn ($p \leq 0,01$).

Mimo, że stężenia miedzi w osoczu mieściły się w granicach normy, jej stężenia w porównaniu z osobami młodymi były istotnie wyższe zarówno u starszych kobiet ($p \leq 0,01$), jak i u starszych mężczyzn ($p \leq 0,005$).

Z kolei stężenia cynku w osoczu, choć również w granicach normy, były u osób starszych niższe niż u młodych, osiągając istotność statystyczną w grupie kobiet ($p \leq 0,01$).

Stężenia miedzi i cynku w erytrocytach nie różniły się pomiędzy badanymi grupami.

Badanie korelacji pomiędzy stężeniami metali a aktywnością zawierających je enzymów wykazało istotny związek ($p \leq 0,01$) aktywności peroksydazy glutationowej od stężeń selenu we wszystkich badanych grupach kobiet i mężczyzn. Zależność tę obserwowano zarówno w osoczu, jak i w krwinkach czerwonych. Nie stwierdzono znamiennej powiązania aktywności erytrocytarnej peroksydazy glutationowej ze stężeniami żelaza oraz miedzi w osoczu.

Podobnie nie obserwowano związku pomiędzy stężeniami żelaza a aktywnością zawierającej go katalazy.

Tylko w grupie młodych mężczyzn obserwowano zależność pomiędzy aktywnością dysmutazy ponadtlenkowej a stężeniem miedzi w erytrocytach.

Uzyskane wyniki wskazują na zmniejszenie wydolności obrony antyoksydacyjnej u ludzi w podeszłym wieku, chociaż nie pozwalają interpretować roli tego niedoboru w procesie starzenia. Wykazany związek pomiędzy aktywnością peroksydazy glutationowej a stężeniem selenu, przy jednoczesnym stwierdzeniu jego obniżonych stężeń w osoczu wśród badanych osób, stwarza możliwość poprawy obrony antyoksydacyjnej przez uzupełnienie niedoborów tego pierwiastka.

8. Piśmiennictwo

1. Aebi H.E.: Catalase. W: Bergmeyer H.U. red. *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie. 1983, 3, 273.
2. Akesson B., Bellew T., Burk R.F.: Purification of selenoprotein P from human plasma. *Biochim. Biophys. Acta* 1994, 1204, 243-249.
3. Alberti-Fidanza A., Coli R., Genipi L., Howard A.N., Maurizi-Coli A., Mielcarz G., Rajput-Williams J., Thumham D., Williams N.R., Fidanza F.: Vitamin and mineral nutritional status and other biochemical data assessed in groups of men from Crevalcore and Montegiorgio (Italy). *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 1995, 65, 193-198.
4. Alcock N.W.: Copper. W: Pesce A.J., Kaplan L.A. red. *Methods in Clinical Chemistry*. The C.V. Mosby Company 1987, 527-538.
5. Ambrosio G., Zweier J.L., Duilio C. i wsp.: Evidence that Mitochondrial respiration is a Source of Potentially Toxic Oxygen Free Radicals in Intact Rabbit Hearts Subjected to Ischaemia and Re-flow. *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 18532-41.
6. Ames B.N., Shigenaga M.K.: Oxidants Are a Major Contributor to Aging. *Am. N. Y. Acad. Sci.* 1992, 663, 85-96.
7. Amheim N., Cortopassi G.: Deleterious mitochondrial DNA mutations accumulate in aging human tissues. *Mutat. Res.* 1992, 275, 157-167.
8. Avissar N., Omt D.B., Yagil Y., Horowitz S., Watkins R.H., Kerl E.A., Takahashi K., Palmer I.S., Cohen H.J.: Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am. J. Physiol.* 1994, 266, C367-C375.
9. Bankson D.D., Kestin M., Rifai N.: Role of free radicals in cancer and atherosclerosis. *Clin. Lab. Med.* 1993, 13, 463-478.
10. Barciszewski J., Rattan S.I.S., Siboska G.E., Otzen D.E., Clark B.F.C.: Reduction in the amount of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the DNA of SV40-transformed human fibroblasts as compared with normal cells in culture. *FEBS Lett.* 1993, 318(2), 186-188.
11. Bartosz G.: *Druga twarz tlenu*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1995.
12. Berr C., Nicole A., Godin J., Ceballos-Picot I., Thevenin M., Dartigues J.F., Alperovitch A.: Selenium and Oxygen-Metabolizing Enzymes in Elderly Community Residents: A Pilot Epidemiological Study. *J. Am. Geriatr. Soc.* 1993, 41, 143-148.
13. Bortoli A., Fazzin G., Marchiori M. i wsp.: Selenium status and effect of selenium supplementation in a group of elderly women. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 1991, 5, 19-21.

14. Boukaiba N., Flament C., Acher S., Chappuis P., Piau A., Fusselier M., Dardenne M., Lemonnier D.: A physiological amount of zinc supplementation: effects on nutritional, lipid, and thymic status in an elderly population. *Am. J. Clin. Nutr.* 1993, 57, 566-72.
15. Brawn K., Fridovich I.: DNA strand scission by enzymically generated oxygen radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* 1981, 206, 414-419.
16. Bunker V.W., Lawson M.S., Stansfield M.F., Clayton B.E.: Selenium balance studies in apparently healthy and housebound elderly people eating selfselected diets. *Br. J. Nutr.* 1988, 59, 171-180.
17. Bunker V.W.: Free radicals, antioxidants and ageing. *Med. Lab. Sci.* 1992, 49, 299 - 312.
18. Burk R.F., Trumble M.J., Lawrence R.A.: Rat hepatic cytosolic glutathione-dependent enzyme protection against lipid peroxidation in the NADPH-microsomal lipid peroxidation system. *Biochim. Biophys. Acta* 1980, 618, 35-41.
19. Burk R.F., Hill K.E.: Regulation of selenoproteins. *Ann. Rev. Nutr.* 1993, 13,65-81.
20. Cacciuttolo M.A., Trinh L., Lumpkin J.A., Rao G.: Hyperoxia induces DNA damage in mammalian cells. *Free Rad. Biol. Med.* 1993, 14, 267-276.
21. Campbell D., Bunker V.W., Thomas A.J., Clayton B.E.: Selenium and vitamin E status of healthy and institutionalized elderly subjects: analysis of plasma, erythrocytes and platelets. *Br. J. Nutr.* 1989, 62, 221-227.
22. Carney J.M., Starke-Reed P.E., Oliver C.N., Landum R.W., Cheng M.S., Wu J.F., Floyd R.A.: Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl-alfa-phenylnitron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88, 3633-3636.
23. Carri M.T., Galiazzo F., Ciriolo M.R., Rotilio G.: Evidence for co-regulation of Cu,Zn superoxide dismutase and metallothionein gene expression in yeast through transcriptional control by copper via the ACE 1 factor. *FEBS Lett.* 1991, 278, 263-266.
24. Cellerino R., Guidi G., Perona G.: Plasma Iron and Erythrocytic Glutathione Peroxidase Activity. A Possible Mechanism for Oxidative Haemolysis in Iron Deficiency Anaemia. *Scand. J. Haematol.* 1976, 17, 111-116.
25. Chance B., Sies H., Boveris A.: Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs. *Physiol. Rev.* 1979, 59, 527-591.
26. Chen J.C., Warshaw J.B., Sanadi D.R.: Regulation of Mitochondrial Respiration in Senescence. *J. Cell Physiol.* 1972, 80, 141-148.
27. Chou P.P.: Zinc. W: Pesce A.J., Kaplan L.A. red. *Methods in Clinical Chemistry. The C.V. Mosby Company* 1987, 596-602.

28. Ciechanowski K., Bober J., Machoy Z.: Czy aktywność czerwonokrwinkowej dysmutazy ponadtlenkowej zależy od stężenia miedzi i cynku w surowicy. *Pol. Tyg. Lek.* 1991, XLVI (24-26), 455-457.
29. Ciechanowski K., Machoy Z.: Wolnorodnikowa koncepcja etiopatogenezy cukrzycy insulinozależnej. *Pol. Tyg. Lek.* 1992, XLVII (1-2), 48-50.
30. Clausen J., Nielsen S.A., Kristensen M.: Biochemical and Clinical Effects of an Antioxidative Supplementation of Geriatric Patients. *Biol. Trace Elem. Res.* 1982, 20, 135-151.
31. Congy F., Bonnefont-Rousselot D., Dever S., Delattre J., Emerit I.: Etude du stress oxydant chez le sujet age. *Presse Med.* 1995, 24, 1115-1118.
32. Cutler R.G.: Peroxide-producing potential of tissues: Inverse correlation with longevity of mammalian species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985, 82, 4798-4802.
33. Cutler R.G.: Antioxidants and aging. *Am. J. Clin. Nutr.* 1991, 53, 373S-379S.
34. Danch A., Magner-Wróbel K., Drózd M., Toborek M.: Zmiany zawartości niektórych metali w osoczu i wątrobie szczurów poddanych działaniu prokainamidu i selenu. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1994, XXVII, 67-71.
35. De Lustig E.S., Serra J.A., Kohan S., Canziani G.A., Famulari A.L., Dominguez R.O.: Copper-zinc superoxide dismutase activity in red blood cells and serum in demented patients and in aging. *J. Neurol. Sci.* 1993, 115, 18-25.
36. Dizdaroglu M.: Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat. Res.* 1992, 275, 331-342.
37. Eberle B., Haas H.J.: Purification of selenoprotein Ph from human plasma. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 1993, 7, 217-221.
38. Emerit I.: Free radicals and aging of the skin. *EXS.* 1992, 62, 328-341.
39. Farmer K.J., Sohal R.S.: Effect of ambient temperature on free radical generation, antioxidant defenses and life span in the adult housefly, *Musca domestica*. *Exp. Gerontol.* 1987, 22, 59-65.
40. Favier A.: Actualites sur la place du zinc en nutrition. *Rev. Prat.* 1993, 43(2), 146 -151.
41. Fleming J.E., Miquel J., Cottrell S.F., Yengoyan L.S., Economos A.C.: Is Cell Aging Caused by Respiration - Dependent Injury to the Mitochondrial Genome? *Gerontology* 1982, 28, 44-53.
42. Flohe L., Gunzler W.A., Schock H.H.: Glutathione Peroxidase. A Selenoenzyme. *FEBS Lett.* 1973, 32, 132-134.
43. Forrer R., Gautschi K., Lutz H.: Comparative determination of selenium in the serum of various animal species and humans by means of electrothermal atomic absorption spectrometry. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 1991, 5, 101-113.

44. Frei B., Stocker R., Ames B.N.: Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988, 85, 9748-9752.
45. Fridovich I.: The Biology of Oxygen Radicals. *Science* 1978, 201, 875-880.
46. Fridovich I.: Biological Effects of the Superoxide Radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 1986, 247(1), 1-11.
47. Gilchrest B.A., Rowe J.W.: The Biology of Aging. W: Rowe J.W., Besdine R.W. red. Health and Disease in Old Age. Little, Brown and Comp. Boston USA 1982, 15-23.
48. Gille J.J.P., Joenje H.: Cell culture models for oxidative stress: superoxide and hydrogen peroxide versus normobaric hyperoxia. *Mutat. Res.* 1992, 275, 405-414.
49. Guemouri L., Artur Y., Herbeth B., Jeandel C., Cuny G., Siest G.: Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin. Chem.* 1991, 37, 1932-1937.
50. Gutteridge J.M.C.: Ageing and free radicals. *Med. Lab. Sci.* 1992, 49, 313-318.
51. Gutteridge J.M.C., Quinlan G.J.: Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: the important primary role for iron-binding and iron-oxidising proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1992, 1159, 248-254.
52. Halliwell B.: Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts. *FEBS Lett.* 1978, 96(2), 238-242.
53. Halliwell B.: Reactive Oxygen Species and the Central Nervous System. *J. Neurochem.* 1992, 59, 1609-1622.
54. Halliwell B.: The Role of Oxygen Radicals in Human Disease, with Particular Reference to the Vascular System. *Haemostasis* 1993, 23 (suppl.1), 118-126.
55. Harman D.: Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956, 11, 298-300.
56. Harman D.: Free radical theory of aging. *Mutat. Res.* 1992, 275, 257-266.
57. Harman D.: Free radical involvement in aging. Pathophysiology and therapeutic implications. *Drugs & Aging* 1993, 3(1), 60-80.
58. Harris E.D.: Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J.* 1992, 6, 2675-2683.
59. Hayakawa M., Sugiyama S., Hattori K., Takasawa M., Ozawa T.: Age-associated damage in mitochondrial DNA in human hearts. *Mol. Cell Biochem.* 1993, 119, 95-103.
60. Hayflick L.: Current theories of biological aging. *Federation Proc.* 1975, 34, 9-13.
61. Iskra M., Patelski J., Majewski W.: Concentrations of calcium, magnesium, zinc and copper in relation to free fatty acids and cholesterol in serum of atherosclerotic men. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 1993, 7, 185-188.
62. Jeandel C., Nicolas M.B., Dubois F. i wsp.: Lipid peroxidation and free radical scavengers in Alzheimer's disease. *Gerontology* 1989, 35, 275-282.

63. Jendryczko A., Drózdź M., Magner K.: Fizjopatologia stanów niedoboru miedzi. *Pol. Tyg. Lek.* 1986, XLI(8), 227-229.
64. Jenkins R.R., Goldfarb A.: Introduction: oxidant stress, aging and exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1993, 25, 210-212.
65. Jenkinson S.G., Lawrence R.A., Burk R.F., Williams D.M.: Effects of copper deficiency on the activity of the selenoenzyme glutathione peroxidase and on excretion and tissue retention of $^{75}\text{SeO}_3(2-)$. *J.Nutr.* 1982, 112(1), 197-204.
66. Ji L.L., Dillon D., Wu E.: Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am. J. Physiol.* 1990, 258, R918-R923.
67. Ji L.L.: Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1993, 25, 225-231.
68. Józwiak Z., Jasnowska B.: Changes in oxygen-metabolizing enzymes and lipid peroxidation in human erythrocytes as a function of age of donor. *Mech. Ageing Dev.* 1985, 32, 77-83.
69. Kays S.E., Johnson M.A.: Glutathione peroxidase activity in liver, heart, plasma, and red blood cells of copper-deficient and copper-adequate rats fed fructose. *FASEB J.* 1988, 2, A423 (abstr.).
70. Kehrer J.P.: Free Radicals as Mediators of Tissue Injury and Disease. *Crit. Rev. Toxicol.* 1993, 23, 21-48.
71. Kellogg E.W., Fridovich I.: Superoxide dismutase in the rat and mouse as a function of age and longevity. *J. Gerontol.* 1976, 31, 405-408.
72. Kocemba J.: Odrębności biochemiczne okresu starzenia się. W: Sznajd J. red. *Biochemia kliniczna w praktyce lekarskiej.* PZWL, Warszawa 1983, 796-797.
73. Kodak Ektachem Test Methodology. Eastman Kodak Company 1992, 1-5.
74. Kokot F.: Zaburzenia gospodarki witaminowej i pierwiastkami śladowymi. W: Orłowski W. red. *Nauka o chorobach wewnętrznych t.IV.* PZWL, Warszawa 1989, 27 -38.
75. Kluz Z.: Badania zależności między wiekiem i płcią a stężeniem w surowicy krwi jonów żelaza, jonów miedzi, transferyny i ceruloplazminy ze szczególnym uwzględnieniem wieku podeszłego. Praca doktorska. Akademia Medyczna w Krakowie 1985.
76. Kulikowska E., Moniuszko-Jakoniuk J., Miniuk K.: Rola cynku w procesach fizjologicznych i patologicznych organizmu. *Pol. Tyg. Lek.* 1991, XLVI(24-26), 470 -473.
77. Kwiatowski J.M.: Dysmutaza nadtlenkowa - struktura, funkcja i filogeneza. *Post. Biochem.* 1988, 34, 311-333.
78. Lalonde L., Jean Y., Roberts K.D., Chapdeleine A., Bleau G.: Fluorometry of selenium in serum or urine. *Clin. Chem.* 1982, 28(1), 172-174.

79. Lassen K.O., Horder M.: Selenium status and the effect of organic and inorganic selenium supplementation in a group of elderly people in Denmark. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1994, 54, 585-590.
80. Latour I., Pregaldien J.L., Buc-Calderon P.: Cell death and lipid proxidation in isolated hepatocytes incubated in the presence of hydrogen peroxide and iron salts. *Arch. Toxicol.* 1992, 66, 743-749.
81. Lawrence R.A., Burk R.F.: Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1976, 71, 952-958.
82. Leccia M.T., Richard M.J., Beani J.C., Faure H., Monjo A.M., Cadet J., Amblard P., Favier A.: Protective effect of selenium and zinc on UV-A damage in human skin fibroblasts. *Photochem. Photobiol.* 1993, 58(4), 548-553.
83. Li Y., Trush M.A.: DNA damage resulting from the oxidation of hydroquinone by copper: role for a Cu(II)/Cu(I) redox cycle and reactive oxygen generation. *Carcinogenesis* 1993, 14, 1303-1311.
84. Licastro F., Morini M.C., Chiricolo M., Conte R., Belletti D., Mancini R., Beltrandi E., Casadei-Maldini M., Carpena E.: Plasmic levels of trace elements and immune functions in the healthy elderly. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 1993,7,234-236.
85. Licastro F., Chiricolo M., Morini M.C., Capri I., Davis L.J., Conte R., Mancini R., Melotti C., Parente R., Serra R.: Influence of age and health on immune functions and trace elements. *Gerontology* 1995, 41(4), 235-241.
86. Liczmański A.E.: Toksyczność tlenu. II. Mechanizmy ochronne. *Post. Biochem.* 1988, 34, 293-310.
87. Linnane A.W., Marzuki S., Ozawa T., Tanaka M.: Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet* 1989, i, 642-645.
88. Lipski P.S., Torrance A., Kelly P.J., James O.F.: A study of nutritional deficits of long-stay geriatric patients. *Age-Ageing* 1993, 22, 244-255.
89. Lloyd B., Lloyd R.S., Clayton B.: Effect of smoking, alcohol and other factors on the selenium status of a healthy population. *J. Epidemiol. Community Health* 1983, 37, 213-217.
90. Lopez-Torres M., Perez-Campo R., Rojas C., Cadenas S., Barja G.: Simultaneous induction of SOD, glutathione reductase, GSH, and ascorbate in liver and kidney correlates with survival during aging. *Free Rad. Biol. Med.* 1993, 15, 133-142.
91. Lyman C.P., O'Brien R.C., Green G.C., Papafrangos E.D.: Hibernation and longevity in the Turkish hamster *Mesocricetus brandti*. *Science* 1981, 212, 668-670.
92. Macdougall L.G.: Red cell metabolism in iron deficiency anemia. *J. Ped.* 1972, 80, 775-782.

93. Mackay W.J., Bewley G.C.: The genetics of catalase in *Drosophila melanogaster*: isolation and characterisation of acatalasemic mutants. *Genetics* 1989, 122, 643-652.
94. Madaric A., Ginter E., Kadrabova J.: Serum copper, zinc and copper/zinc ratio in males: influence of aging. *Physiol. Res.* 1994, 43(2), 107-111.
95. Malkiewicz B.: Biochemia żelaza i pierwiastków śladowych oraz ich rola w ustroju. W: Szynajd J. red. *Biochemia kliniczna w praktyce lekarskiej*. PZWL, Warszawa 1983, 176 - 188.
96. Marchaluk E., Persson-Moschos M., Thorling E.B., Akesson B.: Variation in selenoprotein P concentration in serum from different European regions. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1994, 48, 1-7.
97. Marklund S.L.: Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982, 79, 7634-7638.
98. Masoro E.J., Yu B.P., Bertrand H.A.: Action of food restriction in delaying the aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982, 79, 4239-4241.
99. Massie H.R., Baird M.B., McMahon M.M.: Loss of mitochondrial DNA with aging. *Gerontology* 1975, 21, 231-238.
100. McAlpine J.K., Martin B.J., Lyon T.D.S., Fell G.S.: Selenium status of the elderly. *J. Clin. Exp. Gerontol.* 1988-89, 10, 149-155.
101. McCord J.M., Fridovich I.: Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 1969, 244, 6049-6055.
102. McCord J.M., Fridovich I.: The Biology and Pathology of Oxygen Radicals. *Ann. Int. Med.* 1978, 89, 122-127.
103. Miller L., Mills B.J., Blotcky A.J., Lindeman R.D.: Red blood cell and serum selenium concentrations as influenced by age and selected diseases. *J. Am. Coll. Nutr.* 1983, 4, 331-341.
104. Milne L., Nicotera P., Orrenius S., Burkitt M.J.: Effects of Glutathione and Chelating Agents on Copper-Mediated DNA Oxidation: Pro-oxidant and Antioxidant Properties of Glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993, 304, 102-109.
105. Miniuk K., Moniuszko-Jakoniuk J., Kulikowska E.: Biodostępność oraz stany chorobowe przy niedoborze miedzi. *Pol. Tyg. Lek.* 1991, XLVI(24-26), 476-478.
106. Miquel J., Lundren P.R., Bensch K.G., Atlan H.: Effects of temperature on the life span, vitality and fine structure of *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.* 1976, 5, 347-370.
107. Miquel J., de Juan E., Sevilla I.: Oxygen-induced mitochondrial damage and aging. *EXS.* 1992, 62, 47- 57.

108. Misra H.P., Fridovich I.: The Role of Superoxide Anion in the Autooxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.* 1972, 247, 3170-3175.
109. Monget A.L., Galan P., Preziosi P., Keller H., Bourgeois C., Amaud J., Favier A., Hercberg S.: Micronutrient status in elderly people. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 1996, 66, 71-76.
110. Morley J.E.: The resurgence of free radicals. *J. Am. Geriatr. Soc.* 1992, 40, 1285 -1287.
111. Mote P.L., Grizzle J.M., Walford R.I., Spindler S.R.: Age-related down regulation of hepatic cytochrome P1-450, P3-450, catalase and CuZn-superoxide dismutase RNA. *Mech. Ageing Dev.* 1990, 53, 101-110.
112. Munkres K.D.: Genetic coregulation of longevity and antioxidant enzymes in *Neurospora crassa*. *Free Rad. Biol. Med.* 1990, 8(4), 355-361.
113. Neve J.: Methods in determination of selenium status. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 1991, 5, 1-17.
114. Neyman M.R., Zidenberg-Cherr S., McDonald R.B.: Effect of participation in congregate-site meal programs on nutritional status of the healthy elderly. *J. Am. Diet. Assoc.* 1996, 96, 475-483.
115. Niwa Y., Iizawa O., Ishimoto K., Akamatsu H., Kanoh T.: Age-Dependent Basal Level and Induction Capacity of Copper-Zinc and Manganese Superoxide Dismutase and Other Scavenging Enzyme Activities in Leukocytes from Young and Elderly Adults. *Am. J. Pathol.* 1993, 143, 312-320.
116. Nohl H., Hegner D.: Do Mitochondria Produce Oxygen Radicals *in vivo*. *Eur. J. Biochem.* 1978, 82, 563-567.
117. Okahata S., Nishi Y., Hatano S., Kobayashi Y., Usui T.: Changes in Erythrocyte Superoxide Dismutase in a Patient with Copper Deficiency. *Eur. J. Pediatr.* 1980, 134, 121-124.
118. Olin K.L., Walter R.M., Keen C.L.: Copper deficiency affects selenogluthathione peroxidase and antioxidant defense in weanling rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 1994, 59, 654-58.
119. Oliver C.N., Ahn B.W., Moreman E.J., Goldstein S., Stadtman E.R.: Age-related changes in oxidized proteins. *J. Biol. Chem.* 1987, 262, 5488-5491.
120. Olivieri O., Girelli D., Azzini M., Stanzial A.M., Russo C., Ferroni M., Corrocher R.: Low selenium status in the elderly influences thyroid hormones. *Clin. Sci. Colch.* 1995, 89, 637-642.
121. Orr W.C., Sohal R.S.: Extension of life span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 1994, 263, 1128-1130.

122. Ortega R.M., Andres P., Redondo M.R., Zamora M.J., Lopez-Sobaler A.M., Encinas-Sotillos A.: Dietary assessment of a group of elderly Spanish people. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 1995, 46, 137-144.
123. Paglia D.E., Valentine W.N.: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 1987, 70, 158-169.
124. Parizek J.: Health effects of dietary selenium. *Fd. Chem. Toxic.* 1990, 28, 763-765.
125. Pawłowicz Z., Rasmus A., Zamorski R.: Wolne rodniki i ich antyoksydanty. *Wiad. Lek.* 1990, XLIII, 17-18.
126. Perkin-Elmer Methodology - Analysis of serum and plasma: Copper and Zinc. 1982, Jan., 28-30.
127. Perona G., Cellerino R., Guidi G.C., Moschini G., Stievano B.M., Tregnaghi C.: Erythrocytic Glutathione Peroxidase: Its Relationship to Plasma Selenium in Man. *Scand. J. Haematol.* 1977, 19, 116-120.
128. Perrin R., Briancon S., Jeandel C., Artur Y., Minn A., Penin F., Siest G.: Blood activity of Cu/Zn superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in Alzheimer's disease - A case-control study. *Gerontology* 1990, 36, 306-313.
129. Phillips J.P., Campbell S.D., Michaud D., Charbonneau M., Hilliker A.J.: Null mutation of copper/zinc superoxide dismutase in *Drosophila* confers hypersensitivity to paraquat and reduced longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 2761-2165.
130. Pigeolet E., Remacle J.: Alteration of enzymes in ageing human fibroblasts in culture. V. Mechanisms of glutathione peroxidase modification. *Mech. Ageing Dev.* 1991, 58, 93 -109.
131. Pinto R.E., Bartley W.: The effect of age and sex on GSSG reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic GSH oxidation in rat liver homogenates. *Biochem J.* 1969, 112, 109-115.
132. Prasad A.S., Fitzgerald J.T., Hess J.W., Kaplan J., Pelen F., Dardenne M.: Zinc deficiency in elderly patients. *Nutrition* 1993, 9, 218-224.
133. Prohaska J.R.: Changes in tissue growth, concentrations of copper, iron, cytochrome oxidase and superoxide dismutase subsequent to dietary or genetic copper deficiency in mice. *J. Nutr.* 1983, 113, 2048-2058.
134. Prohaska J.R.: Changes in Cu,Zn-superoxide dismutase, cytochrome c oxidase, glutathione peroxidase and glutathione transferase activities in copper-deficient mice and rats. *J. Nutr.* 1991, 121, 355-363.
135. Rao G., Xia E., Nadakavukaren J., Richardson A.: Effect of Dietary Restriction on the Age-Dependent Changes in the Expression of Antioxidant Enzymes in Rat Liver. *J. Nutr.* 1990, 120, 602-609.

136. Rea H.M., Thomson C.D., Campbell D.R., Robinson M.F.: Relation between erythrocyte selenium concentrations and glutathione peroxidase activities of New Zealand residents and visitors to New Zealand. *Br. J. Nutr.* 1979, 42, 201-208.
137. Remacle J., Houbion A., Houben A.: Subcellular fractionation of WI-38 fibroblasts comparison between young and old cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1980, 630, 57-70.
138. Richter C.: Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging. *FEBS Lett.* 1988, 241, 1-5.
139. Ripa S., Ripa R.: Zinc and the elderly. *Minerva Med.* 1995, 86(6), 275-278.
140. Ripa S., Ripa R.: Zinc and immune function. *Minerva Med.* 1995,86(7-8),315-318.
141. Rissanen P.M., Laakkonen E.I., Suntioinen S., Penttila I.M., Uusitupa M.I.: The nutritional status of Finnish home-living elderly people and the relationship between energy intake and chronic diseases. *Age-Ageing* 1996, 25, 133-138.
142. Rodvien R., Gillum A., Weintraub L.R.: Decreased Glutathione Peroxidase Activity Secondary to Severe Iron Deficiency: A Possible Mechanism Responsible for the Shortened Life Span of the Iron-Deficient Red Cell. *Blood* 1974, 43, 281-189.
143. Rose R.C.: Ascorbic acid metabolism in protection against free radicals: a radiation model. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1990, 169, 430-436.
144. Ross D.: Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. *Pharmac. Ther.* 1988, 37, 231-249.
145. Saito T., Ito K., Kurasaki M., Fujimoto S., Kaji H., Saito K.: Determination of true specific activity of superoxide dismutase in human erythrocytes. *Clin. Sci.* 1982, 63, 251-255.
146. Sajewicz I., Badurski J.E.: Wolne rodniki tlenowe i ich rola w patofizjologii kostno - stawowej. *Postępy Osteoartrologii* 1992, 4, 23-31.
147. Salbe A.D., Levander O.A.: Effects of various dietary factors on the deposition of selenium in the hair and nails of rats. *J. Nutr.* 1990, 120, 200-206.
148. Salonen J.T., Alfthan G., Huttunen J.K. i wsp.: Association between cardiovascular death and myocardial infarction and serum selenium in a matched - pair longitudinal study. *Lancet* 1982, 2, 175-179.
149. Samokyszyn V.W., Miller D.M., Reif D.W., Aust S.D.: Inhibition of Superoxide and Ferritin-dependent Lipid Peroxidation by Ceruloplasmin. *J. Biol. Chem.* 1989, 264, 21-26.
150. Schafer L, Thorling E.B.: Lipid peroxidation and antioxidant supplementation in old age. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1990, 50, 69-75.
151. Shock N.W.: Aging of Regulatory Mechanisms. W: Cape R.D.T., Coe R.M., Rossman I. red. *Fundamentals of Geriatric Medicine.* Raven Press, New York, 1985, 51- 61.

152. Sies H., Stahl W., Sundquist A.R.: Antioxidant Functions of Vitamins. Vitamin E and C, Beta-Carotene, and Other Carotenoids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1992, 669, 7-20.
153. Simonoff M., Sergeant C., Garnier N., Moretto P., Llabador Y., Simonoff G., Conri C.: Antioxidant status (selenium, vitamins A and E) and aging. *EXS.* 1992, 62, 368-397.
154. Sinclair A.J., Girling A.J., Gray L., Lunec J., Barnett A.H.: An Investigation of the Relationship between Free Radical Activity and Vitamin C Metabolism in Elderly Diabetic Subject with Retinopathy. *Gerontology* 1992, 38, 268-274.
155. Smith D.K., Teagve R.J., McAdam P.A i wsp.: Selenium status of malnourished hospital patients. *J. Am. Coll. Nutr.* 1986, 5, 243-252.
156. Snook J.T., Palmquist D.L., Moxon A.L. i wsp.: Selenium status of a rural (predominantly Amish) community living in a low - selenium area. *J. Clin. Nutr.* 1983, 38, 620-630.
157. Sohal R.S., Marzabadi M.R., Galaris D., Brunk U.T.: Effect of ambient oxygen concentration on lipofuscin accumulation in cultured rat heart myocytes - A novel in vitro model of lipofuscinogenesis. *Free Rad. Biol. Med.* 1989, 6, 23-30.
158. Sohal R.S., Allen R.G.: Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: A unifying hypothesis. *Exp. Gerontol.* 1990, 25, 499-522.
159. Sohal R.S., Sohal B.H., Brunk U.T.: Relationship between antioxidant defenses and longevity in different mammalian species. *Mech. Ageing Dev.* 1990, 53, 217-227.
160. Sohal R.S., Orr W.C.: Relationship between Antioxidants, Prooxidants, and the Aging Process. *Am. N. Y. Acad. Sci.* 1992, 663, 74-84.
161. Sone Y.: Age-associated problems in nutrition. *Appl. Human Sci.* 1995, 14, 201 -210.
162. Sorenson J.: Pharmacologic activities of copper compounds in chronic diseases. *J. Biol. Trace Elem. Res.* 1983, 5, 257.
163. Spallholz J.E.: On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Rad. Biol. Med.* 1994, 17: 45-64.
164. Stadtman E.R.: Protein Oxidation and Aging. *Science* 1992, 257, 1220-1224.
165. Stadtman E.R., Starke-Reed P.E., Oliver C.N., Carney J.M., Floyd R.A.: Protein modification in aging. *EXS.* 1992, 62, 64-72.
166. Starke-Reed P.E., Oliver C.N.: Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* 1989, 275, 559-567.
167. Stogner S.W., Payne D.K.: Oxygen toxicity. *Ann. Pharmather.* 1992, 26, 1554 -1562.
168. Susuki T., Hongo T., Ohba T. i wsp.: The relation of dietary selenium to erythrocyte and plasma selenium concentration in Japanese college women. *Nutr. Res.* 1989, 9, 839-848.

169. Suzuki Y.I., Tsuchiya M., Wassall S.R., Choo Y.M., Govil G., Kagan V.E., Packer L.: Structural and Dynamic Membrane Properties of alfa-Tocopherol and alfa-Tocotrienol: Implication to the Molecular Mechanism of Their Antioxidant Potency. *Biochemistry* 1993, 32, 10692-10699.
170. Sweeney M.P., Bagg J., Fell G.S., Yip B.: The relationship between micronutrient depletion and oral health in geriatrics. *J. Oral Pathol. Med.* 1994, 24, 168-171.
171. Sznajd J., Idzior-Waluś B.: Praktyczne uwagi i wskazówki dotyczące wykorzystania badań biochemicznych w diagnostyce i terapii dyscyplin zachowawczych. W: Sznajd J. red. *Biochemia kliniczna w praktyce lekarskiej*. PZWL, Warszawa 1983, 985-1011.
172. Tanaka H., Okada T., Konishi H., Tsuji T.: The effect of reactive oxygen species on the biosynthesis of collagen and glycosaminoglycans in cultured human dermal fibroblasts. *Arch. Dermatol. Res.* 1993, 285, 352-355.
173. Thomas J.P., Maiorino M., Ursini F., Girotti A.W.: Protective Action of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase against Membrane-damaging Lipid Peroxidation. *J. Biol. Chem.* 1990, 265, 454-461.
174. Thomson C.D., Rea H.M., Robinson M.F., Chapman O.W.: Low blood selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in the elderly. *Proc. Uni. Otago Med. Sch.* 1977, 55, 18-19.
175. Troncale J.A.: Starzenie się. Zmiany fizjologiczne i ich znaczenie dla farmakoterapii. *Medycyna po Dyplomie* 1997, 6: 42-49.
176. Trounce I., Byrne E., Marzuki S.: Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in ageing. *Lancet.* 1989, i, 637-639.
177. Tsuchiya M., Scita G., Freisleben H.J., Kagan V.E., Packer L.: Antioxidant Radical - Scavenging Activity of Carotenoids and Retinoids Compared to alfa-Tocopherol. *Method. Enzym.* 1992, 213, 460-472.
178. Ursini F., Maiorino M., Valente M., Ferri K., Gregolin C.: Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim. Biophys. Acta* 1982, 710, 197-211.
179. Valentine J.L., Kang H.K., Faraji B., Lachenbruch P.A.: Selenium Status and Age Effects. W: Wendel A. red. *Selenium in Biology and Medicine*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1989, 286 -293.
180. Van Acker S.A.B.E., Koymans L.M.H., Bast A.: Molecular Pharmacology of vitamin E: structural aspects of antioxidant activity. *Free Rad. Biol. Med.* 1993, 15, 311-328.
181. Van Dael P., Deelstra H.: Selenium. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 1993, 63, 312-316.

182. Vanella A., Geremia E., D'Urso G., Tiriolo P., Disilvestro I., Grimaldi R., Pinturo R.: Superoxide dismutase activities in aging rat brain. *Gerontology* 1982, 28, 108-113.
183. Vannucchi H., da-Cunha D.F., Bernardes M.M., Unamuno M.R.: Serum levels of vitamin A, E, C and B₂, carotenoid and zinc in hospitalized elderly patients. *Rev. Saude Publica* 1994, 28, 121-126.
184. Verlinden M., Van Sprundel M., Van der Auwera J.C., Eylembosch W.J.: The selenium status of Belgian population groups. II. Newborns, children and the aged. *Biol. Trace Element. Res.* 1983, 5, 103-113.
185. Vertechy M., Cooper M.B., Ghirardi O., Ramacci M.T.: Antioxidant enzyme activities in heart and skeletal muscle of rats of different ages. *Exp. Gerontol.* 1989, 24, 211-218.
186. Watson R.R., Leonard T.K.: Selenium and vitamins A, E, and C: Nutrients with cancer prevention properties. *J. Am. Dietet. Assoc.* 1986, 84, 505-510.
187. Weindruch R., Walford R.L., Fligiel S., Guthrie D.: The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake. *J. Nutr.* 1986, 116, 641-654.
188. Weisiger R.A., Fridovich I.: Mitochondrial superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 1973, 248, 4793-4796.
189. Whanger P.D.: China, A Country with Both Selenium Deficiency and Toxicity: Some Thoughts and Impressions. *J. Nutr.* 1989, 119, 1236-1239.
190. Willet W.C., Morris J.S., Pressel S., Taylor J.O., Polk B.F., Stampfer M.J., Rosner B., Schneider K., Hames C.G.: Prediagnostic serum selenium and risk of cancer. *Lancet* 1983, ii, 130-134.
191. Yang J.G., Morrison-Plummer J., Burk R.F.: Purification and quantitation of a rat plasma selenoprotein distinct from glutathione peroxidase using monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* 1987, 262, 13372-13375.
192. Yang J.G., Hill K.E., Burk R.F.: Dietary selenium intake controls rat plasma selenoprotein P concentration. *J. Nutr.* 1989, 119, 1010-1012.
193. Zachara B.: Selen i peroksydaza glutationowa we krwi dzieci. *Pol. Tyg. Lek.* 1983, XXXVIII, 28-29, 909-913.
194. Zachara B., Gromadzińska J., Wąsowicz W.: Stężenie selenu i aktywność peroksydazy glutationowej we krwi, krwinkach czerwonych i w osoczu. *Pol. Tyg. Lek.* 1983, XXXVIII, 28-29, 897-900.
195. Zerba E., Komorowski T.E., Faulkner J.A.: Free radical injury to skeletal muscle of young, adult, and old mice. *Am. J. Physiol.* 1990, 258, C429-C435.
196. Zs-Nagy I.: A Proposal for Reconsideration of the Role of Oxygen Free Radicals in Cell Differentiation and Aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1992, 673, 142-148.

197. Żakowska-Wachelko B.: Ewolucja współczesnych teorii starzenia. Gerontologia Polska 1995, 1-2, 5-9.

9. Spis tabel i rycin

- Tab. 1. Wiek i liczebność badanych
- Tab. 2. Schemat przygotowania prób do badania aktywności dysmutazy ponadtlenkowej.
- Tab. 3. Schemat przygotowania prób do badania aktywności katalazy.
- Tab. 4. Schemat przygotowania prób do badania aktywności peroksydazy glutationowej.
- Tab. 5. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (Cat) i peroksydazy glutationowej (GSH-Px) w erytrocytach i osoczu osób młodych.
- Tab. 6. Stężenia żelaza (Fe), cynku (Zn), miedzi (Cu) i selenu (Se) w osoczu i erytrocytach osób młodych.
- Tab. 7. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (Cat) i peroksydazy glutationowej (GSH-Px) w erytrocytach i osoczu osób starszych.
- Tab. 8. Stężenia żelaza (Fe), cynku (Zn), miedzi (Cu) i selenu (Se) w osoczu i erytrocytach osób starszych.
- Tab. 9. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (Cat) i peroksydazy glutationowej (GSH-Px) w erytrocytach (E) i w osoczu w poszczególnych grupach.
- Tab. 10. Stężenia żelaza (Fe), cynku (Zn), miedzi (Cu) i selenu (Se) w osoczu i erytrocytach (E) w poszczególnych grupach.
- Tab. 11. Zachowanie się aktywności enzymów antyoksydacyjnych w krwinkach osób starszych w porównaniu z młodymi - przegląd piśmiennictwa.
- Tab. 12. Zachowanie się aktywności enzymów antyoksydacyjnych w tkankach starych zwierząt doświadczalnych - przegląd piśmiennictwa.
- Ryc. 1. Aktywność peroksydazy glutationowej w erytrocytach - wartości średnie i odchylenia standardowe.
- Ryc. 2. Aktywność peroksydazy glutationowej w osoczu - wartości średnie i odchylenia standardowe.
- Ryc. 3. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w erytrocytach - wartości średnie i odchylenia standardowe.
- Ryc. 4. Zestawienie procentowe osób z niedoborem selenu w osoczu w poszczególnych grupach.
- Ryc. 5. Stężenie selenu w erytrocytach - wartości średnie i odchylenia standardowe.
- Ryc. 6. Stężenie miedzi w osoczu - wartości średnie i odchylenia standardowe.

- Ryc. 7. Stężenie cynku w osoczu - wartości średnie i odchylenia standardowe.
- Ryc. 8. Aktywność osoczowej peroksydazy glutationowej a stężenie selenu w osoczu w grupie kobiet młodych.
- Ryc. 9. Aktywność osoczowej peroksydazy glutationowej a stężenie selenu w osoczu w grupie mężczyzn młodych.
- Ryc. 10. Aktywność osoczowej peroksydazy glutationowej a stężenie selenu w osoczu w grupie kobiet starszych.
- Ryc. 11. Aktywność osoczowej peroksydazy glutationowej a stężenie selenu w osoczu w grupie mężczyzn starszych.
- Ryc. 12. Aktywność erytrocytarniej peroksydazy glutationowej a stężenie selenu w erytrocytach w grupie kobiet młodych.
- Ryc. 13. Aktywność erytrocytarniej peroksydazy glutationowej a stężenie selenu w erytrocytach w grupie mężczyzn młodych.
- Ryc. 14. Aktywność erytrocytarniej peroksydazy glutationowej a stężenie selenu w erytrocytach w grupie kobiet starszych.
- Ryc. 15. Aktywność erytrocytarniej peroksydazy glutationowej a stężenie selenu w erytrocytach w grupie mężczyzn starszych.
- Ryc. 16. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej a stężenie miedzi w erytrocytach w grupie młodych mężczyzn.

