

Joanna Górka¹, Jolanta Zuwała-Jagiello¹, Monika Pazgan-Simon², Krzysztof Simon²,
Maria Warwas¹

FLUORESCENCJA KOŃCOWYCH PRODUKTÓW GLIKACJI (AGE) SUROWICY KRWI W WYKRYWANIU MARSKOŚCI I RAKA WĄTROBY U OSÓB Z PRZECIWCIAŁAMI ANTY-HCV

¹Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej AM we Wrocławiu,
Kierownik: Maria Warwas

²Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych, Chorób Wątroby i Nabytych Niedoborów
Odpornościowych, AM we Wrocławiu,
Kierownik: Andrzej Gładysz

*W pracy oceniano przydatności pomiaru całkowitej fluorescencji
końcowych produktów glikacji (AGE) i stężenia haptoglobiny (Hp) w su-
rowicy krwi jako biomarkerów wykrywania rozwoju marskości lub raka
wątrobowokomórkowego u osób z przeciwciałami anti-HCV.*

*Słowa kluczowe: późne produkty glikacji, haptoglobina, nosiciele HCV, marskość wątroby,
rak wątrobowokomórkowy*

*Key words: advanced glycation endproducts, haptoglobin, HCV carriers, liver cirrhosis,
hepatocellular carcinoma*

WSTĘP

Zakażenie HCV przechodzi w proces przewlekły u 80% osób, zaś u 40%-90% z nich zakażenie HCV wywołuje przewlekłe zapalenie wątroby (1). W Polsce około 1,5% populacji stanowią nosiciele tego wirusa (pacjenci z namnażaniem wirusa HCV) (2). Liczba osób z przeciwciałami anti-HCV wzrastająca z wiekiem, jest większa u mężczyzn niż u kobiet. Uważa się, że nosicielstwo HCV jest czynnikiem ryzyka pierwotnego raka wątroby (raka wątrobowokomórkowego, HCC), którego powstanie jest związane z poprzedzającym rozwojem marskości wątroby (MW). Ponadto stwierdzono obecność przeciwciał anti-HCV u 50% chorych na raka wątroby (1, 3).

Końcowe produkty glikacji nazywane AGE (ang. *advanced glycation endproducts*), to heterogenna grupa połączeń tworząca się *in vivo*, nie tylko w wyniku nieenzymatycznej glikacji białek, ale także w wyniku autooksydacji cukrów lub ich intermedatów – zasad *Schiffa* i produktów *Amadori*, lub w wyniku lipooksydacji wielonienasyconych kwasów

tłuszczowych i tworzenia reaktywnych grup karbonylowych, prekursorów AGE. Niektóre postacie AGE (np. karboksymetylolizyna, CML) mogą się tworzyć również w wyniku działania oksydazy czy mieloperoksydazy na zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego – NADPH. Wzrost stężenia AGE w tkankach i krążeniu obserwujemy w przebiegu starzenia się organizmu oraz w wielu stanach patologicznych, takich jak: cukrzyca, mocznica, miażdżyca i inne (4, 5, 6). Wśród czynników środowiskowych wymienia się dietę, palenie tytoniu i nadużywanie alkoholu (5,7,8). Glikacja prowadzi m.in. do zmian konformacyjnych białek, skłonności do tworzenia krzyżowych wiązań oraz wytwarzania reaktywnych form tlenu, co nasila stres oksydacyjny oraz procesy destrukcji komórek. AGE oddziałują na komórki wielu narządów i tkanek za pośrednictwem specyficznych receptorów nazywanych RAGE (ang. *receptor for advanced glycation endproducts*) (5, 6, 9). Interakcja AGE – RAGE uruchamia całą kaskadę sygnalizacyjną, w której dochodzi do aktywacji jądrowego czynnika NF- κ B (ang. *nuclear factor κ B*) oraz do stymulacji transkrypcji genów cytokin, czynników wzrostu i cząsteczek adhezyjnych, indukcji migracji makrofagów, a także do proliferacji m.in. komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych (6). Białka modyfikowane AGE są rozpoznawane przez receptory endocytarne, a następnie degradowane na drodze wewnątrzkomórkowej proteolizy (w proteosomach) i wydzielane jako niskocząsteczkowe AGE (AGE-peptydy) czyli AGE – drugiej generacji (10). W usuwaniu AGE z organizmu biorą udział komórki nerek i/lub wątroby. Jednak część z nich nie jest wydalana, lecz gromadzi się w różnych tkankach i narządach, prowadząc do ich dysfunkcji (11,12,13).

W piśmiennictwie można znaleźć kontrowersyjne informacje o wzroście stężenia różnych postaci AGE (całkowitych AGE; oznaczanych metodą całkowitej fluorescencji; CML, imidazolonu; oznaczanych metodami immunoenzymatycznymi) oznaczanych w surowicy krwi pacjentów z przewlekłym stanem zapalnym wątroby (14,15,16,17), brakuje zaś danych odnoszących się do nowotworów wątroby.

Celem pracy było sprawdzenie, czy oznaczanie całkowitej fluorescencji AGE w surowicy krwi mogłoby być stosowane jako pomocniczy parametr biochemiczny w określeniu progresji w marskość, a następnie pierwotnego raka wątroby u osób z przeciwciałami anti-HCV. Ponadto, dla porównania z całkowitą fluorescencją AGE, w surowicy krwi tych samych pacjentów oznaczono stężenie białka ostrej fazy – haptoglobiny, o którym wiadomo, że jest markerem włóknienia.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto 43 pacjentów (20 kobiet i 23 mężczyzn), z zakażeniem wirusem HCV, leczonych w Katedrze i Klinice Chorób Zakaźnych, Chorób Wątroby i Nabytych Niedoborów Odpornościowych AM we Wrocławiu. Surowice kontrolne pochodzące od 20 osób zdrowych (16 kobiet i 4 mężczyzn) uzyskano podczas badań profilaktycznych w Dolnośląskim Centrum Diagnostyki Medycznej we Wrocławiu. U wszystkich pacjentów i osób z grupy kontrolnej wykluczono cukrzycę, niewydolność nerek (na podstawie pomiaru stężenia glukozy i kreatyniny w surowicy krwi) oraz nadużywanie alkoholu. Charakterystykę grup badanych i grupy kontrolnej przedstawiono w tabeli I.

Tabela I. Charakterystyka kliniczna i biochemiczna (mediana i zakres) grupy kontrolnej i grup badanych

Table I. Clinical and biochemical characteristic (median and range) of control subjects and all examined groups of patients

PARAMETR	GRUPA KONTROLNA	OSOBY Z PRZECIWCIAŁAMI anty-HCV	MARSKOŚĆ	RAK WĄTROBOWO-KOMÓRKOWY
LICZBA PACJENTÓW	20	20	14	9
PŁEĆ	16K/4M	14K/6M	5K/9M	1K/8M
WIEK [LATA]	50,50	43,00	53,50 ^{b**}	60,00 ^{a*b**}
	22,00 – 68, 00	23,00 – 71,00	46,00 – 75,00	49,00 – 77,00
ALT [IU/L]	38,50	52,00 ^{a*}	62,50 ^{a***}	107,00 ^{a***}
	26 - 73	19 - 272	33 - 912	29,00 – 275,00
AFP [ng/ml]	3,49	4,11 ^{a*}	5,89 ^{a*}	300 ^{a, b***, c**}
	0,80 – 10,20	1,84 – 31,45	1,10 – 185,00	2,25 - 35500
β-GLUKURO-NIDAZA [IU/L]	0,64	0,89 ^{a**}	1,13 ^{a**}	1,27 ^{a**}
	0,30 – 1,12	0,47 – 2,71	0,33 – 2,64	0,33 – 2,73
ALP [IU/L]	58,50	52,50	90,00 ^{a**, b***}	136,00 ^{a, b***}
	35,00 – 100,00	39,00 – 92,00	47,00 – 314,00	63,00 – 194,00

(a) porównanie z grupą kontrolną

(b) porównanie z osobami posiadającymi przeciwciała anty-HCV

(c) porównanie z marskością

Istotność różnic między grupami: (*) p<0,05, (**) p<0,01, (***) p<0,001.

Zakażenie HCV potwierdzono oznaczając w surowicy krwi przeciwciała anty-HCV testem immunoenzymatycznym metodą EIA oraz HCV-RNA, metodą RT-PCR – Cobas Amplicor, Roche. Rozpoznanie przewlekłego procesu zapalnego, marskości wątroby i raka wątrobowokomórkowego postawiono na podstawie ogólnie przyjętych kryteriów klinicznych, serologicznych, histologicznych i biochemicznych m.in. stężenia α-fetoproteiny (AFP) – oznaczonej metodą immunoenzymatyczną ELISA przy użyciu testu Immuno-Diagnostic, aktywności fosfatazy zasadowej (ALP) – oznaczonej testem Immunolight oraz β – glukuronidazy, oznaczonej z użyciem p-nitrofenylo-β-D-glukuronidu jako substratu (18). Na przeprowadzenie zaplanowanych badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej AM, a wszystkie osoby zostały poinformowane o charakterze i celu wykonanych analiz. Krew do badań biochemicznych pobierano na czczo z żyły odłokciowej. Surowice krwi przechowywano w temperaturze – 80°C aż do chwili oznaczenia.

W surowicach krwi oznaczono całkowitą fluorescencję AGE metodą spektrofluorescencyjną, wykorzystującą fakt, że intensywność fluorescencji (370 nm/440 nm) rozcieńczonej surowicy jest proporcjonalna do stężenia późnych produktów glikacji w materiale

biologicznym. Wyniki podano w umownych (arbitralnych) jednostkach fluorescencji (AU) uwzględniając fluorescencję tła (19). Haptoglobinę oznaczono mikrometodą gwajakolową (20) podając wyniki w g/L.

Analizę statystyczną przeprowadzono posługując się programem *Statistica PL wersja 6.0* wykorzystując test nieparametryczny U–Manna–Whitneya. Za statystycznie istotne uznano różnice, dla których prawdopodobieństwo istotności „p” było równe lub niższe od 0,05. Ponadto dla oceny zależności między poszczególnymi parametrami obliczono wartość współczynnika korelacji „r”.

WYNIKI

Dane dotyczące charakterystyki klinicznej i biochemicznej grupy kontrolnej i grup badanych przedstawiono w tabeli I.

Wiek osób z przeciwciałami anti–HCV nie różnił się istotnie od wieku grupy kontrolnej. Pacjenci z marskością wątroby i z pierwotnym rakiem wątroby byli starsi niż osoby z przeciwciałami anti–HCV ($p < 0,01$).

Aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT) była istotnie wyższa we wszystkich grupach chorych w porównaniu do grupy kontrolnej. U osób z przeciwciałami anti–HCV był to wzrost 1,3-krotny ($p < 0,05$), u chorych na marskość wątroby 1,6-krotny ($p < 0,001$), zaś u chorych na raka 2,8 – krotny ($p < 0,001$).

Stężenie α -fetoproteiny było istotnie wyższe we wszystkich grupach chorych w odniesieniu do grupy kontrolnej. Istotność statystyczna różnicy była najwyższa dla chorych na raka wątroby ($p < 0,001$), a jednakowa dla osób z przeciwciałami anti–HCV i chorych na MW ($p < 0,05$). U pacjentów z HCC wzrost AFP był 72-krotny w odniesieniu do osób z przeciwciałami anti–HCV ($p < 0,001$) i 51 – krotny w stosunku do chorych na marskość ($p < 0,01$).

U wszystkich pacjentów (osoby z przeciwciałami anti–HCV, MW, HCC) stwierdzono istotny statystycznie wzrost aktywności β – glukuronidazy w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0,01$).

Aktywność fosfatazy zasadowej była istotnie podwyższona w grupie chorych na MW ($p < 0,01$) i grupie pacjentów z rakiem wątroby ($p < 0,001$) w stosunku do grupy kontrolnej. W marskości i w raku wątroby obserwowano około 2-krotny wzrost aktywności ALP w stosunku do grupy osób z przeciwciałami anti–HCV ($p < 0,001$).

Dane dotyczące całkowitej fluorescencji AGE i stężenia Hp w analizowanych grupach pacjentów oraz grupie kontrolnej przedstawiono w tabeli II.

Całkowita fluorescencja, jako miara stężenia AGE, była wyższa we wszystkich badanych grupach pacjentów w stosunku do grupy kontrolnej, ale wzrost nie miał charakteru statystycznie istotnego. W grupie chorych z rakiem wątroby stężenie AGE było niższe w porównaniu do stężenia w grupie z marskością i grupie osób z przeciwciałami anti–HCV, ale nie zanotowano istotnych różnic między grupami.

Stężenie Hp obniżało się w surowicy krwi chorych wraz z rozwojem uszkodzenia wątroby. W raku wątroby był to spadek 3,3-krotny w stosunku do osób z przeciwciałami anti–HCV. W grupie osób z przeciwciałami anti–HCV stężenie haptoglobiny mieściło się w granicach normy, zaś w grupie chorych na MW było istotnie niższe nie tylko w stosunku

do kontroli, ale również w stosunku do osób z przeciwciałami anti-HCV ($p < 0,001$). Istotność statystyczna różnicy przy porównaniu grupy chorych z rakiem wątroby i marskością wynosiła $p < 0,01$.

Analiza zależności między parametrami wykazała jedynie znamienne wysoką korelację ($r = 0,77$) między aktywnością β -glukuronidazy i aktywnością ALP u chorych na raka wątroby.

Tabela II. Całkowita fluorescencja AGE i stężenie haptoglobiny (mediana i zakres) w surowicy krwi grupy kontrolnej i grup badanych

Table II. Total fluorescence of AGE and concentration of haptoglobin (median and range) in serum of control subjects and all examined groups of patients

Lp.	GRUPY	AGE [10 ⁵ AU]	HAPTOGLOBINA [g/L]
1.	GRUPA KONTROLA	0,90	0,93
		0,64 – 1,29	0,57 – 1,52
2.	OSOBY Z PRZECIWCIAŁAMI ANTY-HCV	1,07	0,83
		0,49 – 1,85	0,13 – 1,57
3.	MARSKOŚĆ	1,14	0,23
		0,66 – 2,40	0,12 – 0,47
4.	RAK WĄTROBOWO-KOMÓRKOWY	0,98	0,34
		0,72 – 1,38	0,12 – 0,58
ISTOTNOŚĆ RÓŻNIC MIĘDZY GRUPAMI		n.i.s*	2:4 (**)
			1:3, 1:4, 2:3 (***)

* n. i. s – nieistotne statystycznie

** istotność różnic między grupami $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

DYSKUSJA

Postęp w poznaniu molekularnych mechanizmów włóknienia i marskości wątroby budzi nadzieję na opracowania nowych antyfibrotycznych strategii terapeutycznych, co z kolei jest impulsem do poszukiwania nieinwazyjnych markerów włóknienia. Markery te byłyby pomocne nie tylko w określeniu stopnia zwłóknienia, ale także w monitorowaniu terapii i ograniczyłyby częstość wykonywania biopsji wątroby (21).

Przez długi czas późne produkty glikacji uważane były wyłącznie za wykładnik glikacji białek u chorych na cukrzycę. W czasie trwania przewlekłego uszkodzenia wątroby następuje upośledzenie metabolizmu cukrów w tym narządzie. Zaobserwowano, że zakażenie wirusem typu HCV u ludzi może przyczyniać się do rozwoju upośledzenia wrażliwości komórek organizmu na insulinę, stanu prowadzącego w końcu do powstania cukrzycy typu II (22). Wyrazem tego jest wzrost stężenia cukrów i ich metabolitów we krwi, co powoduje przesunięcie stanu równowagi w kierunku tworzenia AGE. Analizując wyniki badań osób z przeciwciałami anti-HCV ze współistniejącą cukrzycą zaobserwowano zwiększone ryzyko wystąpienia marskości wątroby (23). Celem niniejszej pracy było sprawdzenie, czy całkowita fluorescencja AGE surowicy zmienia się wraz z progresją wirusowego zapalenia wątroby typu C w pierwotnego raka wątroby z poprzedzającym rozwojem marskości wątroby.

Badane grupy chorych różniły się pod względem wieku, jednakże z danych piśmiennictwa wiadomo, że fluorescencja AGE zmienia się wraz z wiekiem jedynie u dzieci i młodzieży do 30 roku życia (14). Całkowita fluorescencja surowicy odzwierciedla stężenie produktów oksydacji i glikooksydacji połączonych z białkami, głównie albuminą (19). Oznaczanie stężenia AGE w surowicy krwi czy tkankach jest trudne ze względu na ich strukturalną heterogenność i niskie stężenia. W metodach oznaczania opartych na pomiarze fluorescencji, HPLC i technice ELISA wykorzystuje się charakterystyczne ugrupowania chemiczne występujące w tych połączeniach lub wyodrębnione składowe. Tylko nieliczne postacie AGE zostały zidentyfikowane *in vivo*, m.in. pentozydyna, CML czy imidazolon.

W naszych badaniach zaobserwowaliśmy nieistotny statystycznie wzrost całkowitej fluorescencji AGE, nie korelujący z obniżonym stężeniem Hp w surowicy krwi osób z przeciwciałami anti-HCV oraz pacjentów z marskością i rakiem wątrobowokomórkowym w stosunku do grupy kontrolnej. Wzrost był najniższy u chorych na raka. Charakter zaobserwowanych zmian jest zgodny z naszymi wcześniejszymi obserwacjami (15, 24). Brak istotności statystycznej zaobserwowanych zmian może wynikać ze stosunkowo małej liczebności badanych grup lub różnic w stopniu zaawansowania marskości czy raka. Wzrost fluorescencji AGE, korelujący ze stężeniem CML, został po raz pierwszy zaobserwowany u pacjentów z zaawansowaną marskością i ulegał normalizacji po przeszczepie wątroby (14).

Porównując zaangażowanie wątroby i nerek w proces akumulacji w nich AGE stwierdzono, że nieznaczne zaburzenia funkcji wątroby lub nerek nie mają wpływu na stężenie CML i imidazolonu w surowicy krwi. Dopiero u pacjentów z zaawansowaną marskością lub 3 stopniem uszkodzenia nerek występują zmiany w stężeniu AGE w surowicy (17). Parametrem pozwalającym na określenie zaawansowania marskości wątroby jest oznaczanie niefluoryzującej CML w surowicy krwi testem ELISA, szczególnie w zestawieniu z oznaczaniem hialuronianu (16).

Uzyskane wyniki wskazują, że oznaczanie całkowitej fluorescencji AGE w surowicy krwi nie jest parametrem różnicującym dla marskości i raka wątrobowokomórkowego wśród osób z przeciwciałami anti-HCV. Potwierdzono natomiast użyteczność oznaczania haptoglobiny, parametru wchodzącego w skład fibrotestu (25), w wykrywaniu marskości wątroby. Piśmiennictwo dotyczące użyteczności oznaczania Hp w wykrywaniu raka wątrobowo komórkowego u ludzi nie jest zbyt obszerne i w dodatku kontrowersyjne. *Ang* i wsp. (26) piszą o użyteczności stężenia Hp oznaczanego metodą ELISA jako biomarkera HCC, szczególnie łącznie z oznaczaniem stężenia AFP. Wcześniejsza praca, w której haptoglobinę oznaczano metodą immunodyfuzji radialnej, mówi jednak o braku istotnych statystycznie różnic między nosicielami HBV i chorymi na HCC (27). Przydatność oznaczania Hp u pacjentów z HCC wymaga weryfikacji w badaniach znacznie bardziej reprezentatywnych, pod względem liczebności grup badanych.

J Górka¹, J Zuwała-Jagiello¹, M Pazgan-Simon², K Simon², M Warwas¹

FLUORESCENCE OF AGE IN SERUM IN DETECTING LIVER CIRRHOSIS AND HEPATOCELLULAR CARCINOMA AMONG PATIENTS WITH ANTI-HCV ANTIBODIES

SUMMARY

Objective: To evaluate usefulness of total fluorescence of advanced glycation end products (AGE) and haptoglobin (Hp) measurement in human serum as parameters in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma development among patients with anti-HCV antibodies.

Materials and methods: 43 patients (20 women and 23 men) with chronic hepatitis HCV were examined (14 individuals with liver cirrhosis and 9 with primary liver cancer). The control group numbers 20. As reflection of AGE concentration, total fluorescence in serum samples was measured with spectrofluorimetric method and haptoglobin with microplate guaiacol test.

Results: We affirmed that total fluorescence in examined groups was higher than in healthy subjects, but increase was not statistically significant. Fluorescence of AGE in serum from patients with hepatocellular carcinoma was lower in comparison to patients with cirrhosis and anti-HCV carriers. Haptoglobin was significantly decreased in serum of cirrhosis patients as compared to HCV carriers of patients with hepatocellular carcinoma ($p < 0,001$).

Conclusions: The measurement of total fluorescence AGE is not differentiating for liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma among anti-HCV carriers. We confirmed that haptoglobin, parameter included in fibrotest, is very useful, in detecting liver cirrhosis.

PIŚMIENNICTWO

1. El-Serag HB, Lenhard Rudolph K. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132: 2557-2576.
2. Simon K, Szymczak A. Wirusologia molekularna, a leczenie przewlekłych zapaleń wątroby typu C. *Przegl Epidemiol* 2005; 59: 503-510.
3. Rodriguez-Diaz JL, Rosas-Comargo V, Vega-Vega O, i in. Clinical and pathological factors associated with the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis virus-related cirrhosis: A long-term follow-up study. *Clin Oncol* 2007; 19: 197-203.
4. Staniszewska M, Gamian A. Właściwości biochemiczne i znaczenie kliniczne produktów glikacji białek. *Postępy Hig Med Dośw* 2003; 57: 123-147.
5. Kalousová M, Zima T, Tesář V. Advanced glycooxidation end products in chronic diseases-clinical chemistry and genetic background. *Mutat Res* 2005; 579: 37-46.
6. Nass N, Bartling B, Navarrete Santons A, i in. Advanced glycation end products, diabetes and ageing. *Z Gerontol Geriatr* 2007; 40: 349-356.
7. Kalousová M, Zima T, Popov P, i in. Advanced glycation end-products in patients with chronic alcohol misuse. *Alkohol Alkohol* 2004; 39: 316-320.
8. Sebeková K, Somoza V. Dietary advanced glycation endproducts (AGEs) and their health effects – PRO. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51: 1079-1084.
9. DeGroot J. The AGE of the matrix: chemistry, consequence and cure. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 301-305.
10. Thornalley PJ. Cell activation by glycated protein. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cell Mol Biol* 1998; 44: 1013-1023.
11. Ahmed N, Thornalley PJ, Lüthen R, i in. Processing of protein glycation, oxidation and nitrosation adducts in the liver and the effect of cirrhosis. *J Hepatol* 2004; 41: 913-919.

12. Sebeková K, Hofmann T, Boor P, i in. Renal effects of oral maillard reaction product load in the form of bread crusts in healthy and subtotaly nephrectomized rats. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1043: 482-491.
13. Thornalley PJ. Advanced glycation end products in renal failure. *J Ren Nutr* 2006; 16: 178 - 184.
14. Sebeková K, Kupčová V, Schinzel R, i in. Markedly elevated levels of plasma advanced glycation endproducts in patients with liver cirrhosis-amelioration by liver transplantation. *J Hepatol* 2002; 36: 66-71.
15. Zuwała-Jagiełło J, Simon K, Pazgan –Simon M, i in. Advanced glycation endproducts in serum of patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Adv Clin Exp Med* 2006; 15: 259-264.
16. Yagmur E, Tacke F, Weiss C, i in. Elevation of Nε – (carboxymethyl) lysine-modified advanced glycation end products in chronic liver disease is an indicator of liver cirrhosis. *Clin Biochem* 2006; 39: 39-46.
17. Butscheid M, Schäfer Ch, Brenner S, i in. Unchanged serum levels of advanced glycation endproducts in patients with liver disease. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2007; 375:401-406.
18. Bergmayer, HU. Methods of enzymatic analysis. Weinheim; New York, Verlag Chemie, Acad. Press, 1963 vol. 24.
19. Münch G, Keis R, Wessels A, i in. Determination of advanced glycation end products in serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35: 669-677.
20. Jones GE, Mould DL. Adaptation of the guaiacol (peroxidase) test for haptoglobins to a microtitration plate system. *Res Vet Sci* 1984; 37: 87-92.
21. Plebani M, Basso D. Non-invasive assessment of chronic liver and gastric diseases. *Clin Chim Acta* 2007; 381; 39-49.
22. Mason A, Lau J, Hoang N, i in. Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1999; 29: 328-333.
23. Knobler H, Schihmanter R, Zifroni A, i in. Increased risk of type 2 diabetes in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C virus infection. *Mayo Clin Proc* 2000; 75: 355-359.
24. Zuwała-Jagiełło J, Pazgan-Simon M, Górka J, i in. Serum advanced glycation end products and the development of hepatocellular carcinoma among HBV carriers. *Pol J Environ Stud* 2007; vol. 16 5C, part II: 747-751.
25. Sène D, Limal N, Messous D, i in. Biological markers of liver fibrosis and activity as non-invasive alternatives to liver biopsy in patients with chronic hepatitis C and associated mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Clin Biochem* 2006; 39: 715-721.
26. Ang I, Poon T, Lai P, i in. Study of serum haptoglobin and ist glycoforms in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a glycoproteomic approach. *J Proteome Res* 2006; 5: 2691-2700.
27. Otegbayo J, Arinola O, Aje A, i in. Usefulness of acute phase proteins for monitoring development of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus carriers. *West Afr J Med* 2005; 24: 124-127.

Otrzymano: 20.12.2007 r.

Adres autora:

mgr Joanna Górka

Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej, AM we Wrocławiu

ul. Szewska 38/39, 50-139 Wrocław

jpgorka@op.pl, 071-784-03-02, fax. 071-784-03-04