

Identyfikacja i właściwości niekonwencjonalnych produktów zaawansowanej glikacji występujących w surowicy ludzkiej

mgr inż. Kinga Gostomska-Pampuch

Końcowe produkty zaawansowanej glikacji, tzw. AGEs (ang. *advanced glycation end-products*), powstają na skutek nieenzymatycznej reakcji Maillarda, w której następujące po sobie etapy ostatecznie prowadzą do powstania silnie usieciowanych związków. Trwałe agregaty AGEs kumulują się w organizmie, prowadząc do zaburzeń homeostazy. Glikacja zachodzi pomiędzy grupą karbonylową cukrów redukujących i niskocząsteczkowych aldehydów a grupami zasadowymi białek, lipidów, i kwasów nukleinowych. AGEs mogą powstawać endogennie w wyniku reakcji rozmaitych metabolitów w organizmie, jak również mogą być otrzymywane poza organizmem podczas termicznego przetwarzania żywności. Z powodu dużej różnorodności substratów oraz warunków w jakich może zachodzić proces glikacji, powstałe produkty stanowią heterogenną grupę związków o zróżnicowanych właściwościach biologicznych i fizyko-chemicznych. Glikacja nasila się w chorobach metabolicznych, którym towarzyszy stres oksydacyjny, np. w cukrzycy, miażdżycy, chorobie Alzheimera i w nowotworach. Poznanie szczegółowych mechanizmów prowadzących do tych patologii jest kluczem do prawidłowej diagnostyki, kontrolowania postępu choroby i opracowania skutecznych metod leczenia. AGEs mogą także stanowić markery diagnostyczne dla określonych stanów patologicznych, jednak wciąż jest za mało informacji na temat struktur oraz właściwości biologicznych gromadzących się w organizmie produktów glikacji umożliwiających opracowanie czułych i swoistych metod diagnostycznych.

Wcześniejsze badania naszego zespołu wykazały obecność w organizmie ludzkim nowego antygeny AGE, którego modelowy analog strukturalny otrzymano na skutek glikacji białek z melibiozą w warunkach bezwodnych (produkt MAGE, ang. *Melibiose-derived AGE*). Celem niniejszej pracy doktorskiej było wyizolowanie naturalnie występującego MAGE z krwi ludzkiej, identyfikację rodzaju białka nośnikowego oraz charakterystykę za pomocą metod spektrometrycznych i immunochemicznych.

W pracy zsyntezowano szereg modelowych białkowych produktów glikacji (w tym MAGE) poddając glikacji wybrane białko (mioglobinę) przez różne cukry i aldehydy z wykorzystaniem wcześniej zoptymalizowanej metody mikrofalowej oraz konwencjonalnej reakcji glikacji w roztworze. Analiza widm absorpcyjnych i fluorescencyjnych poszczególnych AGEs pozwoliła na opisanie ich właściwości fizykochemicznych i wskazanie różnic w

otrzymanych strukturach w zależności od zastosowanej metody syntezy. Otrzymane wyniki potwierdziły, że produkty MAGE wykazują odmienną strukturę i właściwości od konwencjonalnych AGEs opisywanych dotąd w literaturze. Ponadto, otrzymano niskocząsteczkowy produkt MAGE (LMW-MAGE), którego właściwości fluorescencyjne i struktura odpowiadają modyfikacjom obecnym na białkowym produkcie MAGE (HMW-MAGE), co potwierdzono za pomocą analizy spektrometrii mas.

W toku badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej, wyselekcjonowano pojedynczy klon mysich komórek hybrydowych produkujących przeciwciała anty-MAGE stosując metodę seryjnych rozcieńczeń i potwierdzono swoistość wiązania epitopu MAGE na produktach HMW-MAGE i LMW-MAGE, przy jednoczesnym braku reakcji z innymi konwencjonalnymi AGEs. Mysie przeciwciała monoklonalne anty-MAGE oczyszczone metodą powinowactwa na złożu z immobilizowanym HMW-MAGE, wykorzystano do wydzielenia z krwi ludzkiej naturalnego produktu MAGE. Wyniki badań spektrometrycznych i immunochemicznych wykazały obecność epitopu MAGE na takich białkach jak albumina krwi, IgG i IgA. W surowicy pacjentów z cukrzycą ten antygen zidentyfikowano głównie na albuminie i IgG, natomiast u osób zdrowych na immunoglobulinach typu G i A.

Identyfikacja surowicznych białek, na których obecny jest antygen MAGE dostarcza nowej wiedzy na temat procesu glikacji w organizmie człowieka. Ponadto, specyficzne przeciwciała anty-MAGE posłużą do opracowania testu do oznaczania poziomu produktów MAGE w tkankach. Na podstawie zsyntezowanego LMW-MAGE używanego jako wzorca możliwy będzie ilościowy pomiar MAGE w próbkach biologicznych.