

Decreased plasma concentrations of α -ketoglutarate in patients with chronic symptomatic coronary heart disease compared with healthy controls

Obniżone stężenie α -ketoglutaranu w osoczu pacjentów z przewlekłą, objawową chorobą wieńcową w porównaniu z osobami zdrowymi

Magdalena Stachura¹, Per Gustavsson², Stefan G. Pierzynowski^{2, 3}, Jacek Wroński⁴

¹Cardiology Department with Cardiology Intensive Care Unit, Ministry of Interior and Administration Hospital, Lublin, Poland (Oddział Kardiologii z Pododdziałem Intensywnej Opieki Kardiologicznej Szpitala MSWiA w Lublinie)

²Department of Cell and Organism Biology, Lund University, Lund, Sweden

³Department of Medical Biology, Institute of Agricultural Medicine, Lublin, Poland (Zakład Biologii Medycznej Instytutu Medycyny Wsi w Lublinie)

⁴Department of Vascular Surgery and Angiology, Medical University of Lublin, Lublin, Poland (Klinika Chirurgii Naczyń i Angiologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie)

Abstract

Background. Recent studies revealed that mitochondrial function is altered since the earliest stages of atherosclerosis development. Experimental studies results revealed that endothelial dysfunction, elevated levels of inflammatory cytokines, such as excessive reactive oxygen species production, which underlie atherosclerosis, result in significant disruptions in the Krebs cycle flux. However, there is little data about the influence of atherosclerosis on the Krebs cycle intermediates concentrations in people. The aim of the study was to evaluate a possible influence of chronic cardiac ischemia on plasma concentrations of α -ketoglutarate in people with stable symptomatic coronary heart disease.

Material and methods. Blood samples were collected from 53 patients, with stable, symptomatic coronary heart disease confirmed in coronarography, who were admitted to the hospital due to persistent severe angina despite pharmacological treatment, without the elevation of cardiac enzymes blood level. The control group included 20 healthy people. Plasma concentrations of α -ketoglutarate were determined using an high-performance liquid chromatography (HPLC).

Results. Patients with stable coronary heart disease had significantly lower α -ketoglutarate plasma concentrations compared to healthy controls. There were no statistically significant differences in other analyzed clinical and biochemical parameters between both groups.

Conclusions. 1. Patients with chronic myocardial ischemia have lower plasma concentrations of α -ketoglutarate comparing to healthy controls. 2. The decrease of plasma α -ketoglutarate concentrations in these patients may be a consequence of the Krebs cycle disruption due to the influence of endothelial dysfunction and inflammatory processes involved in the development of atherosclerosis, however further investigations are required.

Key words: α -ketoglutarate, Krebs cycle, oxidative stress, atherosclerosis

Streszczenie

Wstęp. Wyniki dotychczasowych badań sugerują, że już od najwcześniejszych etapów rozwoju miażdżycy naczyń krwionośnych zachodzą zmiany w funkcjonowaniu mitochondriów komórek. Wyniki badań eksperymentalnych sugerują, że dysfunkcja śródbłonna, podwyższone stężenia cytokin prozapalnych, jak również nadmierne wytwarzanie wolnych rodników tlenowych, obserwowane w przebiegu miażdżycy, znacząco zabu-

Address for correspondence:

Magdalena Stachura
ul. Koncertowa 7/10
20–843 Lublin

rzają reakcje cyklu Krebsa. Obecnie jednak mało jest danych z badań klinicznych na temat wpływu miażdżycy na stężenia metabolitów cyklu Krebsa u ludzi. Celem niniejszej pracy było określenie wpływu niedokrwienia mięśnia sercowego u pacjentów z chorobą wieńcową na osoczowe stężenie α -ketoglutaranu.

Materiał i metody. Do badania włączono 53 pacjentów z potwierdzoną w badaniu koronarograficznym chorobą niedokrwinną serca, którzy zostali przyjęci do szpitala z powodu utrzymywania się, mimo zastosowania farmakoterapii, objawów stabilnej dławicy piersiowej, bez towarzyszącego wzrostu stężenia markerów martwicy mięśnia sercowego we krwi. Do grupy kontrolnej włączono 20 zdrowych osób. Wartości osoczowych stężeń α -ketoglutaranu określono z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

Wyniki. Pacjenci z utrzymującymi się objawami stabilnej przewlekłej choroby wieńcowej charakteryzowali się istotnie niższymi wartościami stężeń α -ketoglutaranu w osoczu w porównaniu z osobami z grupy kontrolnej. Obie grupy nie wykazywały istotnych statystycznie różnic pod względem innych analizowanych parametrów klinicznych i biochemicznych.

Wnioski. 1. Wartości osoczowych stężeń α -ketoglutaranu u pacjentów ze stabilnym niedokrwieniem mięśnia sercowego są niższe w porównaniu z osobami zdrowymi. 2. Spadek zawartości α -ketoglutaranu w osoczu u tych pacjentów może być rezultatem zaburzeń przebiegu reakcji cyklu Krebsa spowodowanych dysfunkcją śródbłonna i procesami zapalnymi w naczyniach zaangażowanych w rozwój miażdżycy, chociaż do potwierdzenia tej tezy potrzebne są dalsze badania.

Słowa kluczowe: α -ketoglutaran, cykl Krebsa, stres oksydacyjny, miażdżycy

Acta Angiol 2013; 19, 2: 82–92

Introduction

Despite cardiovascular mortality trend gradually decreases, coronary heart disease still remains one of the most frequent causes of death, especially in developed countries. The reduction in coronary heart disease mortality rates is most indicated in Western countries and is connected either with primary prevention strategies implemented by authorities and health care professionals, or improvements in medical treatment [1–3]. The amount of deaths caused by coronary heart disease has decreased since 1980's in these countries. Statistical data concerning Eastern Europe are more differentiated. In some countries, such as Poland, Czech Republic, Slovakia, Hungary and Slovenia the decline in coronary heart disease mortality can be observed since the beginning of economic and market transformation in 1990's, while in other countries, such as Russia, Bulgaria, and Romania cardiovascular death rates have not significantly changed and still remain high [2]. The reduction in total cholesterol plasma level, such as blood pressure values lowers the risk of cardiovascular death, while diabetes prevalence, body mass index and smoking are positively correlated with coronary disease mortality rate [1, 3]. Furthermore, essential changes in food consumption, such as reduced animal fat intake and increased consumption of n-3 fatty acids results in recent decline of cardiovascular deaths prevalence [2]. Coronary heart disease is the important manifestation of atheroscle-

Wstęp

Mimo stopniowego spadku śmiertelności z przyczyn sercowo-naczyniowych choroba wieńcowa pozostaje nadal jedną z głównych przyczyn zgonów, zwłaszcza w krajach rozwiniętych. Zmniejszenie śmiertelności wywołanej chorobą niedokrwinną serca jest najbardziej widoczne w krajach Europy Zachodniej i ma związek zarówno z działaniami z zakresu prewencji pierwotnej, wdrożonymi przez władze i pracowników ochrony zdrowia, jak też z rozwojem metod leczniczych [1–3]. W krajach tych liczba zgonów spowodowanych chorobą niedokrwinną serca obniża się od lat 80. ubiegłego wieku. W przypadku krajów Europy Wschodniej dane statystyczne są bardziej zróżnicowane. W niektórych krajach, jak Polska, Czechy, Słowacja, Węgry i Słowenia spadek śmiertelności z powodu choroby wieńcowej jest widoczny od momentu rozpoczęcia przemian ekonomicznych, które miały miejsce w latach 90. XX wieku, podczas gdy w innych krajach, jak Rosja, Bułgaria, czy Rumunia ilość zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych nie uległa zmniejszeniu i nadal pozostaje wysoka [2]. Obniżenie stężenia cholesterolu całkowitego we krwi i redukcja wartości ciśnienia tętniczego zmniejszają prawdopodobieństwo zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych, natomiast występowanie cukrzycy, (wysoka?) wartość indeksu masy ciała czy palenie tytoniu wykazują dodatnią zależność z ryzykiem zgonu spowodowanego chorobą niedokrwinną serca [1, 3]. Co więcej, również zmiany

rosis, however, it is known that atherosclerotic lesions may also form in arterial vessels in other locations, thus leading to numerous complications, such as brain stroke, aortic aneurysm formation, peripheral arterial disease, abdominal angina, or renal failure.

It has been proved that endothelial dysfunction is the early stage of atherosclerosis development. The endothelium is the internal layer of blood vessels, that plays crucial role in vascular tone regulation by the secretion of vasodilators, such as NO, prostacyclines and vasoconstrictors (angiotensin, endothelin-1, tromboxane A₂ and superoxide anion). Moreover, the endothelium prevents from thrombus forming due to the synthesis and secretion of anticoagulative substances, such as antithrombin III, tissue factor inhibitor, and protein S, platelets antiadherents (NO and prostacyclin), and fibrinolytic factors (tissue plasminogen activator), which in healthy people outweighs endothelial synthesis and secretion of procoagulative substances (von Willenbrand factor, fibronectin and thrombospondine). In the presence of atherosclerosis risk factors, the balance between different endothelium actions is disrupted. Such status, called endothelium dysfunction, comprises not only reduced vasodilating and anticoagulative endothelial actions, but also enhanced proinflammatory molecules synthesis, that enables leucocytes migration into the intima [4–6]. Moreover, recent findings suggest that endothelial dysfunction has an impact on energy generation in mitochondria. It has been shown that disrupted endothelium functions result in the Krebs cycle inhibition and enhanced glycolytic pathway of pyruvate usage, similarly to the hypoxia conditions, and due to it the Krebs cycle inhibition seems to be an early marker of endothelium dysfunction [7]. One of the Krebs cycle intermediates is α -ketoglutarate, which is subsequently converted in mitochondria to succinyl-CoA by α -ketoglutarate dehydrogenase [8]. There is growing evidence that cardiovascular risk factors not only disrupt endothelium functions, but also enhance the production of reactive oxygen species (ROS) by either endothelium or located in blood vessel walls leucocytes. Oxidative stress, described as an imbalance between reactive oxygen species (ROS) production and elimination, in favor the former, is known to be characteristic to diabetes, hypertension and atherosclerosis. On the other hand the level of oxidative stress may be influenced by the lifestyle modification. According to recent data people, who regularly perform aerobic and anaerobic exercises, have lower levels of blood oxidative stress biomarkers than people avoiding training [9]. Excessive ROS production not only damages proteins and DNA, but also results in lipids peroxidation. It has been proved that circulating

nawyków żywieniowych polegające na ograniczeniu spożycia tłuszczów zwierzęcych i zwiększeniu konsumpcji n-3 nienasyconych kwasów tłuszczowych przyczyniły się do obserwowanej obecnie redukcji śmiertelności z przyczyn sercowo-naczyniowych [2]. Choroba niedokrwienna serca jest powikłaniem miażdżycy o dużym znaczeniu klinicznym. Wiadomo jednak, że blaszki miażdżycowe mogą powstawać również w tętnicach zaopatrujących inne narządy i tym samym powodować wiele innych komplikacji, jak udar mózgu, powstawanie tętniaków aorty, miażdżycę tętnic kończyn dolnych, anginę brzuszna czy niewydolność nerek.

Udowodniono, że na wczesnym etapie rozwoju miażdżycy występują zaburzenia funkcji komórek śródbłonna. Śródbłonek jest wewnętrzną warstwą naczyń krwionośnych i odgrywa kluczową rolę w regulacji stanu napięcia naczyń poprzez uwalnianie substancji rozszerzających naczynie, jak tlenek azotu (NO) i prostacyklina, jak również czynników obkurczających naczynie (angiotensyna, endothelina-1, trombosan A₂, anion ponadtlenkowy). Co więcej, śródbłonek pełni również funkcję ochronną przed formowaniem się skrzepliny w świetle naczynia, produkując i uwalniając czynniki zapobiegające wykrzepianiu, jak antytrombina III, inhibitor czynnika tkankowego i białko S, substancje zapobiegające przyleganiu płytek (NO i prostacyklina), jak również czynniki fibrynolityczne (tkankowy aktywator plazminogenu). W przypadku śródbłonna osób zdrowych produkcja wymienionych substancji przeważa nad wytwarzaniem przez endothelium czynników prozakrzepowych (czynnik von Willenbranda, fibronektyna i trombospondyna). Natomiast w obecności czynników ryzyka miażdżycy równowaga pomiędzy różnymi rolami pełnionymi przez komórki śródbłonna ulega zakłóceniu. Stan taki, nazywany dysfunkcją śródbłonna, charakteryzuje się nie tylko zmniejszeniem sekrecji czynników naczyniorozszerzających i przeciwzakrzepowych, ale również wzmożoną produkcją cząstek prozapalnych, co umożliwia przechodzenie leukocytów do błony wewnętrznej naczyń [4–6]. Wyniki ostatnich badań sugerują ponadto, że dysfunkcja śródbłonna wpływa na procesy energetyczne zachodzące w mitochondriach. Wykazano, że zaburzona czynność komórek endothelium powoduje zahamowanie aktywności cyklu Krebsa i podobnie jak w warunkach hipoksji, wzmacnia aktywność przemian bursztynianu w procesie glikolizy, co wskazuje na to, że zahamowanie aktywności cyklu Krebsa może być uznane za wczesny marker dysfunkcji śródbłonna [7]. Jednym z metabolitów cyklu Krebsa jest α -ketoglutaran, który jest następnie przekształcany w mitochondriach przez enzym dehydrogenazę α -ketoglutaranu do bursztynylo-koenzymu A (bursztynylo-CoA) [8]. Coraz więcej

oxidized low-density lipoproteins (LDL) enable foam cells formation in atherosclerotic plaques. Furthermore, both ROS and oxidized LDL enhance disruptions in mitochondrial processes [4, 6, 10, 11]. Excessive production of ROS leads to the apoptosis of either vascular smooth muscle cells, or macrophages in atherosclerotic lesions, and thus results in atherosclerotic plaques rupture [12]. The destabilization of atherosclerotic lesions enables thrombus forming, which rapidly limits the flow of blood, produces acute heart ischemia symptoms and leads to myocardial infarction. Ischemia affects processes of energy generating in heart tissue mitochondria by triggering anaerobic metabolic pathways, such as anaerobic glycolysis and fatty acids utilization, enhanced glucose uptake and the decrease of heart muscle contractility. Moreover, it has been established that ROS production increases rapidly during ischemia, such as after the reperfusion [13, 14].

Located in mitochondrial matrix α -ketoglutarate is known to be an intermediate in the Krebs cycle, while the origin and functions of plasma α -ketoglutarate have not been completely established yet. According to the concept of anaplerosis and cataplerosis, some of the Krebs cycle metabolites may pass through mitochondrial and cell membranes, and due to it excessive amounts of the Krebs cycle intermediates can be removed from cells (kataplerosis), while some other substances can be used to restore necessary concentrations of intermediates (anaplerosis). One of these substances is glutamate, which is converted to α -ketoglutarate in reactions catalysed by glutamate dehydrogenase and aminotransferases [8]. However, the issue of possible links between plasma levels of α -ketoglutarate and atherosclerosis in people still needs further investigations. The aim of the study was to evaluate the influence of cardiac ischemia on plasma concentrations of α -ketoglutarate in people with stable, symptomatic coronary heart disease.

Material and methods

The study group included 53 men, aged 42–87 years, with coronary heart disease confirmed in coronarography, who were admitted to the hospital due to persistent angina despite pharmacological treatment, without elevated cardiac enzyme blood level. The control group included 20 healthy men aged 56–70 years. The study was approved by the local Ethic Committee. Patient blood samples were collected in the morning, after 8 hours of fasting, in the second day of hospitalization, and control blood samples were also obtained in the morning, after 8-hour fasting period. Blood samples were collected for EDTA, with the use of Sarstedt's Microvette Capillary Blood Collection Systems, spun at 5 thousands

danych wskazuje na to, że obecność czynników ryzyka miażdżycy nie tylko wywołuje dysfunkcję śródbłonna, ale również nasila produkcję wolnych rodników tlenowych (ROS, *reactive oxygen species*) zarówno przez komórki endotelium, jak też i przez leukocyty obecne w ścianie naczyń krwionośnych. Stres oksydacyjny, który polega na przewadze wytwarzania ROS nad procesami ich eliminacji, jest charakterystyczny dla cukrzycy, nadciśnienia czy miażdżycy naczyń. Z drugiej jednak strony na poziom stresu oksydacyjnego mogą również wpływać modyfikacje stylu życia. Udowodniono, że u osób, które regularnie wykonują ćwiczenia aerobowe i anaerobowe stężenie markerów stresu oksydacyjnego we krwi jest niższe w porównaniu z osobami, które unikają aktywności fizycznej [9]. Nadmierna produkcja ROS nie tylko uszkadza białka i DNA komórek, ale również powoduje utlenianie lipidów. Wykazano, że zawarte w krążeniu utlenione lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL, *low-density lipoproteins*), ułatwiają powstawanie komórek piankowatych w blaszkach miażdżycowych. Co więcej, zarówno ROS, jak i utlenione LDL nasilają powstałe zaburzenia funkcji mitochondriów [4, 6, 10, 11]. Nadmierna produkcja ROS prowadzi do apoptozy komórek mięśni gładkich i makrofagów w blaszkach miażdżycowych, prowadząc do ich pęknięcia [12]. Destabilizacja blaszki miażdżycowej zlokalizowanej w tętnicy wieńcowej prowadzi do powstania zakrzepu, który gwałtownie ogranicza przepływ krwi w naczyniu, wywołując objawy ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego i powodując zawał serca. Niedokrwienie zmienia sposób pozyskiwania energii w mitochondriach tkanki mięśnia sercowego poprzez aktywację beztlenowej glikolizy i rozkładu kwasów tłuszczowych, powoduje również nasilenie wychwytu glukozy i osłabienie kurczliwości mięśnia sercowego. Wykazano również, że zarówno podczas niedokrwienia, jak i reperfuzji produkcja ROS szybko wzrasta [13, 14].

Wiadomo, że zawarty w macierzy mitochondrialnej α -ketoglutaran jest metabolitem pośrednim cyklu Krebsa, natomiast pochodzenie i rola osoczowego α -ketoglutaranu nie zostały jeszcze dostatecznie zbadane. Zgodnie z teorią anaplerozy i kataplerozy niektóre substancje, będące produktami pośrednimi w cyklu Krebsa, mogą swobodnie przechodzić przez błony mitochondrialne i komórkowe, dzięki czemu nadmierne ilości tych związków mogą być usuwane z komórek (proces kataplerozy). Natomiast gdy ich ilość jest niewystarczająca, mogą one zostać odtworzone z innych związków chemicznych (proces anaplerozy). Jedną z takich substancji jest kwas glutaminowy, który może zostać przekształcony do α -ketoglutaranu w reakcjach katalizowanych przez dehydrogenazę glutaminianową i aminotransferazy [8].

of revolutions for a 10 minutes and kept frozen in -25°C until further analysis. Subsequently plasma samples were defrosted and deproteinised by filtration through 10 kDa molecular weight cut-off filters (Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA) for 2 hours at 14 thousands of revolutions. Concentrations of α -ketoglutarate in plasma samples were determined using an high-performance liquid chromatography (HPLC) system, that consisted of an LC-10AD isocratic pump (Shimadzu, Kyoto, Japan), a Basic Marathon Plus autosampler (Spark Holland, Emmen, Netherlands), a Mistral Column Oven (Spark Holland) and a SPD-10A VP UV detector (Shimadzu). Samples were separated on an RSpak KC-811 column (Shodex, Kawasaki, Japan) using 25 mM perchloric acid as a mobile phase (ISO-grade, Sigma Aldrich, Stockholm, Sweden) with a flow rate of 0.6 ml/min for 100 minutes. Separation was carried out at 50°C and α -ketoglutarate was detected at a wavelength of 210 nm. The system was calibrated against a standard series of α -ketoglutarate dissolved in Millipore grade H₂O which was then used to calculate plasma levels of α -ketoglutarate.

Standard blood samples were collected for EDTA, serum and Lithium-heparin and spun at 2,5 thousands of revolutions for 10 minutes to obtain data about blood count parameters, such as plasma concentrations of glucose, total cholesterol, low-density lipoproteins (LDL), high-density lipoproteins (HDL), triglycerides, sodium, potassium, chloride, urea, creatinine, bilirubin and transaminases. Subsequently samples analysis was performed on the Cobas Integra System (Roche).

Patients' height and weight were estimated the same day that blood samples were collected. Body mass index (BMI) values were evaluated using BMI formula. Glomerular filtration rates (GFR) values were calculated using Modification of Diet in Renal Disease formula.

The statistical analysis was conducted with Sigma Plot 11.0 software (Systat Software, Inc.). The distribution of the variable was estimated using Shapiro-Wilk test. Student's T-test was used to verify differences between both populations in case of data with normal distribution, while Mann-Whitney test was applied to compare data with abnormal distribution. Results were considered statistically significant if the p-value was below 0.05 (Tab. I).

Results

Patients with stable coronary heart disease, admitted to the hospital due to persistent angina despite treatment, without concomitant cardiac enzymes elevation, had significantly lower α -ketoglutarate plasma concentrations (0.91 ± 0.29 ng/ml) compared to healthy controls (1.07 ± 0.14 ng/ml), $p < 0.05$. There were no statistically significant differences in other examined parameters between groups (Fig. I).

Kwestia wpływu procesów miażdżycowych na stężenie α -ketoglutaranu w osoczu u ludzi wymaga jednak dalszego wyjaśnienia. Celem pracy było określenie wpływu niedokrwienia mięśnia sercowego na osoczowe stężenia α -ketoglutaranu u pacjentów ze stabilną objawową przewlekłą chorobą wieńcową.

Materiał i metody

Do grupy badanej włączono 53 mężczyzn w wieku 42–87 lat z rozpoznaną chorobą niedokrwinną serca potwierdzoną w badaniu koronarograficznym. Pacjenci zostali przyjęci do szpitala z powodu utrzymujących się, mimo stosowanej farmakoterapii, przewlekłych dolegliwości stenokardialnych, bez towarzyszącej zwyżki stężenia markerów martwicy mięśnia sercowego we krwi. Do grupy kontrolnej włączono 20 zdrowych mężczyzn w wieku 56–70 lat. Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę miejscowej Komisji Bioetycznej. Próbkę krwi zostały pobrane od pacjentów rano, po upływie co najmniej 8 godzin od ostatniego posiłku, w drugim dniu hospitalizacji. Próbkę krwi od osób z grupy kontrolnej również pobrano rano, na czczo. Próbkę krwi były pobierane na kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA, *ethylenediaminetetraacetic acid*) za pomocą systemów zamkniętych do pobierania krwi Sarstedt's Monovette, wirowane z prędkością 5000 obrotów/minutę przez 10 minut, a następnie zamrożone i przechowywane w temperaturze -25°C do czasu dalszej analizy. Po rozmrożeniu próbki osocza wirowano z prędkością 14 000 obrotów/minutę przez 2 godziny z użyciem filtrów molekularnych zatrzymujących cząstki o masie cząsteczkowej powyżej 10 kDa (Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI, Stany Zjednoczone), w celu usunięcia białek z próbek. Stężenie α -ketoglutaranu oznaczano przy pomocy chromatografii wysokociśnieniowej (HPLC, high-performance liquid chromatography). System do oznaczania stężenia α -ketoglutaranu składał się z pompy izokratycznej LC-10AD (Shimadzu, Kyoto, Japonia), autosamplera Basic Marathon Plus (Spark Holland, Emmen, Holandia), termostatu kolumnowego Mistral Column Oven (Spark Holland) i detektora SPD-10A VP UV (Shimadzu). Do separacji próbek użyto kolumny RSpak KC-811 (Shodex, Kawasaki, Japonia) z roztworem 25 mM kwasu nadchlorowego jako fazy ruchomej (ISO-grade, Sigma Aldrich, Sztokholm, Szwecja) z przepływem 0,6 ml/min przez 100 minut. Separację przeprowadzono w temperaturze 50°C , a stężenie α -ketoglutaranu odczytano przy długości fali wynoszącej 210 nm. Układ był kalibrowany przy użyciu standardowych serii roztworów α -ketoglutaranu w wodzie oczyszczonej systemem Millipore.

Alpha-ketoglutarate plasma level in patients with coronary heart disease (study group) and health people (control group).

Discussion

Our study revealed differences in α -ketoglutarate levels between healthy people and patients with stable, symptomatic coronary heart disease. Inflammatory processes located in arterial walls of patients with atherosclerosis significantly disrupt tissue metabolism, which leads to the increase of ROS formation. Results of experimental studies suggest that citric acid cycle disturbances are early indicators of endothelial dysfunction. Chronic decrease of endothelial NO synthase activity in mice leads not only to the increase of endothelial dysfunction markers concentrations, such as sICAM-1 (soluble intracellular adhesive molecule-1), VCAM-1 (vascular adhesive molecule-1) and MMP-9 (matrix metalloproteinase-9), but also selective inhibition of aconitase activity, such as the decrease of mitochondrial mass. These results suggest that endothelial dysfunction may lead to the inhibition of Krebs cycle enzymes activity and it may switch cellular metabolism to obtain energy from pyruvate through glycolysis, similarly to cellular metabolism under hypoxia conditions [15]. It has been also proved that α -ketoglutarate dehydrogenase, which catalyses the conversion of α -ketoglutarate into succinyl-Co-A reveals disturbed activity under significant level of oxidative stress. The synthesis of succinyl-CoA, which is catalysed by α -ketoglutarate dehydrogenase leads under physiological conditions to the production of NADH, such as supplies respiratory chain with electrons. However in case of increased ROS production α -ketoglutarate dehydrogenase decreases the synthesis of NADH and may also act as a source of ROS when NADH/NAD⁺ ratio is increased [16].

Mitochondrial dysfunction may lead to further increase of ROS and RNS (reactive nitrogen species) generation, which enhances inflammatory processes located in arterial walls, decreases the activity of endothelial NO synthase, such as deepens endothelial dysfunction and consequently enables atherosclerotic plaques formation in blood vessel walls. Inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) are proved to enhance macrophages NADPH oxidase activity, which results in the increase of ROS production and further disturbances in mitochondrial functions [17]. Experimental data suggest that NO may influence mitochondrial oxidative stress through peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator 1- γ (PGC-1 γ). It has been proved

Pobrano również standardowe próbki krwi na EDTA, surowicę i do probówek z heparyną litową, odwirowano je z szybkością 2500 obrotów/minutę przez 10 minut w celu oznaczenia parametrów morfologii krwi obwodowej, jak również osoczowych stężeń glukozy, cholesterolu całkowitego, lipoprotein o niskiej gęstości (*low-density lipoprotein*) LDL, lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL, *high-density lipoprotein*), triglicerydów, sodu, potasu, chlorków, mocznika, kreatyniny, bilirubiny i transaminaz. Oznaczeń dokonano na analizatorze Cobas Integra (Roche).

W dniu pobrania próbek krwi określono również wzrost i masę ciała pacjentów. Wartości wskaźnika masy ciała (BMI, *body mass index*) obliczano stosując odpowiedni wzór. Wartości przesączania kłębuszkowego (GFR, *glomerular filtration rate*) obliczano z zastosowaniem wzoru *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD).

Obliczeń statystycznych dokonano za pomocą programu statystycznego Sigma Plot 11.0 (Systat Software, Inc.). Rodzaj rozkładu zmiennych określono za pomocą testu Shapiro-Wilka. W przypadku zmiennych o rozkładzie normalnym do porównania badanych grup stosowano test t-Studenta, natomiast test Manna-Whitneya stosowano do porównania wartości parametrów, które nie miały rozkładu normalnego. Wyniki były brane pod

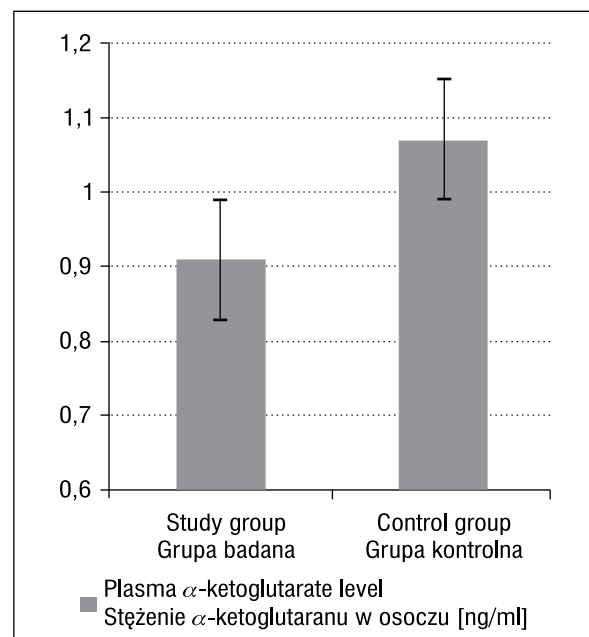


Figure 1. Plasma α -ketoglutarate level in patients with coronary heart disease (study group) and health people (control group)

Rycina 1. Stężenie α -ketoglutaranu w osoczu pacjentów z chorobą wieńcową (grupa badana) i osób zdrowych (grupa kontrolna)

Table I. Patients' characteristic in both groups**Tabela I.** Charakterystyka pacjentów obu grup

Parameter/ Parametr	Study group Grupa badana	Control group Grupa kontrolna
Age (years)/Wiek (lata)		
Range/Zakres	42–87	56–70
Mean \pm SD/Średnia \pm SD	70.9 \pm 10.5	65.5 \pm 4.7
Number of patients/Liczba pacjentów	53	20
BMI value [kg/m ²]/Wartość BMI [kg/m ²]		
Range/Zakres	23.0–49.0	23.0–36.0
Mean \pm SD/Średnia \pm SD	30.7 \pm 5.6	29.0 \pm 3.9
Red blood cell count [mln/mm ³]/Liczba erytrocytów [mln/mm ³]		
Range/Zakres	3.0–5.0	4.02–4.27
Mean \pm SD/Średnia \pm SD	4.2 \pm 0.5	4.3 \pm 0.1
Hemoglobin (Hb) concentration [g/dl]/Stężenie hemoglobiny (Hb) [g/dl]		
Range/Zakres	9.3–17.0	12.1–13.6
Mean \pm SD/Średnia \pm SD	12.7 \pm 1.6	13.3 \pm 0.6
Mean cell volume [fl]/Średnia objętość erytrocytu [fl]		
Range/Zakres	60.0–107.0	86.0–97.0
Mean \pm SD/Średnia \pm SD	93.3 \pm 6.0	92.3 \pm 3.9
White blood cell count [10^3 /mm ³]/Liczba leukocytów [10^3 /mm ³]		
Range/Zakres	3.5–10.1	5.9–10.8
Mean \pm SD/Średnia \pm SD	7.0 \pm 1.8	7.8 \pm 1.3
Platelet count [10^3 /mm ³]/Liczba płytek krwi [10^3 /mm ³]		
Range/Zakres	71.00–408.0	150.0–340.0
Mean \pm SD/Średnia \pm SD	241.6 \pm 77.9	252.6 \pm 55.7
Glucose plasma concentration [mg/dl]/Stężenie glukozy w osoczu [mg/dl]		
Range/Zakres	71.0–99.0	86.0–98.0
Mean \pm SD/Średnia \pm SD	88.0 \pm 6.23	93.9 \pm 4.0
Urea plasma concentration [mg/dl]/Stężenie mocznika w osoczu [mg/dl]		
Range/Zakres	23.0–45.0	23.0–39.0
Mean \pm SD/Średnia \pm SD	40.0 \pm 9.5	33.0 \pm 5.0
GFR value [ml/min/1.73 m ²]/Wartość GFR [ml/min/1.73 m ²]		
Range/Zakres	60.0–116.0	60.0–79.0
Mean \pm SD/Średnia \pm SD	74.3 \pm 12.7	65.0 \pm 4.3
Total cholesterol plasma concentration [mg/dl]/Stężenie cholesterol całkowitego w osoczu [mg/dl]		
Range/Zakres	86.0–303.0	143.0–253.0
Mean \pm SD/Średnia \pm SD	165.7 \pm 39.5	180.4 \pm 27.7
LDL plasma concentration [mg/dl]/Stężenie cholesterolu frakcji LDL w osoczu [mg/dl]		
Range/Zakres	42.0–220.0	86.0–134.0
Mean \pm SD/Średnia \pm SD	97.3 \pm 31.9	108.0 \pm 15.0
HDL plasma concentration [mg/dl]/Stężenie cholesterolu frakcji HDL w osoczu [mg/dl]		
Range/Zakres	24.0–77.0	32.0–50.0
Mean \pm SD/Średnia \pm SD	43.3 \pm 10.7	42.2 \pm 4.2
Triglycerides plasma concentration [mg/dl]/Stężenie triglicerydów w osoczu [mg/dl]		
Range/Zakres	50.0–308.0	110.0–170.0
Mean \pm SD/Średnia \pm SD	125.5 \pm 50.7	134.5 \pm 16.0
Sodium plasma concentration [mmol/l]/Stężenie sodu w osoczu [mmol/l]		
Range/Zakres	130.0–146.0	131.0–142.0
Mean \pm SD/Średnia \pm SD	139.4 \pm 3.0	138.2 \pm 2.6
Potassium plasma concentration [mmol/l]/Stężenie potasu w osoczu [mmol/l]		
Range/Zakres	3.7–5.4	3.8–5.0
Mean \pm SD/Średnia \pm SD	4.5 \pm 0.4	4.4 \pm 0.4
Chloride plasma concentration [mmol/l]/Stężenie chlorków w osoczu [mmol/l]		
Range/Zakres	92.0–110.0	98.0–110.0
Mean \pm SD/Średnia \pm SD	103.1 \pm 3.5	102.9 \pm 3.7

SD (standard deviation) — odchylenie standardowe; BMI (body mass index) — wskaźnik masy ciała; GFR (glomerular filtration rate) — wskaźnik przesączania kłębuszkowego; LDL (low-density lipoprotein) — lipoproteiny o niskiej gęstości; HDL (high-density lipoprotein) — lipoproteiny o wysokiej gęstości

that endothelial NO synthase knockout mice reveal decreased levels of PGC-1 γ , such as impaired gene expression of enzymes involved in antioxidant defence, such as catalase, superoxide dismutase, peroxiredoxins III and V, thioredoxin 2 and thioredoxin reductase [18]. Results of experimental studies mentioned above suggest possible links between evoked by oxidative stress citric acid cycle disturbances, endothelial dysfunction and inflammatory processes located in vascular walls. However, there are no clinical data available that could verify these hypotheses.

The other experimental model that investigates the influence of enhanced ROS generation on citric acid cycle may be ischemia and reperfusion conditions. Results of these studies also confirm the link between excessive ROS production and disrupted the Krebs cycle flux. The treatment of isolated rat heart mitochondria with hydrogen peroxide results in significant inhibition of enzymes involved in the citric acid cycle, such as α -ketoglutarate dehydrogenase, succinate dehydrogenase and aconitase [18]. Moreover, the treatment of isolated nerve terminals with hydrogen peroxide revealed that aconitase is most sensitive to inhibition by free radicals, while α -ketoglutarate dehydrogenase is inactivated partially only by higher concentrations of hydrogen peroxide. The decrease of glutamate content in nerve terminals was observed in conditions of aconitase activity inhibition, which suggests, that glutamate fuels the citric acid cycle when aconitase is inactivated, and the generation of NADH remains unaltered while α -ketoglutarate dehydrogenase inactivation at higher concentrations of hydrogen peroxide limits the amount of NADH available for the respiratory chain [19]. The inhibition of aconitase activity leads to the decrease of isocitrate content, which consequently limits the production of other intermediates, including α -ketoglutarate. The level of oxidative stress has not been established in our study. However, it is possible, that ROS generation in patients with cardiac ischemia was great enough to inhibit aconitase activity, but not sufficient to limit the activity of α -ketoglutarate dehydrogenase, thus leading to the decrease of α -ketoglutarate plasma concentrations observed in this study. Another experiment with in vivo animal model of coronary occlusion/reperfusion confirmed that aconitase and α -ketoglutarate dehydrogenase are most susceptible to inactivation caused by ROS [20]. On the contrary, proteomic analysis of canine model of ischemia-reperfusion injury followed by acute heart failure showed that the amount of isocitrate dehydrogenase subunit α , the enzyme, which con-

uwagę jako istotne statystycznie wtedy, gdy wartości p była niższa niż 0,05 (tab. I).

Wyniki

Pacjenci z rozpoznaną chorobą wieńcową, przyjęci z powodu utrzymywania się dolegliwości dławicowych pomimo stosowanego leczenia farmakologicznego, bez towarzyszącej zwyżki markerów martwicy mięśnia sercowego, charakteryzowali się niższymi wartościami stężeń α -ketoglutaranu w osoczu ($0,91 \pm 0,29$ ng/ml) w porównaniu z osobami zdrowymi z grupy kontrolnej ($1,07 \pm 0,13$ ng/ml), $p < 0,05$. Obie grupy nie różniły się istotnie wiekiem, wartościami BMI ani pozostałymi analizowanymi parametrami (ryc. 1).

Omówienie

Uzyskane wyniki dowodzą istnienia różnic w wartościach stężeń α -ketoglutaranu między osobami zdrowymi a pacjentami ze stabilną chorobą wieńcową. Procesy zapalne w ścianach tętnic u osób z miażdżycą istotnie zaburzają metabolizm tkankowy, co skutkuje wzmożoną produkcją ROS. Wyniki badań eksperymentalnych sugerują, że zaburzenia cyklu kwasu cytrynowego są wczesnym wskaźnikiem dysfunkcji śródbłonna naczyń krwionośnych. Przewlekłe zahamowanie śródbłonkowej syntezy tlenu azotu (NO) u myszy powoduje nie tylko wzrost stężenia markerów dysfunkcji śródbłonna, takich jak rozpuszczalna międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna typu I (sICAM-1, *soluble intracellular adhesive molecule-1*), naczyniowa cząsteczka adhezyjna typu I (VCAM-1, *vascular adhesive molecule-1*) i metaloproteinaza macierzy-9 (MMP-9, *matrix metalloproteinase-9*), ale również wybiórcze zahamowanie aktywności akonitazy i zmniejszenie masy mitochondriów. Te rezultaty sugerują, że dysfunkcja śródbłonna może powodować zmniejszenie aktywności enzymów cyklu kwasu cytrynowego i przestawienie metabolizmu komórki na pozyskiwanie energii z pirogronianu szlakiem glikolizy, podobnie jak ma to miejsce w warunkach hipoksji [15]. Wiadomo również, że aktywność enzymu dehydrogenazy α -ketoglutaranu, katalizującego reakcję przemiany α -ketoglutaranu w bursztynylo-CoA również ulega zakłóceniom w warunkach stresu oksydacyjnego. Prawidłowo enzym ten katalizując reakcję syntezy bursztynylo-CoA powoduje powstawanie dinukleotydu nikotynoamido-adeninowego (NADH, *nicotinamide adenine dinucleotide*) i dostarcza elektrony dla łańcucha oddechowego. W warunkach zwiększonej produkcji ROS dehydrogenaza α -ketoglutaranu zmniejsza syntezę NADH, a w warunkach zwiększonego stosunku NADH/NAD⁺ sama również jest źródłem ROS [16].

Dysfunkcja mitochondriów może powodować dalszy wzrost produkcji ROS i reaktywnych form azotu (RNS, re-

verts isocitrate into α -ketoglutarate, is significantly increased in reperfused ischemic heart tissue zone [21]. Data suggest that the Krebs cycle enzymes have different sensitivity to individual ROS. The incubation of rat heart mitochondria with hydrogen peroxide, hydroxyl radical and superoxide anion revealed that aconitase activity is limited particularly by superoxide anion, while α -ketoglutarate dehydrogenase is more sensitive to hydrogen peroxide and hydroxyl radical [22]. Furthermore, some findings suggest that the Krebs cycle enzymes susceptibility to inactivation by ROS increases with age. It has been shown that during the reperfusion period, α -ketoglutarate dehydrogenase activity is inhibited in higher degree in heart tissue isolated from older rats than senescent ones [23]. Another study revealed that ischemia leads to the stimulation of glutamate dehydrogenase and glutamate-oxaloacetate-transaminase activity in brain tissue of aged rats in compare to adolescent ones. Reactions catalyzed by these two enzymes may led to the formation of α -ketoglutarate [24], which may partially balance the decrease in α -ketoglutarate content caused by inhibited aconitase activity. There is a lack of data about these enzymes activity in aged people, however the population in this study was too small to reveal possible differences in α -ketoglutarate plasma level that depend on patients age.

Conclusions

Patients with myocardial ischemia have lower plasma concentrations of α -ketoglutarate comparing to healthy controls.

The decrease of plasma α -ketoglutarate concentrations in these patients may be a consequence of the Krebs cycle disruption due to the influence of endothelial dysfunction and inflammatory processes involved in the development of atherosclerosis, however further investigations are required.

Acknowledgement

We thank dr Janusz Dubejko for help in the study organizing.

References

1. Levene LS, Baker R, Bankart MJ, Khunti K (2010) Association of features of primary health care with coronary heart disease mortality. *JAMA*; 304: 2028–2034.
2. Zatoński W, Campos H, Willet W (2008) Rapid declines in coronary heart disease mortality in Eastern Europe are associated with increased consumption of oils rich in alpha-linolenic acid. *Eur J Epidemiol*; 23: 3–10.
3. Wijesundera HC, Machado M, Farahati F et al (2010) Association of temporal trends in risk factors and tre-

active nitrogen species), co nasila procesy zapalne zachodzące w ścianach naczyń krwionośnych, zmniejsza aktywność śród-błonkowej syntazy NO i pogłębia dysfunkcję śródbłonka, prowadząc do odkładania się blaszek miażdżycowych w ścianach naczyń krwionośnych. Udowodniono, że cytokiny prozapalne, takie jak czynnik martwicy nowotworów- α (TNF- α , *tumor necrosis factor- α*) powodują zwiększenie aktywności oksydazy NADPH w makrofagach, co prowadzi do wzrostu produkcji wolnych rodników i nasila dysfunkcję mitochondriów [17]. Wyniki badań eksperymentalnych sugerują, że NO wpływa na nasilenie stresu oksydacyjnego w mitochondriach przez koaktywator I- γ receptora aktywowanego proliferatorami peroksydomów typu γ (PGC-1 γ , *peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator 1- γ*). Wykazano, że u myszy, u których brak jest aktywności śród-błonkowej syntazy NO, występuje zredukowane stężenie PGC-1 γ i zmniejszona ekspresja genów enzymów biorących udział w mechanizmach obronnych przed stresem oksydacyjnym w mitochondriach, takich jak katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa, peroksyredoksyny III i V, tioredoksyna 2 i reduktaza tioredoksyny [18].

Powyższe badania na zwierzętach sugerują możliwy związek pomiędzy zaburzeniami cyklu kwasu cytrynowego spowodowanymi przez stres oksydacyjny, dysfunkcję śródbłonka naczyniowego i procesy zapalne toczące się w ścianach naczyń. Aktualnie brakuje jednak danych z badań klinicznych na ludziach, które zweryfikowałyby tę hipotezę.

Wpływ ROS na procesy cyklu Krebsa był również badany w eksperymentalnych modelach niedokrwienia i reperfuzji. W doświadczeniach tych również potwierdzono istnienie związku między nadmiernym wytwarzaniem ROS a zaburzeniami przebiegu reakcji cyklu Krebsa. Stwierdzono, że w mitochondriach wyizolowanych ze szczurzych serc, które poddano działaniu nadtlenu wodoru, poziom aktywności niektórych enzymów cyklu Krebsa, jak dehydrogenazy α -ketoglutaranu, dehydrogenazy bursztynianowej oraz akonitazy, jest istotnie niższy [19]. W doświadczeniu, w którym dodawano nadtlenek wodoru do wyizolowanych zakończeń nerwowych wykazano, że enzymem najbardziej wrażliwym na działanie ROS jest akonitaza, podczas gdy dehydrogenaza α -ketoglutaranu ulega częściowej inaktywacji tylko pod wpływem wysokich stężeń nadtlenu wodoru. W warunkach zahamowania aktywności akonitazy, w zakończeniach nerwowych obserwowano spadek zawartości glutamianu, co wskazuje, że gdy akonitaza ulega inaktywacji, wtedy do uzupełnienia niedoborów metabolitów cyklu kwasu cytrynowego zużywane są cząsteczki glutamianu i ilość wytworzonego NADH pozostaje niezmienną. Natomiast kiedy inaktywacji ulega dehydrogenaza α -ketoglutaranu, powoduje to znaczne ograniczenie ilości NADH dostępnego dla reakcji łańcucha oddecho-

- atment uptake with coronary heart disease mortality, 1994–2005. *JAMA*; 303: 1841–1847.
4. Victor VM, Rocha M, Solá E, Bañuls C, Garcia-Malpartida K, Hernández-Mijares A (2009) Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Curr Pharm Des*; 15: 2988–3002.
 5. Thomas SR, Witting PK, Drummond GR (2008) Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*; 10: 1713–1765.
 6. Victor VM, Rocha M (2007) Targeting antioxidants to mitochondria: a potential new therapeutic strategy for cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des*; 13: 845–863.
 7. Addabbo F, Ratliff B, Park HC et al (2009) The Krebs cycle and mitochondrial mass are early victims of endothelial dysfunction: proteomic approach. *Am J Pathol*; 174: 34–43.
 8. Brunengraber H, Roe ChR (2006) Anaplerotic substances: current and future. *J Inher Metab Dis*; 29: 327–331.
 9. Bloomer RJ, Fisher-Wellman KH (2008) Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise training status, and dietary intake. *Gend Med*; 5: 218–228.
 10. Puddu P, Puddu GM, Cravero E, De Pascalis S, Muscari A (2009) The emerging role of cardiovascular risk factor-induced mitochondrial dysfunction in atherogenesis. *J Biomed Sci*; 16: 112.
 11. Roy Chowdury SK, Sangle GV, Xie X et al (2009) Effects of extensively oxidized low-density lipoprotein on mitochondrial function and reactive oxygen species in porcine aortic endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 298: E89–E98.
 12. Madamanchi NR, Runge MS (2007) Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res*; 100: 460–473.
 13. Misra MK, Sarwat M, Bhakuni P, Tuteja R, Tuteja N (2009) Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Med Sci Monit*; 15: RA209–219.
 14. Chambers DE, Parks DA, Patterson G et al (1985) Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol*; 17: 145–152.
 15. Dezfalian C, Shiva S, Alekseyenko A et al (2009) Nitrite therapy after cardiac arrest reduces reactive oxygen species generation, improves cardiac and neurological function, and enhances survival via reversible inhibition of mitochondrial complex I. *Circulation*; 120: 897–905.
 16. Śliwa E, Dobrowolski P, Tataru MR et al (2009) Alpha ketoglutarate protects the liver of piglets exposed during prenatal life to chronic excess of dexamethasone from metabolism and structural changes. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*; 93: 192–202.
 17. Sprague AH, Khalil RA (2009) Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol*; 78: 539–552.
 18. Borniquel S, Valle I, Cadenas S, Lamas S, Monsalve M (2006) Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the transcriptional coactivator PGC- α . *FASEB J*; 20: 1889–1891.
 19. Nulton-Person AC, Szweda LI (2001) Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. *J Biol Chem*; 276: 23357–23361.
 20. Tretter L, Adam-Vizi V (2000) Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: a key role of α -ketoglu-

wego [20]. Skutkiem zahamowania aktywności akonitazy jest zmniejszenie zawartości izocytrynianu, co prowadzi następnie do redukcji wytwarzania kolejnych metabolitów, w tym α -ketoglutaranu. W niniejszym badaniu nie został określony poziom stresu oksydacyjnego. Jest jednak możliwe, że produkcja ROS u pacjentów z niedokrwieniem mięśnia sercowego była na tyle wysoka, żeby spowodować zahamowanie aktywności akonitazy, ale niewystarczająca do zahamowania aktywności dehydrogenazy α -ketoglutaranu, co spowodowało obniżenie stężenia α -ketoglutaranu w osoczu zaobserwowane w niniejszym badaniu. Wyniki eksperymentu na zwierzęcym modelu niedokrwienia/reperfuzji *in vivo* potwierdzają, że akonitaza i dehydrogenaza α -ketoglutaranu są enzymami najbardziej wrażliwymi na działanie ROS [21]. Z drugiej jednak strony analiza proteomiczna wykonana w eksperymencie na modelu niedokrwienia/reperfuzji spowodowanego ostrą niewydolnością serca u psów wykazała, że w okresie reperfuzji zawartość w tkance mięśnia sercowego podjednostki α -dehydrogenazy izocytrynianowej, enzymu przekształcającego izocytrynian w α -ketoglutaran jest znacząco wyższa [22]. Według dostępnych danych enzymy uczestniczące w cyklu Krebsa mają zróżnicowaną wrażliwość na poszczególne rodzaje ROS. W eksperymencie, w którym inkubowano mitochondria wyizolowane z serc szczurzych kolejno z nadtlenkiem wodoru, rodnikiem wodorotlenowym i anionem ponadtlenkowym wykazano, że w wyniku działania anionu ponadtlenkowego częściowo zahamowana zostaje aktywność akonitazy, podczas gdy dehydrogenaza α -ketoglutaranu jest najbardziej wrażliwa na działanie nadtlenu wodoru i rodnika wodorotlenowego [23]. Niektóre doniesienia sugerują ponadto, że wrażliwość enzymów cyklu Krebsa na działanie ROS zwiększa się wraz z wiekiem. Wykazano, że w okresie reperfuzji aktywność dehydrogenazy α -ketoglutaranu jest w większym stopniu zahamowana u starych szczurów w porównaniu z osobnikami młodszymi [24]. W kolejnym doświadczeniu udowodniono, że niedokrwienie pobudza aktywność dehydrogenazy glutaminianowej i transaminazy glutaminianowo-szczawiowo-octowej w tkance mózgowej szczurów w większym stopniu u osobników starych niż u młodych. W wyniku reakcji katalizowanych przez te dwa enzymy powstaje α -ketoglutaran, co może częściowo równoważyć spadek wytwarzania α -ketoglutaranu spowodowany inaktywacją akonitazy. Obecnie brakuje danych na temat aktywności tych enzymów u ludzi w podeszłym wieku α populacja włączona do niniejszego badania była jednak za mała, żeby można było wykazać ewentualne różnice w osoczowych stężeniach α -ketoglutaranu w zależności od wieku pacjentów.

- tarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. *J Neurosci*; 20: 8972–8979.
21. Sadek HA, Humphries KM, Szweda PA, Szweda LI (2002) Selective inactivation of redox-sensitive enzymes during cardiac reperfusion. *Arch Biochem Biophys*; 406: 222–228.
 22. Sawicki G, Jugdutt BI (2004) Detection of regional changes in protein levels in the in vivo canine model of acute heart failure following ischemia-reperfusion injury: functional proteomics studies. *Proteomics*; 4: 2195–2202.
 23. Zini R, Berdeaux A, Morin D (2007) The differential effects of superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radical on cardiac mitochondrial oxidative phosphorylation. *Free Radic Res*; 41: 1159–1166.
 24. Lucas D, Szweda LI (1999) Declines in mitochondrial respiration during cardiac reperfusion: age-dependent inactivation of α -ketoglutarate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci*; 96: 6689–6693.

Wnioski

Wartości osoczowych stężeń α -ketoglutaranu u pacjentów z niedokrwieniem mięśnia sercowego są niższe w porównaniu z osobami zdrowymi.

Spadek zawartości α -ketoglutaranu w osoczu u tych pacjentów może być rezultatem zaburzeń przebiegu reakcji cyklu Krebsa spowodowanych przez dysfunkcję śródbłonna i procesy zapalne w naczyniach zaangażowane w rozwój miażdżycy, chociaż do potwierdzenia tej tezy potrzebne są dalsze badania.

Podziękowania

Podziękowania dla dr. Janusza Dubejko za pomoc w organizacji badania.