

BARBARA WACHOWICZ, AGNIESZKA KULIFER, BEATA OLAS

*Katedra Biochemii Ogólnej
Uniwersytet Łódzki
Pomorska 141/3, 90-236 Łódź
E-mail: olasb@biol.uni.lodz.pl*

WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE IZOPROSTANÓW

WSTĘP

Izoprostany (IsoP), to związki podobne do prostaglandyn (PG), powstające w wyniku nieenzymatycznej, wolnorodnikowej peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, głównie kwasu arachidonowego (kwas 5,8,11,14-eikozatetraenowy, ω -6; AA) (AHOLA i współaut. 2004). Odkrycie izoprostanów pozwoliło wyjaśnić rolę wolnych rodników w fizjologii i patofizjologii człowieka. Dzięki stosowaniu metod ilościowych do oznaczania tych związków, obserwuje się istotny postęp w ocenie i badaniach dotyczących wpływu wolnych rodników na patogenезę ludzkich chorób. Izoprostany powszechnie występują w płynach biologicznych, takich jak mocz, krew, płyn mózgowo-rdzeniowy, a także są obecne w wydychanym powietrzu. Wydalane są przez nerki (TOKARZ i współaut. 2004).

Od ich wykrycia w 1990 r., zgromadziło wiele dowodów potwierdzających, że związki te mogą być biomarkerami peroksydacji lipidów i stresu oksydacyjnego zarówno *in vivo* i *in vitro*. Izoprostany można stosunkowo łatwo oznaczać ilościowo w płynach ustrojowych i wykorzystywać do określania rozmiaru stresu oksydacyjnego w wielu jednostkach chorobowych (MORROW i współaut. 1990, MILNE i współaut. 2007). Na liście chorób, w których zaobserwowano podwyższony poziom izoprostanów w moczu i osoczu, można wymienić między innymi: choroby neurodegeneracyjne (Alzheimer, Huntingtona, Creutzfelda-

Jakoba, stwardnienie rozsiane), marskość wątroby, miażdżyca (hipercholesterolemia, tworzenie się blaszek miażdżycowych, hiperhomocysteinemia), cukrzyca, choroby mięśnia sercowego, ostra cholestaza, astma alergiczna, zespół ostrej stresowej niewydolności oddechowej dorosłych, niewydolność nerek, retinopatia wcześniacza i przewlekła obturacyjna choroba płuc (BASU 2008, COMPORTI i współaut. 2008). Podwyższony poziom izoprostanów w tkankach i osoczu obserwuje się w życiu płodowym i tuż po urodzeniu (BELIK i współaut. 2010).

Analiza czynników wpływających na powstawanie izoprostanów była możliwa dzięki zastosowaniu wielu metod analitycznych: chromatografii gazowej, spektrometrii masowej oraz metod immunologicznych. Wykonywano wiele testów, aby ocenić, że izoprostany, jako specyficzne biomarkery, służą również do wyboru i oceny odpowiedniego składu diety pod względem zawartości substancji antyoksydacyjnych oraz poziomu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (ROBERTS i MORROW 2000, SCHWEDHELM i współaut. 2007).

Niektóre izoprostany (15-F_{2t}-IsoP i 15-E_{2t}-IsoP) charakteryzują się aktywnością biologiczną. Wykazują działanie naczynioskurczowe, indukują mitogenezę w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnego i modulują funkcje płytek krwi (FAM i MORROW 2003).

PEROKSYDACJA LIPIDÓW

Peroksydacja lipidów, to proces stale zachodzący zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patofizjologicznych, polegający na utlenianiu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, które są podstawowymi składnikami fosfolipidów błon biologicznych. Peroksydacja lipidów przebiega na dwóch drogach: nieenzymatycznej, w której w wyniku reakcji wolnorodnikowych zachodzi nieenzymatyczne utlenianie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, oraz enzymatycznej.

Enzymatyczna peroksydacja wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w organizmie inicjowana jest działaniem enzymów z grupy lipooksygenaz (LOXs) oraz cyklooksygenaz (2 izoformy: konstytutywna COX-1 oraz indukowana COX-2) na wielonienasycone kwasy tłuszczowe, przede wszystkim kwas arachidonowy. Enzymy te katalizują wbudowanie cząsteczki tlenu w określoną pozycję wielonienasyconego kwasu tłuszczowego, w wyniku czego powstają wodoronadtlenki lipidów, związki aktywne biologicznie. Głównymi aktywnymi biologicznie związkami utworzonymi na drodze enzymatycznej peroksydacji przy udziale cyklooksygenaz są prostanoidy: prostaglandyny (PGs), tromboksany (TBXs) i

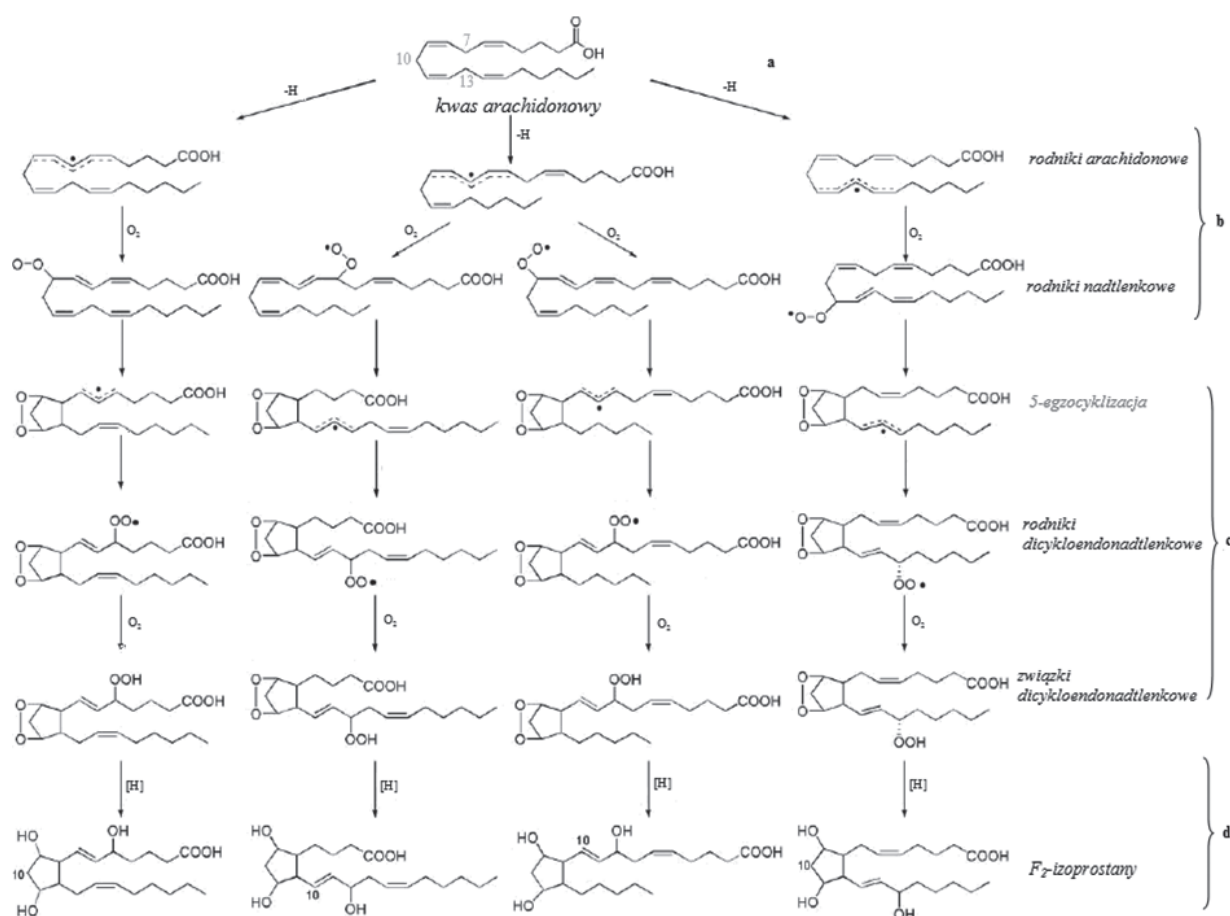
prostacykliny, a przy udziale lipooksygenaz: leukotrieny (LTs), hepoksyliny i lipoksyliny. Szlak epoksygenaz z udziałem cytochromu P-450 służącym jako katalizator do biotransformacji kwasu arachidonowego do utlenionych metabolitów prowadzi do powstania epoksy- i hydroksykwasów.

Powstawanie związków podobnych do prostaglandyn (izomerów prostaglandyn), jako produktów wolnorodnikowej peroksydacji kwasu arachidonowego *in vivo* i *in vitro*, opisali po raz pierwszy PRYOR i GODBER (1991). Struktury te określono jako F_2 -izoprostany, ponieważ posiadają prostanoidowy pierścień 1,3-dihydroksycyklopentanowy (pierścień F), analogiczny do prostaglandyn F (PGF_2) [15]. F_2 -IsoP to strukturalne izomery prostaglandyn, ponieważ zbudowane są z pierścienia cyklopentanowego oraz dwóch łańcuchów bocznych, w których, podobnie jak w prostaglandynach, występują wiązania podwójne i grupa hydroksylowa. Strukturalną cechą różnicującą te dwa związki jest konformacja bocznych łańcuchów w stosunku do pierścienia F. F_2 -izoprostany, w przeciwieństwie do $PGF_{2\alpha}$ przyjmują konformację *cis* (MORROW i współaut. 1994).

NIEENZYMATYCZNY MECHANIZM POWSTAWANIA IZOPROSTANÓW

Izoprostany *in vivo* i *in vitro* powstają w wyniku inicjowanej przez wolne rodniki peroksydacji kwasu arachidonowego, niezależnej od cyklooksygenazy katalizującej przemianę kwasu arachidonowego do prostaglandyn (MORROW i współaut. 1994). Arachidonian znajduje się w formie zestryfikowanej w fosfolipidach błon komórkowych, z których zostaje uwolniony przez enzym fosfolipazę A_2 (MORROW i współaut. 1992, MONTUSCHI i współaut. 2007). Izoprostany powstają poprzez endonadtlenkowy mechanizm, w którym istotną rolę odgrywa produkt przejściowy dicykloendonadtlenek, oraz dioksetanowy mechanizm, prowadzący do utworzenia takich samych regioizomerów, jak ma to miejsce w mechanizmie endonadtlenkowym. Nie określono jeszcze w jakim stopniu mechanizm ten jest odpowiedzialny za tworzenie F_2 -izoprostanów *in vivo* (LAWSON i współaut. 1999). Mechanizm powstawania izoprostanów obejmuje kilka etapów. W pierwszym etapie, w wyniku działania

reaktywnych form tlenu z kwasu arachidonowego, następuje oderwanie atomu wodoru związanego z atomem węgla w pozycji C7, C10 oraz C13. Oderwanie atomu wodoru powoduje delokalizację podwójnych wiązań pomiędzy poszczególnymi atomami węgla, które w konsekwencji posiadają niesparowane elektrony (LIU i współaut. 2009). Wolnorodnikowe oderwanie atomu wodoru od AA powoduje powstawanie trzech rodników arachidonylowych, z których, pod wpływem działania cząsteczki tlenu, tworzą się cztery izomeryczne rodniki nadtlenkowe (MONTUSCHI i współaut. 2007). W zależności od tego, przy którym atomie węgla nastąpiło oderwanie atomu wodoru i przyłączenie cząsteczki tlenu, powstają cztery różne izomery rodników nadtlenkowych (MONTUSCHI i współaut. 2004). Powstałe cztery rodniki nadtlenkowe ulegają 5-egzocyklizacji i pod wpływem kolejnej cząsteczki tlenu tworzą cztery produkty pośrednie – dicykloendonadtlenkowe (formy prostaglandynowe) re-



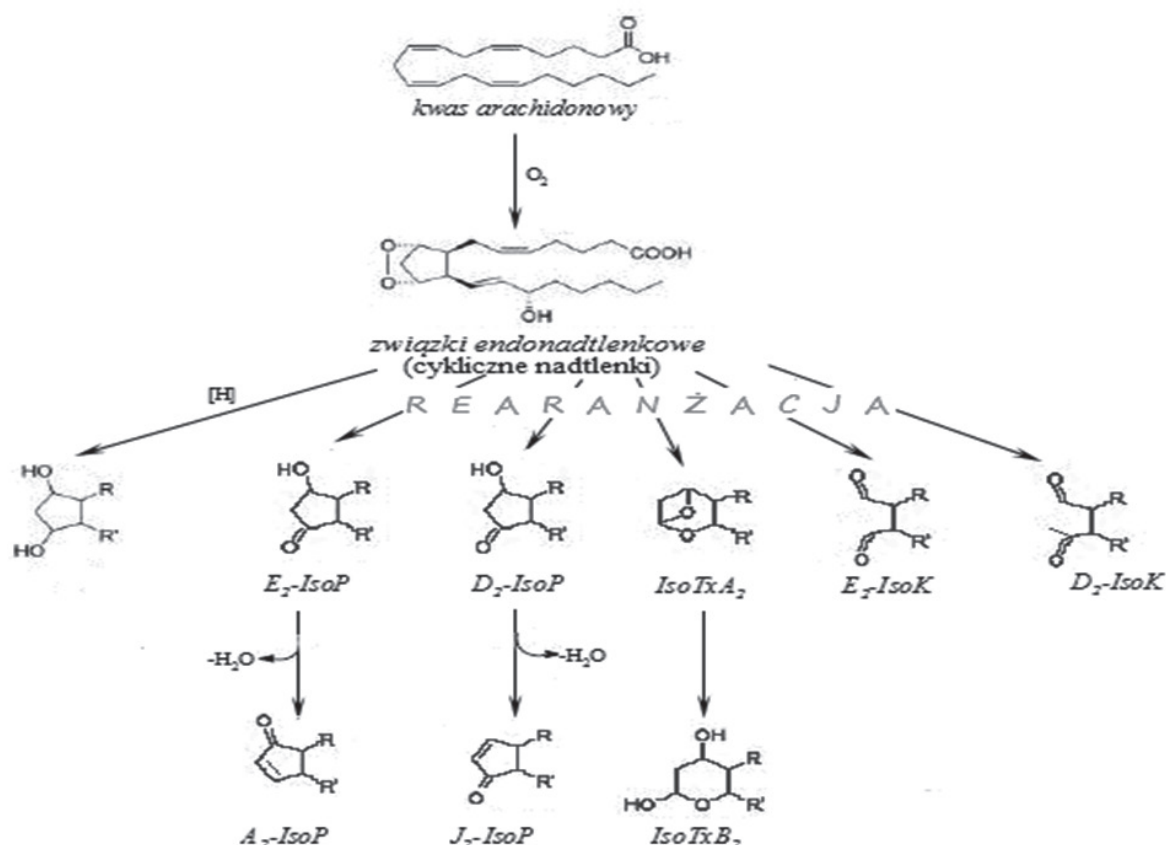
Ryc. 1. Wolnorodnikowy, nieenzymatyczny mechanizm powstawania izoprostanów (wg MONTUSCHIEGO i współaut. 2007, zmodyfikowana).

gioizomery posiadające pierścień F (H_2 -IsoP) (TOKARZ i współaut. 2004). Następnie, dicykloendonadtlenki są redukowane do czterech regioizomerów F_2 -IsoP (Ryc. 1) (MILNE i współaut. 2005).

W wyniku endonadtlenkowego mechanizmu powstawania izoprostanów tworzą się cztery regioizomery F_2 -izoprostanów typu: 5- 12-, 8- i 15 (MUSIEK i współaut. 2005, MILNE i współaut. 2007). Regioizomery te różnią się między sobą rozmieszczeniem grupy hydroksylowej w łańcuchu bocznym F_2 -IsoP. Każdy z czterech regioizomerów może wytworzyć osiem racemicznych diastereoizomerów. Powstawać mogą 64 różne związki, w różnych ilościach (GRECO i MINGHETTI 2004). Mechanizm prowadzący do powstawania F_2 -IsoP przyczynia się również do tworzenia się różnych izoprostanów, różniących się między sobą podstawnikami w pierścieniu prostanowym (FAM i MORROW 2003), tak więc produkty pośrednie endonadtlenkowego mechanizmu powstawania

izoprostanów nie tylko mogą być redukowane wodorem do F_2 -IsoP, ale również mogą ulegać rearanzacji do (GRECO i MINGHETTI 2004): izotromboksanów (IsoTxS) (MONTUSCHI i współaut. 2007), izofuranów (IsoFs) (FESSEL i współaut. 2002, GRECO i MINGHETTI 2004), izoketali (IsoKs) zwanych izolewuloglandynami (MONTUSCHI i współaut. 2004) oraz do D_2 - i E_2 -IsoP. Te ostatnie związki ulegają dehydratacji, w wyniku której powstają cyklopentanowe A_2/J_2 -IsoP (Ryc. 2) (MONTUSCHI i współaut. 2007).

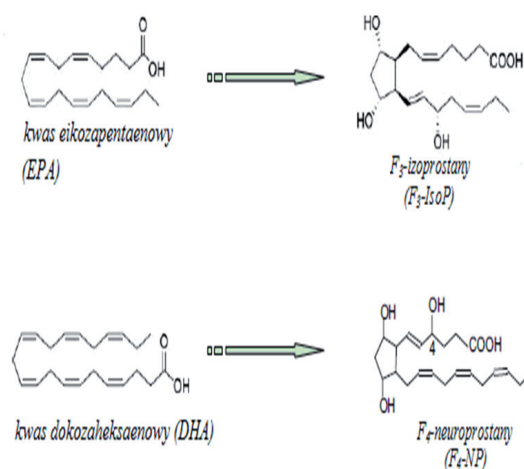
Kwas arachidonowy nie jest jedynym wielonienasyconym kwasem tłuszczowym, który może być substratem w szlaku formowania izoprostanów. Dlatego też, w zależności od tego, jaki kwas nienasycony ulega peroksydacji, powstaje określona klasa izoprostanów (YIN i współaut. 2007). Podstawowym warunkiem cyklizacji jest obecność co najmniej trzech podwójnych wiązań, a ponieważ kwas linolowy (C18:2; ω -6) zawiera tylko dwa takie wiązania, w wyni-



Ryc. 2. Rearanżacja produktów pośrednich wolnorodnikowego mechanizmu powstawania izoprostanów (wg MILNE i współaut. 2008, zmodyfikowana).

ku jego peroksydacji nie powstają żadne izoprostany (COMPORTI i współaut. 2008). W przeciwieństwie do tego dienowego kwasu linolowego, peroksydacja kwasu linolenowego (C18:3; ω -3) przyczyniać się może do formowania F_1 -izoprostanów (MILNE i współaut. 2007). Powstawanie tej klasy izoprostanów jest dość wątpliwe, ponieważ kwas linolenowy występuje w niewielkich ilościach w tkankach zwierzęcych (BELIK i współaut. 2010). Ostatnie badanie wykazały, że kwas eikozapentaenowy (C20:5; ω -3), występujący w niewielkich ilościach w tkankach, może być prekursorem tych związków, kiedy jego ilość wzrasta podczas stosowania diety opartej na spożywaniu produktów rybnych. W wyniku peroksydacji nieenzymatycznej tego wielonienasyconego kwasu tłuszczowego powstają F_3 -izoprostany (Ryc. 3) (GAO i współaut. 2006, BROOKS i współaut. 2008, COMPORTI i współaut. 2008). Z kolei, kwas dokozaheksaenowy (C22:6; ω -3) występuje w dużych ilościach w mózgu, a dokładnie w istocie szarej mózgowia. Produktami perok-

sydacji tego kwasu są związki o nazwie F_4 -neuroprostany (Ryc. 3) (BERNARDO i współaut. 2003, ROBERTS i FESSEL 2004, JAHN i współaut. 2008).



Ryc. 3. Formowanie się danych klas izoprostanów z poszczególnych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (wg MILNE i współaut. 2008, zmodyfikowana).

BIOLOGICZNA AKTYWNOŚĆ IZOPROSTANÓW TYPU F I E

Izoprostany są nie tylko biomarkerami stresu oksydacyjnego *in vivo* i *in vitro*, ale również wykazują różnorodną aktywność biologiczną (COMPORTI i współaut. 2008). Ze względu na ich działania naczynioaktywne, zapalne oraz mitogenne, występują w roli mediatorów uszkodzeń oksydacyjnych zarówno w procesach fizjologicznych jak i patofizjologicznych (CRACOWSKI i DURAND 2006, BASU 2008, JANSSEN 2008, MILNE i współaut. 2008). Ich wolnorodnikowy mechanizm powstawania w fosfolipidach błonowych jest przyczyną zmian w płynności i integralności błon komórkowych (MILNE i współaut. 2008). Aktualna wiedza dotycząca biologicznych skutków działania izoprostanów, oparta jest na badaniach efektów jakie wykazują izoprostany posiadające pierścień typu F (głównie 15-F_{2t}-IsoP) oraz pierścień typu E (15-E_{2t}-IsoP) (BELIK i współaut. 2010).

15-F_{2t}-IsoP są czynnikami zmniejszającymi światło naczyń krwionośnych, takich jak tętnice płucne, tętnice wieńcowe, mózgowe, naczynia siatkówki oka czy żyła wrotna wątrobową (MONTUSCHI i współaut. 2007). Pochodne, 15-F₂-IsoP (9-epi-15-F₂-IsoP, 15-epi-15-F₂-IsoP, ent-15-F₂-IsoP czy ent-15-epi-15-F₂-IsoP) charakteryzują się mniejszą aktywnością naczyniową (BELIK i współaut. 2010). Izomery 12-typu F₂-izoprostanów (12-F₂-IsoP i 12-epi-12-F₂-IsoP) również są czynnikami zmniejszającymi światło naczyń krwionośnych (HOU i współaut. 2004). Izomery 5-typu (5-F₂-IsoP i 5-epi-5-F₂-IsoP) nie wykazują właściwości naczynioaktywnych, natomiast ent-5-F₂-IsoP w niewielkim stopniu przyczyniają się do zwężania naczyń krwionośnych (COMPORTI i współaut. 2008). Izoprostany posiadające pierścień typu E, w szczególności 15-E₂-IsoP są silniejszymi czynnikami zmniejszającymi światło naczyń krwionośnych za pomocą receptorów dla tromboksanu niż 15-F₂-IsoP (GONZALEZ-LUIS i współaut. 2005).

Główne metabolity obecne w moczu, 15-F_{2t}-IsoP: 2,3-dinor-15-F_{2t}-IsoP oraz 2,3-dinor-5,6-dihydro-15-F_{2t}-IsoP, wykazują również właściwości zwężające naczynia krwionośne i nie ulegają deaktywacji podczas metabolizmu (HOU i współaut. 2001).

Izoprostany, posiadające pierścień typu E jak i typu F, mogą też powodować rozkurcz niektórych naczyń krwionośnych. Proces ten jest obserwowany tylko wtedy, gdy receptory dla tromboksanu są blokowane przez ich antagonistów (SQ 29,548 lub ICI 192605) lub

nasycone ich agonistami (U46619) (JOURDAN i współaut. 1997, ZHANG i współaut. 2003).

W komórkach śródbłonna izoprostany 15-F_{2t}-IsoP mają wpływ na uwalnianie czynników rozszerzających naczynia krwionośne: tlenek azotu i prostacykliny, jak również czynniki zwężające: tromboksan A₂ (TXA₂) i endotelinę-1 (ET-1). Izoprostany są więc potencjalnymi śródbłonkowymi czynnikami hiperpolaryzującymi naczynia krwionośne (EDHF) (BELIK i współaut. 2010).

Odpowiedź skurczowa mięśni gładkich, zależna od 15-F_{2t}-IsoP, nie ogranicza się tylko i wyłącznie do naczyń krwionośnych. Podobną odpowiedź zaobserwowano w mięśniach gładkich naczyń chłonnych (BELIK i współaut. 2010), oskrzelowych (JANSSEN i współaut. 2000), jelitowych (SAMETZ i współaut. 2000) czy macicznych, w których 15-F₂-IsoP wywołują też mitozę (BELIK i współaut. 2010).

Związki te u ludzi, świnek morskich oraz szczurów powodują skurcz mięśni gładkich dróg oddechowych *in vitro* i *in vivo*, a więc utrudniają przepływ powietrza na skutek obturacji oskrzeli, co w konsekwencji prowadzi do niedrożności dróg oddechowych oraz powodują wysięk osocza krwi poza łożysko naczyniowe. 15-E_{2t}-IsoP podobnie jak 15-F_{2t}-IsoP, powodują skurcz oskrzeli i zwężając światło dróg oddechowych utrudniają przepływ powietrza do i z płuc; są czynnikami ryzyka rozwoju astmy oskrzelowej (AHR). 15-E_{2t}-IsoP oprócz właściwości zwężających oskrzela, powodują rozkurcz mięśni gładkich oskrzeli układu oddechowego psów (MONTUSCHI i współaut. 2007). Ponadto, 15-F_{2t}-IsoP aktywują receptor dla prostaglandyny PGF_{2α} oraz indukują przerost (hipertrofię) naczyniowych komórek mięśni gładkich, w tym mięśni poprzecznie prążkowanych serca.

Oprócz wpływu izoprostanów na stan napięcia mięśni gładkich, izoprostany wykazują *in vitro* bardzo ważne aktywności związane z patofizjologią miażdżycy naczyń krwionośnych (MONTUSCHI i współaut. 2007). Zwiększone tworzenie się izoprostanów *in vitro* w utlenionych lipoproteinach o niskiej gęstości (LDL), prowadzi do ich wychwytywania przez makrofagi i powstawania komórek piankowatych, które bezpośrednio wpływają na wzrost blaszki miażdżycowej. 15-F₂-IsoPs aktywując receptor dla tromboksanu A₂ także przyczyniają się do powstawania blaszek miażdżycowych (JOURDAN i współaut. 1997).

Izoprostany posiadające pierścień typu E i F wykazują właściwości antyagregacyjne płytek krwi (CRACOWSKI i DURAND 2006). Naczynioaktywne i płytkowe efekty wywoływane przez izoprostany możliwe są dzięki ich interakcjom z receptorem dla TXA_2 .

Izoprostany mają działanie przeciwzapalne (BELIK i współaut. 2010)], ponieważ znoszą adhezję monocytów do komórek śródbłonna naczyń krwionośnych *in vitro* (KUMAR i współaut. 2005). Izoprostany posiadające pierścień typu E, w przeciwieństwie do F_2 -IsoP, z ludzkich mięśni gładkich dróg oddechowych stymulowanych interleukiną-1 β , uwalniają czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF) oraz czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF). W procesie tym pośredniczą np. cAMP oraz receptory prostaglandyn (BERNARDO i współaut. 2003).

12-epi-12- F_2 -IsoP, izomer 12-typu F_2 -IsoP, stymuluje aktywność proliferacyjną w fibroblastach, wywołaną przerostem miocytów u noworodków szczura. Związek ten wywołuje również proliferację oraz wzrost ekspresji endoteliny-1 w bydłych komórkach śródbłonna aorty, tym samym wpływa na funkcjonowanie komórek śródbłonna (MONTUSCHI i współaut. 2004).

Wysokie stężenia izoprostanów, głównie 15-typu isoprostanów, zarówno u pacjentów z cukrzycą, jak i astmą, wywołuje zwiększoną aktywność płytek krwi oraz obturację oskrzeli, zaś u pacjentów z zespołem wątrobowo-

nerkowym, przyczyniają się do spadku przepływu krwi w nerkach (MONTUSCHI i współaut. 2007).

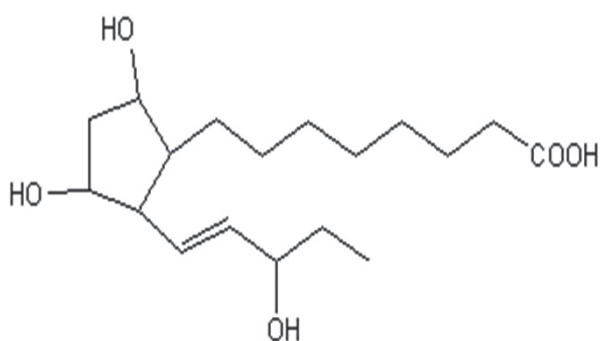
Izoketale (izolewuloglandyny), wysoce reaktywne, cyklopentanowe IsoP, reprezentują nową klasę neurotoksycznych produktów wolnorodnikowej peroksydacji lipidów. Łącząc się z grupami lizynowymi w białkach tworzą addukty i zmieniają właściwości funkcjonalne białek. Izoketale, występujące w mikromolarnych stężeniach w warunkach stresu oksydacyjnego, indukują apoptozę neuronów, a więc za sprawą reaktywnych form tlenu, przyczyniają się do ich neurodegeneracji. Ponadto, modulują uwalnianie neurotransmiterów: adrenaliny z tęczówki i ciała rzęskowego ssaków czy D-asparagianinu z siatkówki oka bydłowego.

Cyklopentanowe 15- A_2 - i 15- J_2 -IsoP hamują odpowiedź zapalną w makrofagach mysich. Związki te przyczyniają się również do inhibicji aktywności indukowanej syntazy tlenu azotu (iNOS), cyklooksygenazy-2 oraz produkcji azotynów i prostaglandyn. 15- J_2 -IsoP aktywują peroksosomalny indukowany proliferacyjnie receptor γ (PPAR) należący do receptorów jądrowych. 15- A_2 -IsoP nie wykazują tej właściwości, natomiast powodują inhibicję szlaku sygnałowego zależnego od NF- κ B, wskazując tym samym, że cyklopentanowe izoprostany mogą być negatywnymi regulatorami stanu zapalnego (MONTUSCHI i współaut. 2007).

FITOPROSTANY

W tkankach roślinnych stwierdzono obecność fitoprostanów, pochodnych prostaglandyn, powstających, podobnie jak izoprostany, w wyniku nieenzymatycznej peroksydacji kwasu α -linolenowego (C18:3) (Ryc. 4). Fitoprostany są związkami krótszymi od IsoP, różniącymi się liczbą grup metylenowych, dlatego też nazwano je dinorami izoprostanów. W wyniku nieenzymatycznej peroksydacji kwasu α -linolenowego powstaje kilka klas fitoprostanów oznaczonych literami pochodzącymi od pierścienia występującego w danej prostaglandynie. Każda klasa fitoprostanów składa się z dwóch racemicznych regioizomerów (I i II typu). Najpowszechniej występującymi fitoprostanami są B_1 -fitoprostany. Występują w stanach fizjologicznych i patofizjologicznych roślin (THOMA i współaut. 2003, LOEFFLER i współaut. 2005, DURAND i

współaut. 2009). Związki te mogą występować w formie wolnej, jak i zestryfikowanej, np. w korzeniach *Valeriana* L. (kozłek), liściach *Mentha* L. (mięta) (ZHANG i współaut. 2005), *Betula* L. (brzoza) oraz kwiatach *Tilia* (lipa) (DURAND i współaut. 2009). Fitoprostany są generowane zarówno pod wpływem reaktywnych form tlenu czy przez czynniki chorobotwórcze grzybów *Botrytis cinerea*, jak również endogennie (działalność nadtlenków, metali ciężkich). Fitoprostany charakteryzują się szerokim spektrum aktywności biologicznej, m.in. indukują aktywność S-tranferazy glutationowej (GST), biosyntezę fitoaleksyn (substancji obronnych wydzielanych miejscowo przez roślinę podczas infekcji) powodują również wzrost aktywności kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK) (THOMA i współaut. 2003). Fitoprostany po-



Ryc. 4. Wzór strukturalny fitoprostanu F_1 (wg DURANDA i współaut. 2009, zmodyfikowana).

siadają też właściwości detoksykacyjne. B_1 -fitoprostany zapobiegają śmierci komórek roślinnych wywołanej zatruciem $CuSO_4$, jak wykazały badania przeprowadzane na kultu-

rach komórek tytoniu (*Nicotiana tabacum*), które inkubowano 17 h z B_1 -fitoprostanami i $CuSO_4$ w celu wywołania reakcji adaptacyjnej. Preinkubacja kultur komórek tytoniu w niskich stężeniach $CuSO_4$ ($75 \mu M$) po 41 h powodowała wzrost śmiertelności komórek o około 20%, podczas gdy B_1 -fitoprostany nie zwiększały ich śmiertelności. W stresie oksydacyjnym wywołanym 1 mM czy 10 mM $CuSO_4$ po 24 h zaobserwowano wzrost śmiertelności kultur komórek o 70–90%. W obecności B_1 -fitoprostanów wyraźnie zmniejszała się śmiertelność komórek wywołana działaniem $CuSO_4$. Fitoprostany są nie tylko biomarkerami stresu oksydacyjnego, ale także pełnią rolę mediatorów reakcji obronnych w odpowiedzi na stres oksydacyjny (LOEFFLER i współaut. 2005).

OZNACZANIE ILOŚCIOWE IZOPROSTANÓW

Odkrycie oraz opracowanie metod oznaczania ilościowego oraz jakościowego izoprostanów pozwoliło określić poziom stresu oksydacyjnego *in vivo*. Izoprostany wykazują szereg właściwości które sprawiają, że wyniki oznaczania stężenia F_2 -IsoP są wiarygodnym, czułym i swoistym wskaźnikiem stresu oksydacyjnego w wielu jednostkach chorobowych. Przede wszystkim związki te są stabilne chemicznie oraz są specyficznymi produktami wolnorodnikowej peroksydacji lipidów. Powstają *in vivo* i występują w wykrywalnych ilościach w formie zestryfikowanej w tkankach, a jako formy wolne w płynach biologicznych, tym samym wskazując fizjologiczny poziom stresu oksydacyjnego (MONTUSCHI i współaut. 2007). Materiałem używanym do oznaczania ilościowego F_2 -IsoP i ich metabolitów są płyny ustrojowe: mocz, osocze krwi, płyn mózgowo-rdzeniowy, skroplone wydychane powietrze, płyn oskrzelowo-płucny oraz lipoproteiny znajdujące się w osoczu (PIŁACIK i współaut. 2002).

Powszechnie stosowaną metodą oznaczania poziomu peroksydacji lipidów, a co za tym idzie stresu oksydacyjnego, jest technika oznaczania ilościowego dialdehydu malonowego (MDA), produktu peroksydacji lipidów, poprzez jego reakcję z kwasem tiobarbiturowym (TBA) (MONTUSCHI i współaut. 2004).

Inną metodą oznaczania poziomu stresu oksydacyjnego *in vivo* jest określanie ilościowe organicznych substancji lotnych, zawartych w wydychanym powietrzu – alkanów:

etanu i pentanu. Jednakże wiarygodność, jak i dokładność tej metody jest dość wątpliwa, ponieważ te węglowodorowe gazy są nieistotnymi, końcowymi produktami peroksydacji lipidów, a ich stężenie zależy od poziomu uszkodzeń spowodowanych działalnością nadtlenków (MONTUSCHI i współaut. 2004).

Porównywano również wodoronadtlenki lipidów jako wskaźniki stresu oksydacyjnego ze stężeniem F_2 -IsoP. Ilościowe oznaczanie wodoronadtlenków lipidów metodą chromatografii gazowej czy spektrometrii masowej charakteryzuje się małą dokładnością; wodoronadtlenki lipidów są niewykrywalnymi związkami w układzie krążenia ludzi nawet w warunkach stresu oksydacyjnego (MONTUSCHI i współaut. 2004).

W porównaniu z innymi biomarkerami peroksydacji lipidów, oznaczanie ilościowe F_2 -IsoP analityczną metodą chromatografii gazowej czy spektrometrii masowej w płynach biologicznych oraz tkankach jest metodą najbardziej czułą i wiarygodną (MILNE i współaut. 2007), ale także drogą i czasochłonną techniką określania poziomu stresu oksydacyjnego *in vivo* (MONTUSCHI i współaut. 2004).

Tańszą, częściej stosowaną metodą jest metoda immunoenzymatyczna oznaczania w moczu głównych metabolitów $15-F_2$ -IsoP – 2,3-dinor-5, 6-dihydro- $15-F_{2t}$ -IsoP. Oznaczenia te cechują się dokładnością oceny całkowitego poziomu endogennie powstałych F_2 -IsoP oraz nieinwazyjnością metod. Ponadto, 2,3-di-

nor-5, 6-dihydro-15-F_{2t}-IsoP jest związkiem bardzo stabilnymi w moczu, dlatego też podczas oznaczania w stanach fizjologicznych i patofizjologicznych człowieka, nie zaobserwowano znaczącej dziennej zmienności stężeń (MONTUSCHI i współaut. 2004).

Oznaczanie ilościowe zestryfikowanych F₂-IsoP w lipoproteinach osocza pozwala oceniać poziom stresu oksydacyjnego w lipoproteinach niskiej gęstości (LDL) *in vivo*, odpowiedzialnych za proces miażdżycy (FAM i MORROW 2003).

Istnieje szereg komercyjnie dostępnych metod immunologicznych (test ELISA) do oznaczania poziomu F₂-IsoP zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. Jednakże wrażliwość oraz specyficzność tych metod nie dorównuje metodzie chromatografii gazowej czy spektrometrii masowej (MILNE i współaut. 2007).

W warunkach stresu hipoksyjnego płuc, wysokie stężenia tlenu powodują zahamo-

wanie powstawania F₂-IsoP oraz wzrost poziomu izofuranów. Warunki podwyższonego poziomu O₂ powodują, iż nie F₂-IsoP, a izofurany, produkty peroksydacji lipidów z podstawionym pierścieniem tetrahydrofuranowym, stają się bardziej wiarygodnymi biomarkerami stresu oksydacyjnego niż inne klasy izoprostanów (FESSEL i współaut. 2002, FESSEL i ROBERTS 2005). Podczas reanimacji przedwcześnie urodzonych dzieci z wysokim stężeniem O₂ (90%), w moczu obserwuje się wysoki poziom wyłącznie izofuranów (FESSEL i współaut. 2002).

Oznaczanie ilościowe F₂-IsoP w płynach i tkankach biologicznych pozwala oceniać poziom stresu oksydacyjnego *in vivo* w poszczególnych jednostkach chorobowych, jak również stanowi biochemiczną podstawę określania odpowiedniej interwencji terapeutycznej (MONTUSCHI i współaut. 2007).

PODSUMOWANIE

Izoprostany, powstając w wyniku nieenzymatycznej wolnorodnikowej peroksydacji kwasu arachidonowego, są wydalone przez nerki i występują w moczu. Powstają też *in vitro* w obecności tlenu. Badania przeprowadzane na świeżym osoczu pobranym od zdrowych dawców wykazały obecność F₂-IsoP na poziomie 35 ± 6 pg/ml (Tabela 1). Obecnie u ludzi zawartość F₂-IsoP oznacza się nie tylko w osoczu czy moczu, ale m.in. w tkance mózgowej, tkankach pobiopsyjnych żołądka, w zyle pępkowej (Tabela 1). Izoprostany charakteryzują się różnorodną aktywnością biologiczną, ale przede wszystkim są ważnymi biochemicznymi markerami endogennej wolnorodnikowej peroksydacji lipidów, a oznaczanie ilości tych związków, m.in. w moczu pozwala w sposób nieinwazyjny na ocenę stresu oksydacyjnego zachodzącego w organizmie.

Tabela 1. Stężenia izoprostanów w poszczególnych tkankach i płynach ustrojowych człowieka (wg COMPORTIEGO i współaut. 2008, zmodyfikowana).

Płyny ustrojowe lub tkanki	Stężenie IsoP
Osocze (IsoP wolne)	35 ± 6 pg/ml
Osocze (IsoP zestryfikowane)	119 ± 22 pg/ml
Mocz	$1,6 \pm 0,6$ ng/mg kreatyny
Płyn mózgowo-rdzeniowy	$23 \pm 1,0$ pg/ml
Tkanka pobiopsyjna żołądka	$4,3 \pm 1,4$ ng/g
Tkanka żyły pępkowej	$1,4 \pm 0,7$ ng/g
Mózg	$4,9 \pm 3,0$ ng/g

WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE IZOPROSTANÓW

Streszczenie

Peroksydacja nienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład fosfolipidów zmienia ich aktywność biologiczną i wpływa na integralność błon komórkowych. Istnieją dwie drogi utleniania kwasów tłuszczowych – enzymatyczna i nieenzymatyczna. Wolne wielonienasycone kwasy tłuszczowe mogą być utleniane przy udziale licznych enzymów

tworząc różne klasy mediatorów lipidowych: prostaglandyn, tromboksanów, prostacyklin, lipoksyn i hepoksylin. Nieenzymatyczna peroksydacja lipidów jest inicjowana przez wolne rodniki i prowadzi do powstania innych produktów peroksydacji, głównie izoprostanów, izotromboksanów, izolewuglandyn i izofuranów. Praca przedstawia obecny stan wiedzy

dotyczący struktury i powstawania izoprostanów, końcowych produktów utleniania wielonienasyconego kwasu tłuszczowego – kwasu arachidonowego (kwas 5,8,11,14–eikozatetraenowy; -6). Opisuje też możliwość wykorzystania tych mediatorów lipidowych jako ważnych biomarkerów stresu oksydacyjnego w organizmie człowieka. Ponadto, w pracy

przedstawiono aktywność biologiczną i znaczenie fizjologiczne izoprostanów, głównie ich działanie na naczynia krwionośne. Scharakteryzowano również właściwości fitoprostanów pochodzących z roślin i opisano ilościowe metody wykorzystywane do oznaczania izoprostanów w materiale biologicznym.

BIOLOGICAL PROPERTIES OF ISOPROSTANES

Summary

Oxidation of polyunsaturated fatty acids changes the biological activity of phospholipids that are important for the integrity of cellular membranes. Two pathways of lipid peroxidation can occur: enzymatic and nonenzymatic. Free polyunsaturated fatty acids can be oxidized by multiple enzymes forming the reactive lipid mediators such as prostaglandins, thromboxanes, prostacyclins, lipoxins and hepoxylins. Nonenzymatic lipid peroxidation process initiated by free radicals leads to the formation of different products, mainly isoprostanes, isothromboxanes, isolevuglandins and isofurans. The review summa-

rized current knowledge on the structure and formation of final products of nonenzymatic oxidized polyunsaturated fatty acid (arachidonic acid, -6). Potential applications of its oxidized metabolites, especially isoprostanes as the most important biomarkers of oxidative stress in human diseases are determined. Biological activities and physiological role of isoprostanes, especially their effects on the vessel wall are described. The properties of phytoprostan derivatives from plants are also characterized. The quantitative used for the estimation of isoprostanes are presented.

LITERATURA

- AHOLA T., FELLMAN V., KJELLMER I., RAIVIO K. O., LAPATTO R., 2004. *Plasma 8-isoprostane is increased in preterm infants who develop bronchopulmonary dysplasia or periventricular leukomalacia*. *Pediatr. Res.* 56, 88–93.
- BASU S., 2008. *F₂-isoprostanes in human health and diseases: from molecular mechanisms to clinical implications*. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 1405–1434.
- BELIK J., GEMA E., GONZÁLEZ-LUIS A., PEREZ-VIZCAINO F., VILLAMOR E., 2010. *Isoprostanes in fetal and neonatal health and disease*. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 177–188.
- BERNARDO A., GRECO A., LEVI G., MINGHETTI L., 2003. *Differential lipid peroxidation, Mn superoxide, and bcl-2 expression contribute to the maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress*. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 509–519.
- BROOKS J. D., MILNE G. L., YIN H., SANCHEZ S. C., PORTER N. A., MORROW J. D., 2008. *Formation of highly reactive cyclopentenone isoprostane compounds (A₃/F₃-isoprostanes) in vivo from eicosapentaenoic acid*. *J. Biol. Chem.* 283, 12043–12055.
- COMPORTI M., SIGNORINI C., AREZZINI B., VECCHIO D., MONACO B., GARDI C., 2008. *F₂-isoprostanes are not just markers of oxidative stress*. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 248–250.
- CRACOWSKI J. L., DURAND T., 2006. *Cardiovascular pharmacology and physiology of the isoprostanes*. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 20, 417–427.
- DURAND T., BULTEL-POUNCE V., GUY A., BERGER S., MUELLER M., GALANO J. M., 2009. *New bioactive axylipins formed by non-enzymatic free-radical-catalyzed pathway: the phytoprostan*. *Lipids* 10, 875–888.
- FAM S. S., MORROW J. D., 2003. *The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation*. *Curr. Med. Chem.* 10, 1723–1733.
- FESSEL J. P., ROBERTS L. J. 2ND, 2005. *Isofurans: novel products of lipid peroxidation that define the occurrence of oxidant injury in settings of elevated oxygen tension*. *Antiox. Redox Signal.* 7, 202–211.
- FESSEL J. P., PORTER N. A., MOORE K. P., SELLER J. R., ROBERTS L. J., 2002. *Discovery of lipid peroxidation products formed in vivo with a substituted tetrahydrofuran ring (isofurans) that are favored by increased oxygen tension*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 16713–16718.
- GAO L., YIN H., MILNE G. L., PORTER N. A., MORROW J. D., 2006. *Formation of F-ring isoprostane-like compounds (F₃-isoprostanes) in vivo from eicosapentaenoic acid*. *J. Biol. Chem.* 281, 14092–14099.
- GONZÁLEZ-LUIS G., PEREZ-VIZCAINO F., GARCIA-MUNOZ F., DE MEY J. G., BLANCO C. E., VILLAMOR E., 2005. *Age-related differences in vasoconstrictor responses to isoprostanes in piglet pulmonary and mesenteric vascular smooth muscle*. *Pediatr. Res.* 57, 845–852.
- GRECO A., MINGHETTI L., 2004. *Isoprostanes as biomarkers and mediators of oxidative injury in infant and adult central nervous system diseases*. *Curr. Neurovasc. Res.* 1, 341–342.
- HOU X., ROBERTS L. J. 2ND, TABER D. F., MORROW J. D., KANAI K., GOBEIL F. J., BEAUCHAMP M. H., BERNIER S. G., LEPAGE G., VARMA D. R., CHEMTOB S., 2001. *2,3-dinor-5,6-dihydro-15-F₂-isoprostane: a bioactive prostanoid metabolite*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281, R391–R400.
- HOU X., ROBERTS L. J., GOBEIL F. J., TABER D., KANAI K., ABRAN D., BRAULT S., CHECCHIN D., SENNLAUB F., LACHAPPELLE P., VARMA D., CHEMTOB S., 2004. *Isomer specific contractile effects of a series of synthetic F₂-isoprostanes on retinal and cerebral microvasculature*. *Free Radic. Biol. Med.* 6, 163–172.
- JAHN U., GALANO J. M., DURAND T., 2008. *Beyond prostaglandins—chemistry and biology of cyclic oxygenated metabolites formed by free-radical pathways from polyunsaturated fatty acids*. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 5894–5955.

- JANSSEN L. J., 2008. *Isoprostanes and lung vascular pathology*. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 39, 383–389.
- JANSSEN L. J., PREMJI M., NETHERTON S., CATALI A., COX G., KESHAVJEE S., CRANKSHAW D. J., 2000. *Excitatory and inhibitory actions of isoprostanes in human and canine airway smooth muscle*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 295, 506–511.
- JOURDAN K. B., EVANS T. W., CURZEN N. P., MITCHELL J. A., 1997. *Evidence for a dilator function of 8-iso prostaglandin $F_{2\alpha}$ in rat pulmonary artery*. Br. J. Pharmacol. 120, 1280–1285.
- KUMAR A., KINGDON E., NORMAN J., 2005. *The isoprostane 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ suppresses monocyte adhesion to human microvascular endothelial cells via two independent mechanisms*. FASEB J. 19, 443–445.
- LAWSON J. A., ROKACH J., FITZGERALD G. A., 1999. *Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation in vivo*. J. Biol. Chem. 274, 24441–24444.
- LIU W., MORROW J. D., YIN H., 2009. *Quantification of F_2 -isoprostanes as a reliable index of oxidative stress in vivo using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method*. Free Radic. Biol. Med. 47, 1101–1107.
- LOEFFLER C., BERGERS K., GUY A., DURAND T., BRINGNAM G., DREYER M., RAD U., DURNER J., MUELLER M. J., 2005. *B-1 Phytoprostanes trigger plant defense and detoxification responses*. Plant Physiol. 137, 328–331.
- MILNE G. L., MUSIEK E. S., MORROW J. D., 2005. *F_2 -Isoprostanes as markers of oxidative stress in vivo*. Biomarkers 1, S10–S23.
- MILNE G. L., YIN H., BROOKS J. D., SANCHEZ S., JACKSON R. L., MORROW J. D., 2007. *Quantification of F_2 -isoprostanes in biological fluids and tissues as a measure of oxidant stress*. Methods Enzymol. 433, 113–126.
- MONTUSCHI P., BARNES P., ROBERTS J., 2004. *Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress*. FASEB J. 18, 1792–1796.
- MONTUSCHI P., BARNES P., ROBERTS L. J., 2007. *Insights into oxidative stress: the isoprostanes*. Curr. Med. Chemistry 14, 703–711.
- MORROW J. D., HILL K. E., BURK R. F., NAMMOUR T. M., BADR K. F., ROBERTS L. J., 2ND, 1990. *A series of prostaglandin F_2 -like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalysed mechanism*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 9383–9387.
- MORROW J. D., AWAD J. A., BOSS H. J., BLAIR I. A., ROBERTS L. J., 1992. *Noncyclooxygenase-derived prostanoids (F_2 -isoprostanes) are formed in situ on phospholipids*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10721–10725.
- MORROW J. D., MINTON T. A., MUKUNDAN C. R., CAMPBELL M. D., ZACKERT W. E., DANIEL V. C., BADR K. F., BLAIR I. A., ROBERTS L. J., 1994. *Free radical-induced generation of isoprostanes in vivo. Evidence for the formation of D-ring and E-ring isoprostanes*. J. Biol. Chem. 269, 4317–4326.
- MUSIEK E. S., MILNE G. L., MORROW J. D., 2005. *Recent advances in the biochemistry and clinical relevance of the isoprostane pathway*. Lipids 40, 987–994.
- PIŁACIK B., WROŃSKA-NOFER T., WĄSOWICZ W., 2002. *F_2 -Isoprostanes biomarkers of lipid peroxidation: the utility in evaluation of oxidative stress induced by toxic agents*. Int. J. Occupat. Med. Environ. Health 15, 21–24.
- PRYOR W. A., GODBER S. S., 1991. *Oxidative stress status: an introduction*. Free Radic. Biol. Med. 10, 173.
- ROBERTS L. J., FESSEL J. P., 2004. *The biochemistry of the isoprostane, neuroprostane, and isofuran pathways of lipid peroxidation*. Chem. Phys. Lipids 128, 173–186.
- ROBERTS L. J., MORROW J. D., 2000. *Measurement of F_2 -isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo*. Free Radic. Biol. Med. 28, 505–513.
- SAMETZ W., HUMMER K., BUTTER M., WINTERSTEIGER R., JUAN H., 2000. *Formation of 8- iso PGF $_{2\alpha}$ and thromboxane A $_2$ by stimulation with several activators of phospholipase A $_2$ in the isolated human umbilical vein*. Br. J. Pharmacol. 131, 145–51.
- SCHWEDHELM E., BENNDORF R. A., BÖGER R. H., TSIKAS D., 2007. *Mass spectrometric analysis of F_2 -Isoprostanes: markers and mediators in human disease*. Curr. Pharmaceut. Anal. 3, 40–42.
- THOMA I., LOEFFLER C., SINHA A.K., GUPTA M., KRISCHKE M., STEFFAN B., ROITSCH T., MUELLER M.J., 2003. *Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants*. Plant J. 34, 363–364.
- TOKARZ A., JELIŃSKA M., OZGA A., 2004. *Izoprostany – nowe biomarkery lipidowej peroksydacji in vivo*. Biul. Wyd. Farm. AMW 2, 1–6.
- YIN H., BROOKS J. D., GAO L., PORTER N. A., MORROW J. D., 2007. *Identification of novel autoxidation products of the omega-3 fatty acid eicosapentaenoic acid in vitro and in vivo*. J. Biol. Chem. 282, 29890–29891.
- ZHANG Y., TAZZEO T., HIROTA S., JANSSEN L. J., 2003. *Vasodilatory and electrophysiological actions of 8-iso-prostaglandin E $_2$ in porcine coronary artery*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 305, 1054–1060.
- ZHANG Y., PERTENS E., JANSSEN L. J., 2005. *8-isoprostaglandin E $_2$ activates Ca $^{2+}$ -dependent K $^{+}$ current via cyclic AMP signaling pathway in murine renal artery*. Eur. J. Pharmacol. 520, 22–28.