

## IZOPROSTANY - NOWE BIOMARKERY LIPIDOWEJ PEROKSYDACJI IN VIVO

Andrzej Tokarz, Małgorzata Jelińska, Agnieszka Ozga

Katedra i Zakład Bromatologii, Wydział Farmaceutyczny Akademii Medycznej w Warszawie  
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

tel./fax: +22 5720785; e-mail: [andrzej.tokarz@wum.edu.pl](mailto:andrzej.tokarz@wum.edu.pl)

Otrzymano 10.02.2004; zaakceptowany 16.03.2004; zamieszczony 19.04.2004

### STRESZCZENIE

Odkrycie izoprostanów jako produktów nieenzymatycznej peroksydacji lipidów stworzyło nową płaszczyznę badań związanych z rolą wolnych rodników w fizjologii i patofizjologii. Zastosowanie analizy ilościowej tych związków z wykorzystaniem metod fizycznych i immunologicznych stanowi istotny postęp w badaniach dotyczących wpływu wolnych rodników na patogenezę ludzkich chorób. Ze względu na powszechne występowanie izoprostanów w płynach biologicznych, takich jak mocz, krew, płyn mózgowo-rdzeniowy, a także w wydychanym powietrzu, trwają prace nad możliwościami wykorzystywania danych analitycznych, określających ich poziom, w diagnostyce chorób przewlekłych, w których to etiologię włączony jest stres oksydacyjny. Oznaczanie ilościowe izoprostanów stwarza również możliwości prowadzenia prac zmierzających do optymalizacji składu diety pod względem zawartości substancji przeciwutleniających i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, oraz suplementacji odpowiednimi składnikami.

**SŁOWA KLUCZOWE:** izoprostany, wskaźniki, stres oksydacyjny

### ABSTRACT

#### ISOPROSTANES - NEW BIOMARKERS IN LIPID PEROXIDATION *IN VIVO*

The discovery of isoprostanes, which are products of non-enzymatic lipid peroxidation, resulted in the research on the new role of free radicals in physiology and pathophysiology. Isoprostan quantitative analysis, by use of physical and immunological methods, is a great achievement in the evaluation of free radical impact on many diseases in human. Isoprostan occur commonly in biological liquids such as urine, blood, cerebro-spinal fluid and in the air breathed out. For that reason attempts are made to apply isoprostan in the diagnosis of chronic diseases, which may be caused by oxidative stress. Quantification of isoprostan also gives the possibilities to optimize the diet by supporting proper amounts of antioxidants and polyunsaturated fatty acids and by supplementation with beneficial components.

**KEYWORDS:** isoprostanes, biomarkers, oxidative stress

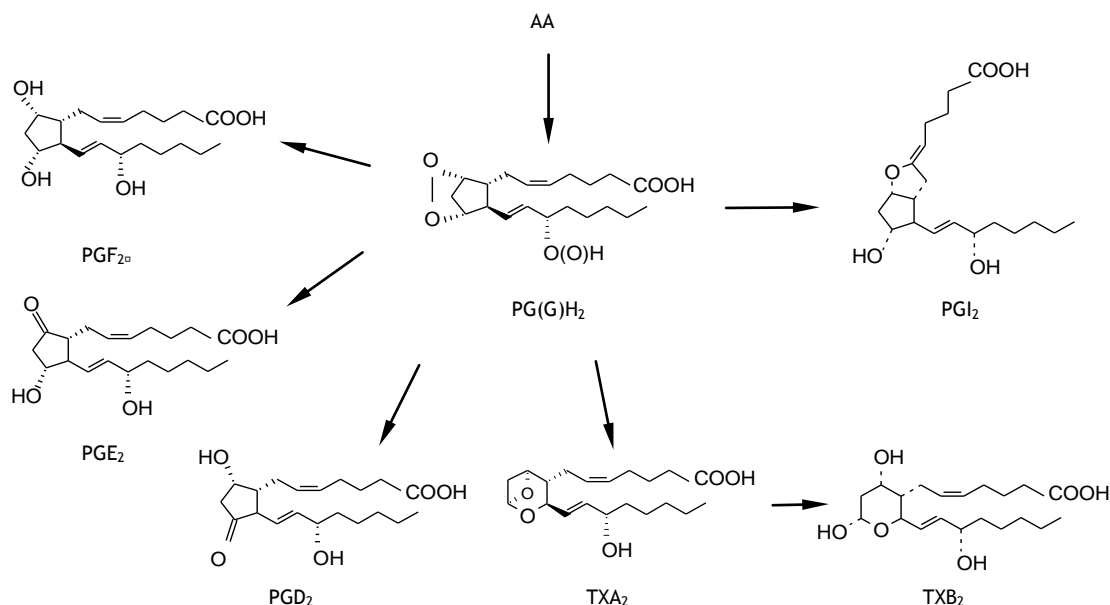
### Wstęp

Izoprostany są nową klasą naturalnych związków powstających *in vivo* w wyniku wolnorodnikowej peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [1]. Peroksydacja lipidów jest najlepiej poznany proces indukowany przez wolne rodniki. Powstające w ten sposób media-tory, szczególnie pochodne kwasu arachidonowego, pełnią ważną fizjologicznie i farmakologicznie funkcję. Mogą być również wykorzystywane jako selektywne wskaźniki ostrych stanów zapalnych i chorób degeneracyjnych będących następstwem stresu oksydacyjnego [2]. Arachidonian i niektóre inne kwasy tłuszczowe  $C_{20}$  z wiązaniami podwójnymi poprzedzielanymi grupami metylenowymi, są źródłem powstawania eikozonoidów - biologicznie czynnych związków znanych jako prostaglandyny (PG), tromboksany (TX) i leukotrieny (LT) (Ryc.1) [3].

Kwas arachidonowy (AA) zawarty w fosfolipidach błon plazmatycznych jest uwalniany przez fosfolipazę  $A_2$  i następnie metabolizowany w trzech szlakach enzymatycznych:

- 1 - szlak cyklooksygenazy-1 (COX-1) lub cyklooksygenazy-2 (COX-2) wytwarzający labilne endonadtlenki, z których formowane są prostaglandyny, tromboksany i prostacykliny (PGI);
- 2 - szlak lipoksygenazy wytwarzający leukotrieny;
- 3 - także cytochrom P-450 może służyć jako katalizator dla biotransformacji AA do różnych utlenionych metabolitów, włączając epoksydy i serię hydroksykwasów tłuszczowych [1].

Nowa biochemiczna droga przemiany AA została odkryta zarówno u ludzi, jak i u zwierząt. Wolontariuszom podawano wysokie dawki niesteroidowych leków przeciwzapalnych takich jak: ibuprofen, indometacynę i naproksen, w celu całkowitego zahamowania cyklooksygenazy i wytwarzania PG. U tych osób we krwi i moczu pojawiły się duże ilości prostanoidów [1]. Te naturalne produkty, formowane *in vivo* przez nieenzymatyczny, wolnorodnikowy mechanizm peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, nazwano izoprostanami (izoP) [2].



Ryc. 1. Schemat enzymatycznego formowania prostanoidów [3].

W przeciwieństwie do enzymatycznego formowania prostaglandyn i leukotrienów, które wymaga wolnego kwasu arachidonowego,  $F_2$ -izoP są formowane *in situ* w fosfolipidach i uwalniane przez fosfolipazę  $A_2$ . Uwolnione izoprostaniny krążą we krwi i są wydalone z moczem.

Od czasu odkrycia izoprostanów zgromadzono wiele dowodów potwierdzających, że są one niezawodnym markerem oksydacyjnych uszkodzeń *in vivo* i *in vitro*, stosunkowo łatwym w ilościowym oznaczaniu w płynach biologicznych. Podwyższoną zawartość izoP w moczu i krwi opisano w kilku zespołach chorobowych związanych z nadmiernym wytwarzaniem wolnych rodników. Są to między innymi: palenie papierosów, marskość wątroby wywołana alkoholem, nowotwory a także miażdżyca [4].

Rozwój metod analitycznych: GC/MS, GC/tandem MS, immuno/GC/MS pozwolił na szczegółową analizę czynników wpływających na formowanie izoprostanów. Wykonano wiele testów w celu optymalizacji diety i dawek antyoksydantów: witamin E i C, obniżających syntezę izoP. Stabilność w płynach ustrojowych, specyficzność w stosunku do peroksydacji lipidów, synteza *in vivo* i względna obfitość w płynach ustrojowych sprawia, że izoprostaniny należą do najbardziej wiarygodnych biomarkerów peroksydacji lipidów i stresu oksydacyjnego [5].

#### Mechanizm powstawania izoprostanów

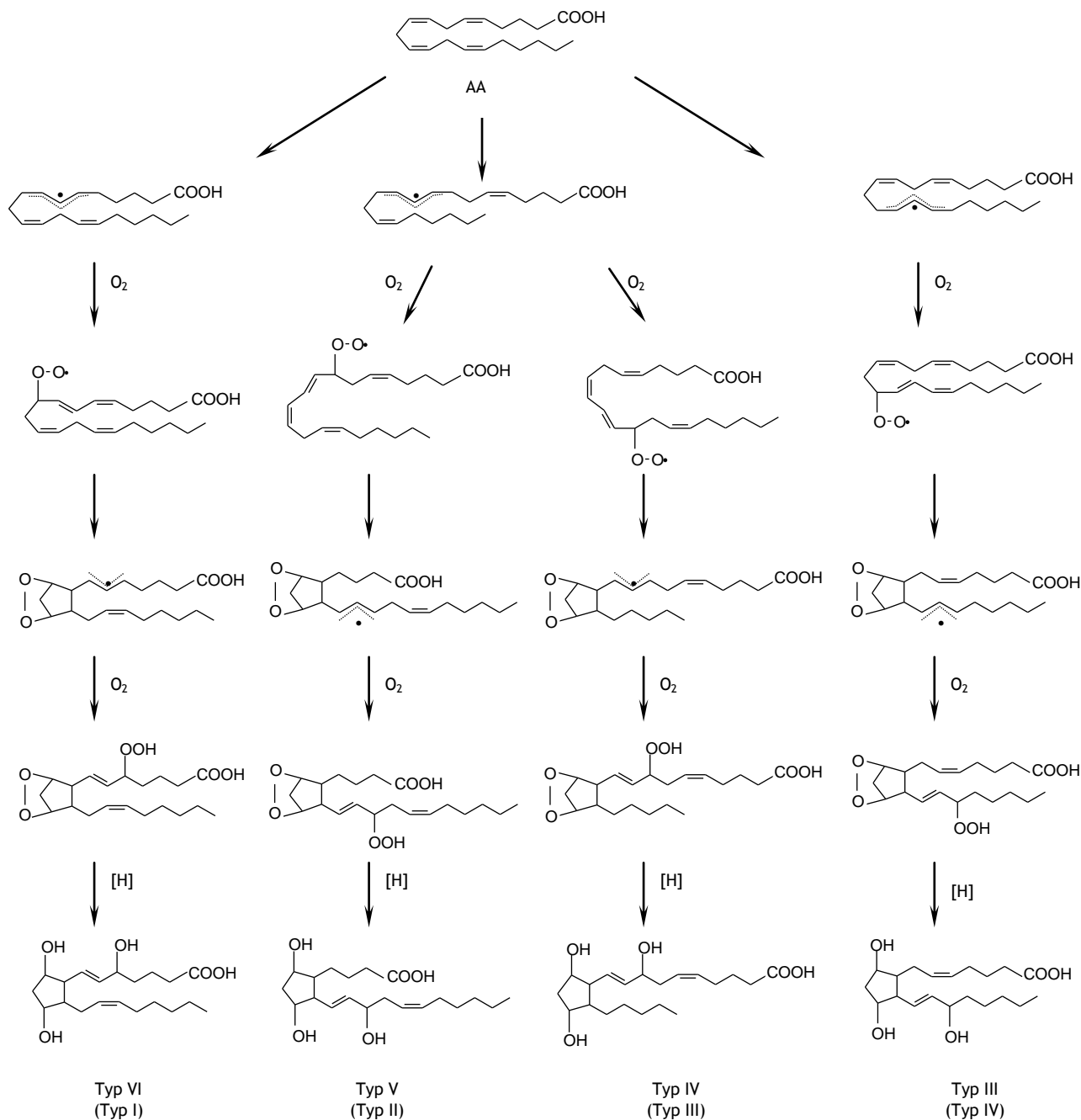
Formowanie struktur podobnych do prostaglandyn, jako produktów peroksydacji AA *in vitro*, było pierwszy raz opisane przez Mehelicha i współpracowników w 1990 roku. Związki te, określone jako  $F_2$ -izoP, posiadały pierścień 1,3-dihydroksycyklopentanowy z grupami hydroksylowymi głównie w konformacji *cis* i były formowane z AA zgodnie z mechanizmem wolnorodnikowym. Związki analogiczne do  $F_2$ -izoP mogą być formowane z innych kwasów tłuszczowych [6].

Mechanizm formowania izoprostanów został przedstawiony na Ryc. 2. Reaktywne formy tlenu (RFT) takie jak:  $HO^\cdot$ ,  $RO^\cdot$ ,  $ROO^\cdot$ ,  $O_2^\cdot$ ,  $NO^\cdot$  i inne mogą oderwać atom wodoru

z wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, np. z AA, i propagować reakcję łańcuchową. Inicjowane wolnorodnikowe oderwanie atomu wodoru, jakie występuje na atomach węgla 13, 10 i 7 w cząsteczkach AA, może powodować powstanie trzech form rodnikowych, które następnie poddane procesowi wewnętrznej cyklizacji, poprzez redukcję wodorem form prostaglandynowych, prowadzą do utworzenia czterech regioizomerów posiadających pierścień typu F. Przy czym, każdy z tych regioizomerów teoretycznie może wytworzyć osiem racemicznych diastereomerów. Tak więc w powyższym procesie mogą być wygenerowane 64 różne związki, jakkolwiek w różniących się ilościach [2].

Każdy z czterech regioizomerów (typu III-VI) teoretycznie może być odniesiony do ośmiu racemicznych diastereoizomerów. Ponadto na uwagę zasługuje możliwość tworzenia się izoprostanów drogą dwóch szlaków peroksydacyjnych [1,6] poprzez endonadtlenkowy mechanizm przedstawiony na Ryc. 2 oraz dioksetanowy, pokazany na Ryc.3. W nomenklaturze izoprostanów oparto się na czterech typach izoprostanów jako głównych przedstawicielach pochodnych związków wywodzących się z kwasu arachidonowego. Na ile to było możliwe, zachowano też elementy znanej nomenklatury prostaglandyn. I tak dla określenia izoprostanów wykorzystany został skrót "izoP", aby uniknąć pomyłek ze skrótem IP, oznaczającym fosforan inozytolu. Główne klasy izoprostanów zostały oznaczone literami D, E, F, G i H w celu podkreślenia typu cyklopentanowego pierścienia, podobnie do oznaczeń wykorzystanych w nazewnictwie prostaglandyn, np. PGE - pochodne izoprostanów oznaczono jako iPE, a pochodne PGF jako iPF.

Ilość podwójnych wiązań w łańcuchach bocznych wyrażona jest odpowiednią cyfrą 1, 2, 3 lub 4, co stanowi także analogię do nomenklatury prostaglandyn. Symbole  $\alpha$  lub  $\beta$  są wykorzystane dla wykazania stereochemii dwóch grup OH w pierścieniu cyklopentanu. Przedrostek  $\alpha$  oznacza obecność dwóch grup OH rzutowanych pod płaszczyzną cząsteczki, przedrostek  $\beta$  oznacza położenie grupy OH ponad płaszczyzną pierścienia cyklopentanu.



Ryc. 2. Schemat mechanizmu formowania izoprostanów [2].

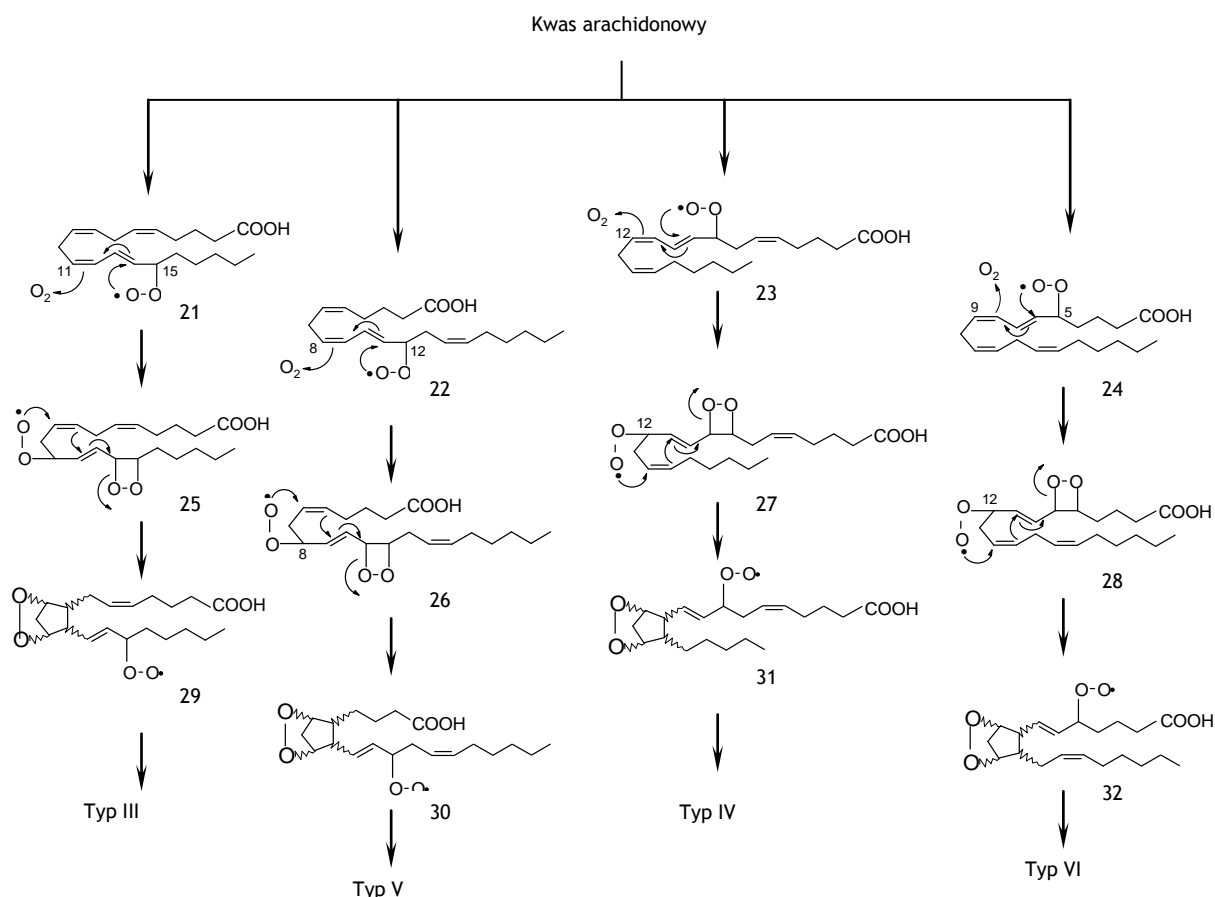
W sytuacji gdy jedna grupa OH jest w położeniu  $\alpha$  a druga w  $\beta$ , oznaczenie  $\alpha$  ma pierwszeństwo.

Cyframi rzymskimi od I do VI oznaczono izo-P wywodzące się z kwasu eikozapentaenowego (EPA), a cztery typy pochodzące od AA oznaczono cyframi od III do VI. Podstawą kwalifikacji były trzy rodzaje łańcuchów bocznych i lokalizacja grup OH.

Kwas eikozapentaenowy (EPA) jest niezbędnym kwasem tłuszczowym, który podlega przemianom z udziałem cyklooksygenazy i lipooksygenazy. W organizmie wbudowany jest w fosfatydyloetanolaminę i fosfatydylocholinę, co oznacza, że *in vivo* jest uwalniany przez fosfolipazę A<sub>2</sub>. Indukowana wolnorodnikowa peroksydacja EPA prowadzi do powstania izoprostanów. Ze względu jednak na obecność

pięciu podwójnych wiązań w EPA istnieje możliwość sformowania sześciu klas izoP, określonych jako F<sub>3</sub>-izoprostany. Wobec istnienia sześciu typów izoP, z których każdy może tworzyć 16 diastereoizomerów, teoretycznie istnieje możliwość powstania 96 F<sub>3</sub>-izoprostanowych izomerów [8].

W przypadku kwasu  $\gamma$ -linolenowego (C-18, n-6) formowane są izoP klasy III i IV. Różnią się one od pochodnych AA tym, że mają łańcuchy krótsze o dwa atomy węgla. Związki te opisuje się stawiając przedrostek dinor np. dinor-iPF<sub>1 $\alpha$</sub> -IV i dinor-iPF<sub>1 $\alpha$</sub> -III [1]. Z kwasu  $\alpha$ -linolenowego (C-18, n-3) powstają dwie klasy izoP. Ze względu na obecność podwójnego wiązania przy C-16, powstające klasy izoP są typami I i II. Związki te występują w świecie roślin, stąd też ich określenie fitoprostany-F<sub>1</sub>. Kwas  $\alpha$ -linolenowy występu-



Ryc. 3. Mechanizm dioksetanowego formowania izoprostanów [6].

je powszechnie w błonach chloroplastów, w mniejszych ilościach znajduje się on w nasionach i olejach. Znaczne ilości tego związku zawiera plankton morski [9]. Powstające izoP opisywane są jako  $\text{dino-}i\text{PF}_{1a}^{\text{I}}$  i  $\text{dino-}i\text{PF}_{1a}^{\text{II}}$ . Kwas dokosaheksaenowy (C-22 n-3, DHA) jest związkiem obecnym w dużych ilościach w strukturach mózgu, gdzie jego udział wynosi 30% względem kwasów tłuszczowych fosfatydyloetanolaminy zawartej w błonach komórkowych. W korze mózgowej jego ilość dochodzi do 35%. Fosfolipidy receptorów siatkówki oka zawierają od 20 do 25% tego kwasu, a w jądrach jest on głównym kwasem wielonienasyconym. DHA posiada 6 podwójnych wiązań, co powoduje, że w wyniku peroksydacji powstaje aż osiem typów izoprostanów, których jeszcze nie nazwano [1].

W celu uporządkowania powyższych informacji w Tabeli 1 przedstawiono wzory strukturalne i rodzaje odpowiadających im typów izoprostanów powstających w wyniku przemian peroksydacyjnych AA, EPA, DHA.

#### Powstawanie izoprostanów *in vivo*

W ludzkim, świeżym osoczu pochodzącym od zdrowych dawców można wykrywać obecność  $\text{F}_2$ -izoP na poziomie  $35 \pm 6$  pg/ml. Ponieważ duże ilości izoP mogą być wytwarzane *in vitro*, zastanawiano się, czy ich oznaczenia przedstawiają rzeczywistą wartość powstałych endogennie związków, czy też były one formowane *in vitro* przez autooksydację lipidów osocza krwi. Ta druga możliwość wydaje się mało prawdopodobna z dwóch powodów. Po pierwsze - osocze zawiera znaczne ilości przeciwutleniaczy, co może

powodować, że peroksydacja lipidów jest hamowana do czasu całkowitego zużycia endogennej askorbinianu. Stwierdzono ponadto, że we krwi znajdującej się w strzykawkach zawierających jeden z syntetycznych przeciwutleniaczy - butylohydroksytoluen (BHT), nie występowało obniżenie zawartości izoprostanów. Wykazano też, że stężenie  $\text{F}_2$ -izoP w moczu, w porównaniu do krwi zdrowych dawców, było wyższe i wynosiło ok.  $1,6 \pm 0,6$  ng/mg kreatyniny.

Mocz zawiera znikomą ilość lipidów i dlatego jest mało prawdopodobne, aby tak znaczne ilości izoprostanów mogły być syntetyzowane *in vitro*. Potwierdzeniem tego przypuszczenia jest fakt, że zawartość izoP w moczu nie wzrasta po jego 5-dniowej inkubacji w temp.  $37^\circ\text{C}$  [4]. Przekonującym dowodem świadczącym o powstawaniu izoprostanów *in vivo* było stwierdzenie wzrostu ich zawartości w osoczu krwi szczurów poddanych działaniu czterochlorku węgla ( $\text{CCl}_4$ ) lub herbicydu - parakwatu, dla wywołania oksydacyjnych uszkodzeń. Zawartość izoprostanów wzrastała 200-krotnie w porównaniu do grupy kontrolnej zwierząt [2]. Szybkość tworzenia się  $\text{F}_2$ -izoP dodatnio korelowała z rozmiarem uszkodzeń wątroby, co potwierdzano wzrostem aktywności aminotransferazy alaninowej (ALA) w osoczu krwi. Stężenia  $\text{F}_2$ -izoP wzrastały szybko i osiągały maksymalny poziom po 4 godz. od podania  $\text{CCl}_4$ , podczas gdy aktywność ALA wzrastała wolniej i tendencja ta utrzymywała się przez 24 godz.  $\text{F}_2$ -izoP tworzyły się w znacznie mniejszych ilościach u szczurów karmionych hepatotoksycznymi dawkami tioacetamidu lub N-(4-hydroksy-

Tabela 1. Klasyfikacja typów izoprostanów [7].

Nowa klasyfikacja	AA	EPA	DHA	Dawna klasyfikacja
Typ I				Typ VI
Typ II				Typ V
Typ III				Typ IV
Typ IV				Typ III
Typ V				Typ II
Typ VI				Typ I
Typ VII				
Typ VIII				

fenylo)acetamidu (paracetamolu), związkami, które nie są metabolizowane do form rodnikowych. Stwierdzono ponadto, że po podaniu  $\text{CCl}_4$  znacznie szybciej wzrastało stężenie  $\text{F}_2$ - izoP w formie zestryfikowanej z fosfolipidami wątroby niż wolnych izoP we krwi. Sugeruje to, że  $\text{F}_2$ - izoP są początkowo estryfikowane, a później powoli uwalniane do krążenia głównego [10].  $\text{F}_2$ - izoprostanu dotychczas oznaczane były głównie w moczu, jednak pierwotne źródło, z którego pochodzą niezmetabolizowane związki obecne w moczu, nie jest znane [2].

#### Metabolizm izoprostanów

Nasza wiedza o metabolizmie izoprostanów nadal pozostaje niepełna. Wykonano między innymi doświadczenie na szczurach, którego celem było określenie szybkości zanikania 8-izo-PGF<sub>2α</sub>. W eksperymencie związek ten podawano we wlewie dożylnym. Wlew przerywano w różnych odstępach czasu i pobierano próbki krwi dla oznaczenia stężenia 8-izo-PGF<sub>2α</sub>. Ustalono, że czas półtrwania tego związku we krwi wynosi ok. 16 minut i, podobnie jak dla

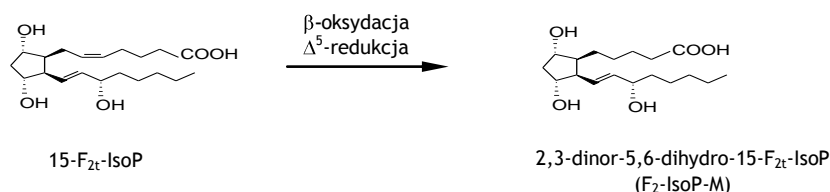
innych prostanoidów, płuca są głównym miejscem oczyszczania układu krwionośnego z  $\text{F}_2$ - izoP. Fakt ten został poparty doświadczeniem, w którym wydłużono tętnicę wątroby szczura przez utworzenie zespolenia wrotno-ciecznego i całkowite wyeliminowanie usuwania 8-izo-PGF<sub>2α</sub> z krwi przez wątrobę. Spowodowało to wydłużenie czasu półtrwania 8-izo-PGF<sub>2α</sub> jedynie z 16 do 21 minut [11].

Wykorzystując znakowany izotopowo 8-izo-PGF<sub>2α</sub> udało się ostatnio ustalić podstawowy metabolit tego związku u ludzi. Jest nim występujący w moczu 2,3-dinor-5,6-dihydro-8-izo-PGF<sub>2α</sub> (Ryc. 4).

Metabolit ten reprezentuje 29% wszystkich możliwych do wyekstrahowania i odzyskiwanych z moczu promieniotwórczych związków.

#### Biologiczne skutki działania izoprostanów

Niektóre izoprostanu znane są z biologicznych efektów *in vitro* wywieranych na prostaglandyny poprzez błonowe receptory. Ich wolnorodnikowy mechanizm formowania się w lipidach błonowych może być przyczyną zmian w

Ryc. 4. Schemat formowania głównego metabolitu 8-izo-PGF<sub>2α</sub> w moczu ludzi [11].

płynności i integralności błon komórkowych. Jednym z lepiej poznanych izoprostanów jest 8-izo-PGF<sub>2α</sub>, odznaczający się właściwościami zwężania naczyń w nerkowym i płucnym układzie krążenia, a także indukowania syntezy DNA w komórkach mięśni gładkich [12]. Stymuluje ponadto mitogenezę i modyfikuje funkcję płytek krwi, ułatwiając agregację przy podprogowych stężeniach typowych agonistów płytek krwi takich jak ADP i trombina. Działania te są możliwe dzięki interakcjom z receptorem TXA<sub>2</sub> lub ze specyficznymi receptorami i jako rezultat blokowania farmakologicznych antagonistów receptorów TXA<sub>2</sub> [13].

Podobnie inny F<sub>2</sub>-izoP, 12epi-PGF<sub>2α</sub>, aktywuje receptory PGF<sub>2α</sub> i stymuluje reakcje proliferacji w fibroblastach [14].

Formowanie izoprostanów *in situ* w fosfolipidach może modyfikować funkcjonowanie komórki. Podczas procesu bruzdkowania komórki może nastąpić uwolnienie związku takiego jak 8-izo-PGF<sub>2α</sub>, który modyfikuje funkcje płytek krwi, np. adhezji i aktywacji. Formowanie izoprostanów w monocytach może modyfikować niektóre aspekty ich funkcji, jak np. ekspresja czynników tkankowych. Podobnie formowanie izoprostanów w utlenionych lipoproteinach o niskiej gęstości (LDL) może zakończyć się ich wychwytem przez makrofagi i utworzeniem komórek piankowatych. Izoprostany mogą także modyfikować funkcjonowanie komórek mięśni gładkich naczyń oraz gromadzić się w tych komórkach w pobliżu blaszek miażdżycowych [15].

8-izo-PGE<sub>2</sub> jest potencjalnym czynnikiem zwężającym naczynia w stopniu porównywalnym do 8-izo-PGF<sub>2α</sub>. Odkrycie to było nieoczekiwane, ponieważ w większości systemów syntetyzowane przez cyklooksygenazę PGE<sub>2</sub> i PGF<sub>2</sub> mogą wywierać przeciwne działania biologiczne, co jest uwarunkowane różnicami w strukturze pierścienia. W tym układzie PGE<sub>2</sub> jest czynnikiem rozszerzającym naczynia, podczas gdy PGF<sub>2α</sub> odznacza się właściwościami zwężenia naczyń. Stwierdzenie, że 8-izo PGE<sub>2</sub> i 8-izo-PGF<sub>2α</sub> są potencjalnymi czynnikami zwężającymi naczynia w układzie naczyniowym nerek sugeruje, że raczej stereochemia łańcucha bocznego niż struktura pierścienia może być ważnym czynnikiem determinującym działanie biologiczne izoprostanów [11].

#### Oznaczanie ilościowe izoprostanów jako wskaźników oksydacyjnego stresu.

Odkrycie mechanizmu formowania izoprostanów i opracowanie metod oznaczania ilościowego i jakościowego tych związków pozwoliło na wykorzystanie ich do praktycznej oceny oksydacyjnego stresu *in vivo*. Kilka czynników sprawia, że wyniki ilościowego oznaczania F<sub>2</sub>-izoprostanów mogą być praktycznym wskaźnikiem peroksydacji lipidów. Przede wszystkim związki te są stabilne i stanowią specyficzne produkty indukowanej wolnorodnikowej peroksydacji lipidów. Ponadto, występują w wykrywalnych ilościach

jako formy zestryfikowane w tkankach, a jako formy wolne w płynach biologicznych. Jest to ważne, ponieważ pozwala na określenie prawidłowego, fizjologicznego poziomu izoprostanów w organizmie, tak że niewielki nawet wzrost ich zawartości może być wykryty w warunkach łagodnego oksydacyjnego stresu.

W badaniach porównawczych, których celem było jednocześnie oznaczenie izoprostanów i dialdehydu malonowego (MDA), powstających podczas utleniania wywołanego za pomocą układu Fe/ADP/askorbinian w mikrosomach uzyskanych z wątroby szczura, wykazano, że przy zachowaniu tendencji wzrostowych obydwu markerów powstawało blisko 25000 razy więcej MDA niż Fe<sub>2α</sub>-izoP [16]. Natomiast przy zastosowaniu CCl<sub>4</sub> jako stymulatora oksydacji lipidów mikrosomalnych *in vivo*, zawartość zestryfikowanych Fe<sub>2α</sub>-izoP wzrosła w wątrobie blisko 85-krotnie, zaś MDA mniej niż 3-krotnie. Przyczyna tego zjawiska pozostaje niewyjaśniona.

Wykazano więc, że ilościowe oznaczanie izoP jest bardzo wiarygodnym i praktycznym wskaźnikiem oksydacyjnych uszkodzeń *in vivo*. Tym bardziej, że próba TBARS nie jest specyficzna dla MDA, ani MDA nie jest specyficznym markerem peroksydacji lipidów.

Oznaczanie zatem ilościowe izoprostanów dostarcza bardzo wiarygodnego i czułego wskaźnika przemian peroksydacyjnych lipidów *in vivo*, pozwalając na oszacowanie udziału wolnych rodników w patofizjologii wielu chorób w sposób, który wcześniej nie był możliwy [17]. Na liście chorób, którym towarzyszy stres oksydacyjny, dzisiaj już można wymienić między innymi takie stany patologiczne jak: choroby neurodegeneracyjne (Alzheimera, Huntingtona, Creutzfelda-Jakoba, stwardnienie rozsiane MS) [18,19], alkoholowa choroba wątroby [20], uszkodzenia wywołane paleniem tytoniu [21], skleroderma [11], hipercholesterolemia i miażdżycy [22,23], astma [24], zapalenia płuc [25,26] i cukrzyca [27].

Mózg jest szczególnie wrażliwy na oksydacyjne uszkodzenia ze względu na wysokie zużycie tlenu, zwiększony poziom żelaza (pełniącego rolę katalizatora) i nadających się do utleniania substratów (głównie błonowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych) oraz niskie poziomy enzymów antyoksydacyjnych (katalazy i peroksydazy glutationowej). Nawet jeśli reaktywne rodniki są zdolne atakować i uszkadzać krytyczne cząsteczki, włączając DNA i białka komórkowe, wysoka zawartość nienasyconych lipidów powoduje, że to ich peroksydacja jest podstawą oksydacyjnych uszkodzeń mózgu.

Oznaczanie zawartości izoprostanów w płynie mózgowo-rdzeniowym stwarza wyjątkową możliwość ujawnienia występowania oksydacyjnego stresu i peroksydacji lipidów w mózgu osób żyjących. Ponadto dogodną metodą pomiarów stężenia izoprostanów u badanych osób jest analiza osocza krwi, a sposobami nieinwazyjnymi jest

oznaczanie tych związków w moczu i wydychanym powietrzu. Przeprowadzone badania wykazują, że izoprostanę oznaczane w osoczu i w wydychanym powietrzu osób chorych na astmę mogą być wskaźnikiem stopnia nasilenia choroby, dzięki czemu staje się możliwe wykorzystanie ich w monitoringu procesu leczenia.

### Związki przeciwutleniające w ochronie organizmu przed skutkami peroksydacji lipidów

Ludzie dotknięci miażdżycą lub innymi chronicznymi schorzeniami są narażeni na większy stres oksydacyjny. W związku z tym, aby przeciwdziałać jego następstwom, wskazane jest przyjmowanie większych ilości antyoksydantów. Znalazło to odbicie w aktualnych zaleceniach Instytutu Żywności i Żywienia odnośnie norm określających zapotrzebowanie np. na kwas askorbinowy, gdzie określa się bezpieczny i zalecany poziom spożycia zróżnicowany odpowiednio do wieku i stanu fizjologicznego osób poddanych leczeniu lub profilaktyce [28]. Stan zaopatrzenia w kwas askorbinowy ma istotne znaczenie w zapobieganiu chorobom sercowo-naczyniowym. Wiele danych wskazuje obecnie, że do utrzymania optymalnego stanu zdrowia niezbędne jest większe niż obecne spożycie witaminy C.

Przeprowadzone badania medyczne wykazały, że niektóre składniki roślin warzywnych lub zielarskich mają, poza wartościami odżywczymi, również duże znaczenie zapobiegawcze w wielu chorobach cywilizacyjnych. Składniki te w zachodniej medycynie określono jako substancje profilaktyczne, które choć nie są potrzebne człowiekowi każdego dnia, mają jednak do spełnienia w organizmie ważną rolę. Uczestniczą one w różnorodnych procesach metabolicznych, naprawczych, odtruwających i adaptacyjnych ustroju, wpływając pośrednio na ogólny stan zdrowia, zapobiegając przy tym stanom patologicznym [29]. Składnikami tymi są przede wszystkim barwniki roślinne różnych klas: antocyjaniny (barwniki czerwono-fioletowe), flawonoidy właściwe (barwniki żółte), procyanidy i taniny (związki prekursorowe barwników i garbników). Zalicza się też do nich niektóre kwasy polifenolowe, jak kwas kawowy, chlorogenowy, ferulowy, galusowy i elegowy, oraz pochodne siarki, jak tiocyjaniny, izotiocyjaniny i siarczki alkilowe, a także związki obficie występujące w czosnku, cebuli i innych roślinach warzywnych z rodziny *Cruciferae* [28].

Czynniki wpływające na poprawę zdrowia określane są obecnie jako fitaminy dla podkreślenia ich zbliżonego działania fizjologicznego do witamin. Farmacja sklasyfikowała fitaminy jako fenolowe antyoksydanty (flawonoidy, polifenole), fitoestrogeny (izoflawony, ligniny), tiozwiązki (sulfidy, tiole, izotiocyjaniny) i karotenoidy. Według aktualnej definicji, fitaminy są wspomagającymi funkcje fizjologiczne organizmu substancjami z roślin żywieniowych. Dotychczas wiele związków fitochemicznych poddano szczegółowym badaniom laboratoryjnym w celu określenia ich udziałów w procesach promowania bądź hamowania zjawiska nowotworzenia [30].

Należy podkreślić, że nie można w bezpośredni sposób odnosić danych eksperymentalnych, dotyczących poszczególnych związków fitochemicznych, do całej populacji ludzkiej. Ludzie bowiem spożywają urozmaicony pokarm o dużej zawartości tych substancji, które dodatkowo ulegają wzajemnym interakcjom oraz reagują z innymi makro- i mikroskładnikami żywności, w zależności od regionalnej

diety. Ponadto, wobec braku niezawodnych biomarkerów, precyzyjne określenie ilości związków fitochemicznych przyjmowanych z żywnością stanowi nie lada problem i wyzwanie. Dodatkowo należy uwzględnić fakt, że dotychczas nie określono zawartości tych związków w wielu produktach żywnościowych. Wobec powyższego, dane epidemiologiczne dotyczące wpływu spożywania związków fitochemicznych na częstość występowania nowotworów sprawiają wiele trudności interpretacyjnych. Brakuje nie tylko odpowiedzi na pytanie, w jakim stopniu związki fitochemiczne są wchłaniane w organizmie, ale w również jaki jest ich metabolizm, a przede wszystkim nie ma informacji na temat dopuszczalnego dziennego zapotrzebowania [31].

### Podsumowanie

Odkrycie izoprostanów jako produktów nieenzymatycznej peroksydacji lipidów stworzyło nową płaszczyznę badań związanych z rolą wolnych rodników w fizjologii i patofizjologii. Analiza ilościowa tych związków w płynach biologicznych (mocz, krew, płyn mózgowo-rdzeniowy) z wykorzystaniem metod fizycznych (chromatografia gazowa, HPLC w połączeniu ze spektrometrią masową) oraz immunologicznych otwiera nowe możliwości badań na temat optymalizacji składu diety pod względem zawartości wszelkich związków o właściwościach przeciwutleniających, a także problemów dotyczących suplementowania żywności.

### WYKAZ SKRÓTÓW

izoP	- izoprostanę
PG	- prostaglandyny
PGI	- prostacykliny
TX	- tromboksany
LT	- leukotrieny
AA	- kwas arachidonowy
EPA	- kwas eikozapentaenowy
DHA	- kwas dokozaheksaenowy
COX-1	- szlak cyklooksygenezy-1
COX-2	- szlak cyklooksygenezy-2
GC	- chromatografia gazowa
HPLC	- wysokosprawną chromatografię cieczową
MS	- spektrometria masowa
RFT	- reaktywne formy tlenu
BHT	- butylohydroksytoluen
ALA	- aminotransferaza alaninowa
ADP	- difosforan adenyliczny
LDL	- lipoproteiny o niskiej gęstości
MDA	- dialdehyd malonowy

### BIBLIOGRAFIA

1. Rokach J., Khanapure S.P., Hwang S.W., Adiyamen M., Lawson J.A., FitzGerald G.A.: The Isoprostanes Perspective. *Prostaglandins*. 1997;54,6,823-851.
2. de Zwart L.L., Meerman J.H., Commandeur J.N., Vermeulen N.H.: Biomarkers of Free Radical Damage Applications in Experimental Animals and in Humans. *Free Radical Biology & Medicine* 1999, 26, 1-2, 202-226.
3. Mayes P.A.: Metabolizm nienasyconych kwasów tłuszczowych i eikozanoidów. *Biochemia Harpera*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1995, 275-283.
4. Morrow J.W., Chen Y., Brame C.J., Yang J., Sanchez S.C., Xn J., Zeckert W.E.: The Isoprostanes: Unique Prostaglandin-like Products of Free Radical Initiated Lipid Peroxidation. *Drug Metabolism Reviews* 1999;31,1,117-139.

5. England T., Beatty E., Rehman A., Nourooz-Zadeh J., Pereira P., O'Reilly J.: The Steady-State Levels of Oxidative DNA Damage and of Lipids Peroxidation (F<sub>2</sub>-Isoprostanes) are not Correlated in Healthy Human Subjects. *Free Radical Research*, 2000;32,4,355-362.
6. Lawson J.A., Rokach J., FitzGerald G.A.: Isoprostanes: Formation, Analysis and Use as Indices of Lipid Peroxidation in Vivo. *J.Biol.Chem.* 1999;274,35,24441-24444.
7. Rokach J., Khanapure S.P., Hwang S.W., Adiyaman M., Lawson J.A., FitzGerald G.A.: Nomenclature of Isoprostanes: A Proposal. *Prostaglandins*, 1997;54,6,853-873.
8. Nourooz-Zadeh J., Halliwell B., Anggard E.E.: Evidence for the Formation of F<sub>2</sub>-Isoprostanes During Peroxidation of Eicosapentaenoic Acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997;236,2,467-472.
9. Imbush R., Muller MD: Formation of Isoprostanes F<sub>2(2)</sub> - like Compounds (Phytostane F<sub>1(1)</sub>) - from  $\alpha$ -Linolenic Acid in Plants. *Free Radical Biology&Medicine* 2000;28,5,720-726.
10. Heagher E.A., FitzGerald G.A.: Indices of Lipid Peroxidation in Vivo: Strengths and Limitations. *Free Radical Biology&Medicine*. 2000;28,12,1745-1750.
11. Roberts L.J., Morrow J.D.: The Generation and Action of Isoprostanes. *Biochemia et Biophysica Acta*. 1997;1345,2,121-135.
12. Takahashi K., Nammour T.M., Fukunaga M., Ebert J., Morrow J.D., Roberts L.J., Hoover R.L., Badr K.F.: Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub> , in the rat: evidence for interaction with thromboxane A<sub>2</sub> receptors. *J.Clin. Invest.* 1992;90,136-141.
13. Fukunaga M., Makita N., Roberts L.J., Morrow J.D., Takahashi K., Badr K.F.: Evidence for the existence of F<sub>2</sub>-isoprostane receptors on rat vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 1983;264,C1619-1624.
14. Kunapuli P., Lawson I.A., Rokach J.A., FitzGerald G.A.: Functional characterization of the ocular PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  receptor: activation by the isoprostane 12-epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . *J. Biol Chem.* 1997;272,27147-27154.
15. Ferro D., Basili S., Pratico D., Juliano L., FitzGerald G.A., Violi F.: Vitamin E reduces monocyte tissue factor expression in cirrhotic patients. *Blood* 1999;93,2945-2950.
16. Roberts L.J., Morrow J.D.: Measurements of F<sub>2</sub> - Isoprostanes as an Index of Oxidative Stress in Vivo. *Free Radical Biology&Medicine* 2000;28,4,505-513.
17. Souvignet C., Cracowski J.L., Stanke-Labesque F., Bessard G.: Are Isoprostanes a Clinical Marker for Antioxidant Drug Investigation. *Fundamental&Clinical Pharmacology*, 2000;14,1,1-10.
18. Pratico D., Lee M-Y, Trojanowski J.Q., Rokach J., FitzGerald G.A.: Increased F<sub>2</sub> - Isoprostanes in Alzheimer's Disease: Evidence for Enhanced Lipid Peroxidation in Vivo. *FASEB J.* 1998;12,1777-1783.
19. Geco A., Minghetti L., Levi G.: Isoprostanes, Novel Markers of Oxidative Injury Help Understanding the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases. *Neurochemical Research*, 2000; 25,9-10,1357-1364.
20. Meagher E.A., Barry O.P., Burke A., Lucey M.R., Lawson J.A., Rokach J.U., FitzGerald G.A.: Alcohol - Induced Generation of Lipid Peroxidation Products in Humans. *Journal of Clinical Investigation* 1998;104,6,805-813.
21. Obwegeser R., Oguogho A., Ulm H., Berghammer P., Sinzinger H.: Maternal Cigarette Smoking Increases F<sub>2</sub> - Isoprostanes and Reduces Prostacyclin and Nitric Oxide in Umbilical Vessels. *Prostaglandins&Other Lipid Mediators* 1999;57,4,269-279.
22. Davi G., Alessandrini P., Mezzetti A., Minotti G., Bucciarelli T., Constantini F., Cipollone F., Ciabattini G., Patrono C.: In vivo of 8-epi - Prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  is Increased in Hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1997;17,11,3230-3235.
23. Gniwotta C., Morrow J.W., Roberts L.J., Kuhn H.: Prostaglandin F<sub>2</sub> - like compounds, F<sub>2</sub> - Isoprostanes are Present in Increased Amounts in Human Atherosclerotic Lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1997;17,11,3236-3241.
24. Wood L.G., FitzGerald D.A., Gibson P.G., Cooper D.M., Garg M.L.: Lipid Peroxidation as Determined by Plasma Isoprostanes is Related to Disease Severity in Mild Asthma. *Lipids* 2000;35,9,967-974.
25. Pretico D., Basili S., Vieri M., Cordova C., Violi F., FitzGerald G.A. : Chronic Obstructive Pulmonary Disease is Associated with an Increase in Urinary Levels of Isoprostane F<sub>2-III</sub>, an Index of Oxidant Stress. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998;158,1709-1714.
26. Montuschi P., Ciabattini G., Paredi P., Pantelidis P., du Bois R.M., Kharitonov S.A., Barnes P.J.: 8-Isoprostane as a Biomarker of Oxidative Stress in Interstitial Lung Diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998;158, 1524-1527.
27. Davi G., Ciabattini G., Consoli A., Mezzetti A., Falco A., Santarone S., Pennese E., Vitacolonna E., Bucciarelli T., Patrono G.: In Vivo Formation of 8-iso Prostaglandin F<sub>2</sub> alpha and Platelet Activation in Diabetes Mellitus: Effect of Improved Metabolic Control and Vitamin E Supplementation. *Circulation* 1999;99,22,224-229.
28. Buthak-Jachymczyk B., Niedźwiecka-Kącik D., Penczenko-Kresowska B., Watanowicz M., Ziemiański S.: Normy żywienia człowieka - fizjologiczne podstawy. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, I, 2001;78-432.
29. Hesik J.: Usprawnienia dietetyczne procesów metabolicznych. Co to są fitaminy? *Postępy Fitoterapii* 2001;6(2-3),9-11.
30. Greenwald P., Clifford C.K., Milner J.A.: Diet and cancer prevention. *European J. of Cancer* 2001;37, 948-965.
31. Troszyńska A., Honke J., Kozłowska H.: Naturalne substancje nieodżywcze (NSN) pochodzenia roślinnego jako składniki żywności funkcjonalnej. *Postępy Fitoterapii* 2000;2,17-21.