

KATARZYNA OGNIK, EWELINA CHOLEWIŃSKA

*Katedra Biochemii i Toksykologii
Wydział Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Akademicka 13, 20-950 Lublin
E-mail: kasiaognik@poczta.fm*

BIOMARKERY WYKORZYSTYWANE W OCENIE OKSYDACYJNYCH USZKODZEŃ BIAŁEK

WSTĘP

Stres oksydacyjny występuje w komórce, gdy dochodzi do zaburzeń równowagi między procesami anty- i prooksydacyjnymi. Nadmierna produkcja reaktywnych form tlenu i azotu oraz zbyt mała ilość substancji antyoksydacyjnych prowadzi do przewagi procesów prooksydacyjnych (KAROLKIEWICZ 2011). Jeśli stan ten utrzymuje się krótko - stymuluje reakcje obrony antyoksydacyjnej organizmu. Przykładem może być produkcja reaktywnych form tlenu przez makrofagi, stanowiąca jeden z mechanizmów obronnych w infekcji bakteryjnej (GRIMSRUD i współaut. 2008). Długotrwały stres oksydacyjny może z kolei prowadzić do uszkodzenia komórek, zwłaszcza utleniania białek, węglowodanów i lipidów (KAROLKIEWICZ 2011).

Ocena nasilenia stresu oksydacyjnego umożliwia określenie stopnia uszkodzeń komórek, a także związanych z nimi chorób, takich jak choroba Alzheimera, miażdżyca, zaćma, astma czy obturacyjna choroba płuc. Bezpośrednia analiza ilości reaktywnych form tlenu i azotu jest zadaniem bardzo trudnym, dlatego w ocenie nasilenia stresu oksydacyjnego częściej wykorzystuje się związki powstające w wyniku reakcji wolnych rodników ze składnikami komórek organizmu. Każda z substancji utleniających powoduje bowiem powstanie charakterystycznych dla niej markerów, a wśród nich specyficznych modyfikacji białek czy produktów ubocznych reakcji. Są one o wiele trwalsze od wolnych rodników, a przez to łatwiejsze do analizy. Ponadto, dostarczają informacji

na temat konsekwencji uszkodzeń dla organizmu (DALLE-DONNE i współaut. 2005).

MARKERY PEROKSYDACJI BIAŁEK POWSZECHNIE WYKORZYSTYWANE W DIAGNOSTYCE STRESU OKSYDACYJNEGO

Markerami uszkodzeń białek są produkty ich utleniania, powstające w wyniku stresu oksydacyjnego. Produkty oksydacji cząsteczek biologicznych mogą wykazywać specyficzność tkankową i organellową. Łatwość wykrycia swoistego śladu, pozostawionego w postaci zmodyfikowanych składników komórki, może stanowić informację o chemicznej i biologicznej naturze utleniacza, a także pomóc w diagnostyce różnych chorób (DALLE-DONNE i współaut. 2005).

Białka mogą być utleniane bezpośrednio przez ROS (reaktywne formy tlenu) lub pośrednio w reakcjach ze związkami powstałymi w wyniku działania stresu oksydacyjnego. Wśród substancji wykazujących zdolność do utleniania białek wymienia się przede wszystkim: wodoronadtlenki, kwas podchlorawy, kwas bromawy, metale ulegające redukcji np. żelazo i miedź, nadtlenoazotyn, wolne rodniki, a także produkty peroksydacji lipidów i utlenione aminokwasy. Związki te wykazują odmienny sposób działania, mogą też przyłączać się do różnych końców łańcucha polipeptydowego. W związku z tym wyróżnia się wiele zróżnicowanych mechanizmów utleniania białek oraz powstających produktów reakcji (SHACTER 2000). Do najważniejszych reakcji oksydacji białek zalicza się nitrowanie

reszt aminokwasów cyklicznych, utlenianie grup tiolowych (-SH), utlenianie reszt cysteiny i metioniny, tworzenie pochodnych karbonylowych niektórych aminokwasów, fragmentację łańcucha polipeptydowego, powstawanie wiązań krzyżowych, tworzenie wodoroadtlenków białek oraz przyłączanie grupy hydroksylowej do aminokwasów cyklicznych i alifatycznych (PONCZEK i WACHOWICZ 2005).

Wpływ stresu oksydacyjnego na organizm ocenia się głównie na podstawie powstających substancji oraz uszkodzeń w komórkach. Markery białkowe należą do najlepszych, ponieważ białka występują w każdej komórce, a produkty ich utleniania są stosunkowo trwałe i łatwe do analizy, nawet przy wykorzystaniu prostych metod laboratoryjnych. Dodatkowo, utlenianie białek najczęściej wiąże się z utratą lub zmianą ich funkcji. Badając uszkodzenia białek możemy ustalić jaki czynnik wywołał zmiany, ponieważ każdy z nich powoduje powstanie specyficznej modyfikacji. Zmodyfikowane białka gromadzone są w organizmie, co umożliwia ich analizę i określenie stopnia narażenia na wiele schorzeń. Wśród najważniejszych biomarkerów wykorzystywanych w ocenie oksydacyjnych uszkodzeń białek wymienia się pochodne karbonylowe, 3-nitrotyrozinę, S-nitrotriazole, kynureninę, 3-chlorotyrozinę, bromotyrozinę, sulfofenek metioniny, dityrozinę, oksohistydinę oraz tzw. zaawansowane produkty oksydacji białek (SHACTER 2000).

GRUPY KARBONYLOWE

Grupy karbonylowe (aldehydowe lub ketonowe) przyłączają się do bocznych łańcuchów białka. Powstające związki są bardzo trwałe, co umożliwia ich analizę. Gromadzące się w organizmie trwałe pochodne karbonylowe uszkodzonych białek, są cennymi markerami, pozwalającymi na określenie stopnia nasilenia procesów utleniania białek (DALLE-DONNE i współaut. 2005). Pochodne karbonylowe powstają najczęściej wskutek utleniania reszt aminokwasów, zwłaszcza proliny, argininy, lizyny i treoniny. Niekiedy ich synteza możliwa jest również wskutek rozszczepienia łańcucha peptydowego, alfa-amidacji lub utleniania prowadzącego do powstania grup alfa-ketoacylowych na N-końcu białka (DALLE-DONNE i współaut. 2003). Karbonylacja białek zachodzi również w reakcjach z produktami peroksydacji lipidów, takimi jak: dialdehyd malonowy, akroleina (2-propenal) i 4-hydroksynonenal, oraz w efekcie glikozydacji, tj. reakcji grupy aminowej lizyny z cukrami redukującymi lub produktami ich utleniania. Powstałe w wyniku tych reakcji grupy karbonylowe mogą reagować z grupami aminowymi lizyny, tworząc wiązania krzyżowe w obrębie danego

białka i pomiędzy cząsteczkami różnych białek (DALLE-DONNE i współaut. 2005).

Ponieważ pochodne karbonylowe są stosunkowo trwałe, ich analiza jest łatwiejsza niż w przypadku analizy innych modyfikacji białek wywołanych przez stres oksydacyjny. Dotychczas opisane metody oznaczania pochodnych karbonylowych opierają się przede wszystkim na reakcji badanych związków z DNPH (2,4-dinitrofenylohydrazyna) i powstaniu DNP (2,4-dinitrofenyl), które dają się łatwo wykryć przy pomocy technik spektrometrycznych (DALLE-DONNE i współaut. 2003). Pochodne karbonylowe można oznaczać na płytkach ELISA metodami immunohistochemicznymi i immunoenzymatycznymi z wykorzystaniem odpowiednich dla metody przeciwciał (SHACTER 2000).

3-Nitrotyrozyna

Proces nitrowania tyrozyny cechuje niska wydajność, gdzie zaledwie 1–5 reszt na 10.000, ulega reakcji. Jednym z najważniejszych czynników przyczyniających się do powstania 3-nitrotyrozyny jest nadtlenoazotyn. Związek ten powstaje w wyniku reakcji tlenu azotu i anionorodnika ponadtlenkowego. Zdolności nitrujące wykazuje także chlorek nitrylu (NO_2Cl). Stąd też nitrotyrozyna uważana jest za marker stresu nitrozacyjnego wynikającego z aktywności reaktywnych form azotu. Uszkodzone w ten sposób białka lokalizują się głównie w miejscach gromadzenia się lub powstawania cząsteczek nitrujących. Nasilenie procesów nitracyjnych towarzyszy szczególnie często chorobom związanym neurodegeneracyjnym, a także procesom apoptozy czy starzenia komórkowego (SZUBA i WOJTASZEK 2010).

Aminokwas tyrozyna występuje w wielu białkach enzymatycznych, zatem nitrowanie reszt tyrozynowych powoduje zahamowanie pełnionych przez nie funkcji (KOŁODZIEJCZYK 2010). Nitracja najczęściej zachodzi w części hydrofilowej białka. Istotne znaczenie w tym przypadku ma również struktura białka, obecność aminokwasów kwaśnych, a także stężenie CO_2 i pH. 3-Nitrotyrozyna jest modyfikacją stosunkowo trwałą, zachodzącą w szerokim zakresie temperatury i pH. Białka zawierające zmodyfikowane reszty tyrozyny mogą ulegać agregacji lub degradacji. Ostatnie badania wskazują na występowanie w organizmie ludzi i zwierząt mechanizmów odpowiedzialnych za denitrację 3-nitrotyrozyny, powiązane m.in. z działaniem wybranych enzymów obrony antyoksydacyjnej, np. peroksydazy glutationowej (SZUBA i WOJTASZEK 2010).

Najbardziej powszechnymi sposobami wykrywania 3-nitrotyrozyny są czułe metody immunoenzymatyczne (ELISA), które wykorzystują przeciwciała anty-nitrotyrozynowe. Nie-

kiedy stosuje się także chromatografię cieczo-
wą do identyfikacji modyfikowanych białek
lub gazowej do analizy wolnej 3-nitrotyrozyny
(KOŁODZIEJCZYK 2010). Po rozdziale chro-
matograficznym mieszaniny białek, otrzy-
maną próbę analizuje się najczęściej za pomocą
tandemowej spektrometrii mas. Najnowszą
techniką stosowaną w analizie zawartości
3-nitrotyrozyny jest jednak znakowanie nitro-
wanych miejsc przy pomocy chlorku dansylu
lub biotyny, które umożliwiają wykrycie mo-
dyfikacji w mieszaninach złożonych z wielu
białek. Metoda ta opiera się na bezpośredniej
identyfikacji znakowanych, a następnie stra-
wionych peptydów przy pomocy spektrometrii
mas. Zmodyfikowane białka rozpoznaje się
na podstawie porównania jonu prekursoro-
wego oraz analizy MS³ i obserwacji produk-
tów fragmentacji właściwych dla dansylu lub
biotyny. Niewątpliwą zaletą tej metody, wy-
różniającą ją na tle innych dotychczas sto-
sowanych technik wykrywania nitrotyrozyny,
jest jej wysoka czułość. Dansylowe pochodne
aminokwasów, wykazujące silną fluorescencję
w świetle nadfioletowym, można bowiem
wykryć już w ilościach rzędu 10⁻¹⁰-10⁻⁹ mola
(SZUBA i WOJTASZEK 2010).

S-nitrozotiole

S-nitrotriazole powstają w wyniku stre-
su nitrozacyjnego. Kation NO⁺ przyłącza się
do reszty aminokwasu, który posiada grupę
tiolową -SH. Tworzenie S-nitrozotiole zachodzi
z dużą szybkością, zawsze w określonym
miejscu białka, przy konkretnym aminokwa-
sie zawierającym siarkę, otoczonym amino-
kwasami kwaśnymi (WŁODEK i ICIEK 2003).
S-nitrozotiole, np. S-nitrozoglutation czy S-ni-
trozocysteina, i nitrozobiałka mają zdolność
przenoszenia grupy NO. Mogą one uwalniać
w warunkach fizjologicznych jony NO⁺ i NO⁻.
Umożliwia to zachodzenie transnitrozyla-
cji, czyli nitrozylacji kolejnej grupy -SH oraz
zmiany funkcji białka (SZUBA i WOJTASZEK
2010).

S-nitrozylacja pełni ważną funkcję w or-
ganizmie, bowiem dotyczy wielu białek bio-
rących udział w reakcjach enzymatycznych
metabolizmu podstawowego, metabolizmu
siarki, glikolizy, a także w białkach pełni-
ących w komórkach funkcje strukturalne. W
zależności od tego jakie aminokwasy otacza-
ją resztę zawierającą grupę -SH, nitrozyla-
cja może kończyć się powstaniem stabilnych
nitrozotiole białek lub zachodzić dalej, skut-
kując powstaniem m.in. disiarczku białka i
reszty nitroksylowej (WŁODEK i ICIEK 2003).

S-nitrozotiole są stosunkowo trwałe, jed-
nak w organizmach żywych obecne są enzy-
my odpowiedzialne za ich rozkład. Głównym
nitrozotiolem wytwarzanym w ustroju jest S-
nitrozoglutation, a enzymem rozkładającym

go jest reduktaza nitrozo glutationowa (SZU-
BA i WOJTASZEK 2010).

Wykrywanie S-nitrozotiole i określanie ich
stężenia w badanym materiale jest stosunko-
wo łatwe. Z powodzeniem sprawdzają się tu-
taj zarówno proste metody spektrometryczne,
jak i bardziej skomplikowane techniki chro-
matograficzne i immunochemiczne, umożli-
wiające wykrycie zmienionych białek (SZUBA
i WOJTASZEK 2010). Do wykrywania S-nitrozo-
tiole przydatna okazuje się także spektrome-
tria mas, bowiem reszta NO powoduje zmianę
masy peptydu, a to z kolei wiąże się z różni-
cą w widmie masowym białek natywnych w
stosunku do ich zmodyfikowanych odpowied-
ników (DALLE-DONNE i współaut. 2005).

Kynurenina

Rodnik tryptofanowy, reagując z nadtlene-
kami lub tlenem cząsteczkowym, sprzyja po-
wstawaniu wodoronadtlenków, które w odpo-
wiednich warunkach mogą przekształcać się
w N-formylokynureninę (NFK) i kynureninę.
Związki te wykorzystuje się jako biomarkery
uszkodzeń białek, w skład których wchodzi
reszty tryptofanu (EHRENSHAFT i współaut.
2015).

Ze względu na fakt, że rodniki hydrokso-
lowe mogą atakować pierścien aromatyczny,
podczas utleniania tryptofanu dochodzi do
powstania pochodnych hydroksylowych oraz
pierścienia pirolowego, a następnie utworze-
nia N-formylokynureniny oraz kynureniny.
Zmiany w strukturze tryptofanu mogą pro-
wadzić do utraty funkcji białek (EHRENSHAFT
i współaut. 2015).

Tryptofan z powodzeniem wykrywany jest
za pomocą zmiany fluorescencji. Produk-
ty jego utleniania: kynurenina i N-formylo-
kynurenina, pochłaniają co prawda krótsze
fale świetlne, jednak niemożliwe jest ich
wzajemne rozróżnienie (EHRENSHAFT i współ-
aut. 2015). W związku z tym, w celu ich
oznaczenia stosuje się jedną z technik spek-
troskopii mas (jonizacja przez rozpylanie w
polu elektrycznym; ang. electrospray ioniza-
tion, ESI), która umożliwia wykrywanie przy-
rostu masy adduktów (DALLE-DONNE i współ-
aut. 2005). Połączenie spektrometrii mas
z chromatografią cieczo-
wą umożliwia także
określenie miejsca utlenienia, jeśli takich
modyfikacji w białku jest niewiele. Obecność
N-formylokynureniny można również wykryć
metodami immunodetekcji z użyciem prze-
ciwciał (EHRENSHAFT i współaut. 2015).

3-Chlorotyrozyna

W wyniku działania kwasu podchlora-
wego w organizmie powstają 3-chlorotyrozyna i
3,5-dichlorotyrozyna. Kwas podchlora-
wy jest produkowany przez neutrofile i monocyty
podczas obrony organizmu przed bakteria-

mi. Powstaje w reakcji nadtlenu wodoru z chlorem, katalizowanej przez mieloperoksydazę. Chlorotyrozyna powstaje *in vivo* jedynie pod wpływem kwasu podchlorawego, dlatego jest najlepszym markerem modyfikacji białek wywoływanych przez ten kwas (CHAPMAN i współaut. 2000).

Do najczęściej stosowanych metod detekcji 3-chlorotyrozyny zalicza się chromatografię gazową (GC), chromatografię cieczową (LC) i wysokosprawną chromatografię cieczową. Niekiedy metody chromatograficzne łączone są z analizami spektrometrycznymi. Podobnie jak w technice ESI/MS, pochodne tyrozyny poddawane są jonizacji, ułatwiającej późniejszy rozdział w spektrometrze, w którym są dzielone ze względu na masę i ładunek (GAUT i współaut. 2002).

Bromotyrozyna

Bromotyrozyna powstaje w organizmie w wyniku działania silnego utleniacza, kwasu bromawego, na tyrozinę. Kwas bromawy jest syntetyzowany w katalizowanej przez mieloperoksydazę reakcji nadtlenu wodoru z jonami bromku. Powstaje w organizmie w celu obrony przed patogenami, jednak w ostatnich badaniach stwierdzono dużą rolę tego związku w tworzeniu uszkodzeń komórkowych. Zniszczenia wywołane obecnością kwasu bromawego dotyczą głównie białek, lipidów, węglowodanów, DNA i aminokwasów (PATTISON i DAVIES 2004). Modyfikacje białek indukowane przez kwas bromawy obserwowane są w takich schorzeniach jak: reakcje alergiczne, infekcje (głównie pasożytnicze), astma i procesy nowotworzenia (WU i współaut. 1999).

Bromotyrozinę wykrywa się metodami podobnymi, jak detekcji chlorotyrozyny. Zaliczamy do nich różne rodzaje chromatografii: cieczową, wysokosprawną cieczową i gazową, zwykle w połączeniu ze spektrometrią mas (DALLE-DONNE i współaut. 2005).

Sulfotlenek metioniny

Reaktywne formy tlenu powodują przekształcanie reszt metioniny w sulfotlenek metioniny lub pochodne sulfonu metioninowego (STADTMAN i LEVINE 2003). Reszty metioniny są łatwo utleniane i często znajdują się w pobliżu miejsc aktywnych enzymów, chroniąc je przed szkodliwym działaniem stresu oksydacyjnego. Dzięki temu, że są utleniane w pierwszej kolejności, chronią inne aminokwasy struktury białka przed utlenieniem i utratą funkcji (SOCHASKI i współaut. 2001). Sulfotlenek metioniny powstaje także w reakcji nadtlenu wodoru z alkilowodoronadtlenkami. Utleniona metionina jest jednym z markerów stresu oksydacyjnego. Jednak ze względu na obecność w

organizmie reductaz naprawiających uszkodzenia białek oraz brak przeciwciał mogących wykryć sulfotlenek metioniny, jej detekcja jest dosyć trudna (SHACTER 2000).

Pomiaru sulfotlenku metioniny w próbkach *in vitro* dokonuje się przez rozszczepienie białek bromocyanem (SHACTER 2000) i analizę przy pomocy HPLC. Nową techniką w badaniu sulfotlenków metioniny jest hydroliza próbek za pomocą kwasu metanosulfonowego (MSA). Technika ta polega na umieszczeniu próbek na kationowymiennej kolumnie, umożliwiającej oddzielenie MSA z aminokwasów, oraz rozdział aminokwasów metodą jonowej chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią mas (SOCHASKI i współaut. 2001).

Dityrozyna

W warunkach stresu oksydacyjnego dochodzi do utleniania całego łańcucha białkowego lub wybranych reszt aminokwasowych, które to z kolei mogą się ze sobą łączyć kowalencyjnymi wiązaniami krzyżowymi. W taki sposób tworzy się dityrozyna, powstająca z dwóch reszt tyrozynowych (STADTMAN i LEVINE 2003). Poza stresem oksydacyjnym, źródłem dityrozyny może być promieniowanie UV, proces starzenia, wodoronadtlenki lipidów, a także peroksydazy (GIULIVI i współaut. 2003).

Dityrozinę powszechnie wykrywa się za pomocą analizy HPLC z użyciem diod UV lub znaczników fluorescencyjnych. (GIULIVI i współaut. 2003).

Oksohistydyna

Histydyna jest jednym z aminokwasów narażonych na utlenianie w reakcjach z metalami, co daje możliwość oceny stresu oksydacyjnego spowodowanego obecnością metali (UCHIDA i KAWAKISHI 1993). Głównym produktem utleniania histydyny jest 2-oksohistydyna, jednak jej otrzymywanie w warunkach *in vitro* jest utrudnione. W reakcji z niektórymi metalami, np. jonami miedzi i cynku, oraz w obecności nadtlenu wodoru histydyna przekształca się w oksohistydynę. Natomiast jednoczesna reakcja histydyny z jonami Cu^{2+} i H_2O_2 powoduje powstanie asparaginy i kwasu asparaginowego, tak więc, aby otrzymać w tej reakcji oksohistydynę wymagana jest obecność askorbinianu (SCHÖNEICH 2000). Cu i askorbinian wstępując razem, stanowią systemem generujący syntezę wolnych rodników. Po dodaniu askorbinianu następuje nasilenie syntezy wolnych rodników, pomijany jest etap powstawania kwasu asparaginowego i asparaginy, a histydyna utleniania jest do oksohistydyny.

Analiza asparaginy jako markera zmodyfikowanych białek nie jest możliwa, ponie-

waż po hydrolizie kwasowej jest wykrywana jako asparaginian. Dlatego też markerem utleniania histydyny jest jedynie oksohistydyna (UCHIDA i KAWAKISHI 1993). Kwas asparaginowy jako aminokwas oraz jego amid, asparagina, są naturalnymi składnikami białek. W momencie gdy histydyna utlenia się do kwasu asparaginowego, jego wykrycie może zostać zinterpretowane, że stanowi on fizjologiczny element białka, a nie jest markerem jego oksydacji, co z kolei może zaniżyć faktyczny poziom oksydacyjnych uszkodzeń histydyny. Stąd też markerem utleniania histydyny może być tylko 2-oksohistydyna, która fizjologicznie w białku występować nie powinna.

2-oksohistydyna może być wykrywana za pomocą tradycyjnych metod analizy aminokwasów oraz metod spektrometrycznych, np. techniką MALDI (ang. matrix-assisted laser desorption/ionization), łączącą jonizację próbki z późniejszą analizą jej masy w spektrometrze. Do identyfikacji wykorzystuje się także metodę ESI (DALLE-DONNE i współaut. 2005). Oksohistydynę można wykryć także przy pomocy metody chromatografii cieczowej w połączeniu ze spektroskopią mas (ang. liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) oraz spektroskopii magnetycznego rezonansu jądowego (ang. nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR). Obecnie brak jest jednak metod specyficznych dla oksohistydyny; w dalszym ciągu trwają badania nad przeciwciałami i białkami pozwalającymi wykrywać addukty histydyny (HUANG i współaut. 2015).

Zaawansowane produkty utleniania białek

Zaawansowane produkty utleniania białek (AOPP) stanowią agregaty, fragmenty lub pochodne oksydacyjnie zmienionej albuminy, fibrynogenu lub lipoprotein. Pod względem struktury i właściwości biologicznych są podobne do zaawansowanych produktów glikacji białek (AGE), są wiązane przez ten sam receptor i wywołują te same choroby. AOPP powstają pod wpływem stresu oksydacyjnego wywoływanego głównie przez reaktywne formy tlenu. Ich budowa nie jest do końca poznana. Wiadomo, że cząsteczki AOPP zawierają dityrozynę, grupy karbonylowe, a także zmodyfikowane reszty tyrozyny, tryptofanu, lizyny, argininy i aminokwasów zawierających siarkę. Występują one u osób zdrowych, jednak w dużo niższych ilościach niż u osób chorych czy starszych, bowiem ich ilość wzrasta z wiekiem (PIWOWAR 2000).

AOPP można wykryć przy użyciu wielu metod spektrofotometrycznych i chromatograficznych, które pozwalają także określić dokładne ich stężenie. Dzięki temu są one wiarygodnymi markerami utleniania białek

w organizmach. Istnieją także gotowe testy umożliwiające ocenę stężenia AOPP w osoczu, surowicy krwi, moczu, płynie mózgowo-rdzeniowym, a także w lizatach i homogenatach tkankowych (PIWOWAR 2000).

Dostępna literatura wskazuje, iż największe znaczenie w ocenie oksydacyjnego uszkodzenia białek wykazują trwałe i proste do oznaczenia pochodne karbonylowe, 3-nitrotyrozyna i AOPP. To właśnie te modyfikacje białkowe najczęściej oznacza się u zwierząt laboratoryjnych narażonych na działanie czynników oksydacyjnych (ÓNODY i współaut. 2003, DOĞRU-ABBASOĞLU i współaut. 2007, PATEL i KALIA 2010, AMARA i współaut. 2011, AZEVEDO i współaut. 2015).

WPLYW CZYNNIKÓW INDUKUJĄCYCH STRES OKSYDACYJNY U ZWIERZĄT LABORATORYJNYCH NA ZAWARTOŚĆ GRUP KARBONYLOWYCH W MATERIALE BIOLOGICZNYM

W badaniach nad wpływem cynku na ilość pochodnych karbonylowych, jego niedobór, a także restrykcje kaloryczne powodowały wzrost stężenia uszkodzonych białek. Cynk zaangażowany jest w procesy związane z obroną antyoksydacyjną organizmu. Wchodzi w skład cytoplazmatycznej dysmutazy ponadtlenkowej (enzymu, który jest przeciwutleniaczem) i metalotionein (białek bogatych w reszty cysteinowych pełniące funkcje ochronne przed wolnymi rodnikami). Dlatego niedobór cynku przyczynia się do wzrostu oksydacyjnych uszkodzeń składników komórek (OTEIZA i współaut. 1995).

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że procesy starzenia organizmu przyczyniają się do wzrostu zawartości pochodnych karbonylowych (PC) u szczurów. Obserwuje się bowiem istotną różnicę w ilości tych modyfikacji u zwierząt starszych i młodych. Czyni to pochodne karbonylowe wczesnymi markerami starzenia się i pozwala na dokonanie ogólnej oceny oksydacyjnych uszkodzeń białek (CAKATAY i współaut. 2003).

Przewlekłe spożywanie etanolu także powoduje wzrost zawartości pochodnych karbonylowych, zarówno w mitochondriach (o 0,39 ng/mg białek), jak i w cytozolu (o 0,17 ng/mg białek). Wolne rodniki z rozkładu etanolu powstają w mitochondriach, skąd dyfundują do cytoplazmy. Może to powodować większy wzrost uszkodzonych oksydacyjnie białek w mitochondriach. Dodatkowo, w cytoplazmie komórek wątroby występuje enzym katalaza, rozkładający H_2O_2 , którego brak w mitochondriach wątroby. Obecność tego enzymu może stanowić dodatkową ochronę dla białek cytoplazmy (BAILEY i współaut. 2001).

Co ciekawe, ograniczenie podaży białka w diecie powoduje zmniejszenie akumulacji uszkodzonych białek w wyniku stresu oksydacyjnego wywołanego napromieniowaniem. Podobne efekty uzyskiwane są w wyniku diet z restrykcją kaloryczną. Badania te potwierdzają teorię, według której zmniejszenie spożycia białka nasila mechanizmy antyoksydacyjne, powoduje wzrost poziomu dysmutazy ponadtlenkowej oraz katalazy w mięśniach i wątrobie (YOUNGMAN i współaut. 1992).

Arszenik powoduje wzrost pochodnych karbonylowych oraz zaawansowanych produktów utleniania białek, ponieważ indukuje stres oksydacyjny w organizmie. Przyczynia się także do zmniejszenia ilości glutationu. W grupie kontrolnej jego ilość w 100 g tkanek wynosiła $29,87 \pm 1,86$ mg, natomiast po podaniu arszeniku zmniejszyła się do $18,14 \pm 1,93$ mg. Arszenik powoduje więc osłabienie mechanizmów obronnych przed wolnymi rodnikami (PATEL i KALIA 2010).

Dimetoat jest insektycydem stosowanym do ochrony upraw roślinnych, a podawany szczurom z wodą powodował powstawanie w mózgu reaktywnych form tlenu, uszkadzających białka. Jednak suplementacja diety selenem, który zapobiega chorobom mózgu, a także witaminą E, będącą antyoksydantem, zmniejsza ilość uszkodzeń. Niektóre szczury oprócz dimetoatu otrzymywały codzienne selen ($0,5$ mg/kg pożywienia) lub witaminę E (100 mg/kg pożywienia), natomiast trzecia grupa otrzymywała selen i witaminę E. U szczurów, którym podawano dimetoat, ilość pochodnych karbonylowych wynosiła $42,907 \pm 5,560$ $\mu\text{mol/mg}$ białek, w grupie otrzymującej dodatkowo selen $21,909 \pm 4,573$ lub witaminę E $26,206 \pm 3,043$, a w grupie otrzymującej obydwie substancje $18,579 \pm 3,472$. Wyniki te świadczą o ochronnym działaniu witaminy E i selenu na tkanki mózgu, nawet w przypadku dostarczania substancji toksycznych (AMARA i współaut. 2011) (Tabela 1).

WPLYW CZYNNIKÓW INDUKUJĄCYCH STRES OKSYDACYJNY U ZWIERZĄT NA ZAWARTOŚĆ 3-NITROTYROZINY W MATERIALE BIOLOGICZNYM

Zawartość 3-nitrotyrozyny u myszy po podaniu paracetamolu rośnie po dwóch i czterech godzinach, natomiast po ośmiu godzinach ilość uszkodzonych białek zmniejsza się (ISHII i współaut. 2006).

Starzenie powoduje zwiększenie poziomu 3-nitrotyrozyny zarówno u szczurów młodych, jak i dorosłych, w stosunku do szczurów starszych. Dlatego nitrotyrozyna w mięśniach szkieletowych może być

dobrym markerem uszkodzeń oksydacyjnych powodowanych starzeniem (CAKATAY i współaut. 2003).

Po zakażeniu bakterią *Escherichia coli* w organizmach świnek morskich nastąpił wzrost poziomu NO oraz reaktywnych form azotu (RNS), co doprowadziło do zwiększenia poziomu 3-nitrotyrozyny. Niektórym badanym osobnikom podawano witaminę A w dawce 15000 IU/kg masy ciała przez 7 dni przed zakażeniem. W grupie tej nie wykryto nitrotyrozyny (TÜRKÖZKAN i współaut. 2005). Oznacza to, że witamina A hamuje indukcję nitrotyrozyny i chroni komórki przed uszkodzeniami. Nie jest pewne, czy witamina A hamuje tworzenie RNS, czy raczej dochodzi do powstania RNS, które są bardzo szybko neutralizowane przez witaminę A (drobnocząsteczkowy antyoksydant).

Narażenie myszy na benzen podnosi poziom nitrowania reszt tyrozyny, jednak tylko do dawki ok. 200 mg/kg masy ciała. Przy 400 mg poziom uszkodzeń maleje. Może być to związane z mniejszą pulą powstających wolnych rodników lub nasyceniem metabolizmu benzenu (CHEN i współaut. 2005).

Lipopolisachardy (LPS) powoduje w organizmie stan prooksydacyjny, zwłaszcza u szczurów z marskością wątroby. W omawianym badaniu, u wszystkich grup szczurów oznaczono poziom przeciwutleniającej oksygenazy hemowej (HO-1), enzymu, który rozkłada hem. Najniższy poziom tego enzymu odnotowano u szczurów z marskością, a najwyższy u szczurów z marskością, którym podawano LPS. U zdrowych osobników poziom HO-1 był również wyższy, zwłaszcza u tych, którym podano LPS. Wyniki badań wskazują na zwiększenie stresu oksydacyjnego u szczurów z marskością przyjmujących LPS oraz dużo wyższe stężenie HO-1, które może być mechanizmem obronnym przed wolnymi rodnikami (DOĞRU-ABBASOĞLU i współaut. 2007).

Niedobór apolipoproteiny E powoduje hipercholesterolemię oraz podwyższenie poziomu lipoprotein o niskiej i pośredniej gęstości. Przyczynia się do wzrostu reaktywnych form tlenu i azotu, a tym samym do znacznego wzrostu ilości 3-nitrotyrozyny w tkance nerwowej badanych myszy (MATTHEWS i BEAL 1996). Wpływ hipercholesterolemii na uszkodzenia białek wskazują również badania wykonane na szczurach. Hiperlipidemia indukowana była wysoką zawartością cholesterolu w diecie. Uzyskane wyniki świadczą o zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu w układzie naczyniowym, przyczyniających się do zwiększenia stresu oksydacyjnego i uszkodzeń białek (ÓNODY i współaut. 2003) (Tabela 2).

Tabela 1. Wpływ czynników indukujących stres oksydacyjny u zwierząt laboratoryjnych na zawartość grup karbonylowych w materiale biologicznym.

| Gatunek zwierzęcia | Czynnik indukujący utlenianie białek | Dawka/czas aplikacji/ droga podania | Zawartość grup karbonylowych (PC) | | Literatura |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------------|
| | | | Grupa kontrolna (ng/mg białka) | Grupa doświadczalna (ng/mg białka) | |
| Szczur Sprague-Dawley | Niedobór cynku | Szczury podzielono na trzy grupy, z których pierwsza (grupa kontrolna) miała dostęp do pożywienia oraz dzienną dawkę cynku w wysokości 25 µg na gram masy ciała, druga i trzecia grupa miały zmniejszoną dawkę cynku do 0,5 µg/g, dodatkowo trzecia grupa miała kontrolowany dostęp do pożywienia. | 25 µg/g Zn i stały dostęp do pożywienia 2,4±0,2 | 5 µg/g Zn 3,6±0,2 | OTEIZA i współaut. 1995 |
| | | | | 5 µg/g Zn i restrykcje kaloryczne 3,5±0,3 | |
| Szczur Wistar | Starzenie | W badaniu wykorzystano próbki mięśni pochodzące od szczurów karmionych standardową dietą w wieku 5 miesięcy (grupa kontrolna), 13 i 24 miesięcy (grupy doświadczalne). | Szczury w wieku 5 miesięcy 0,16 (0,13-0,25) | Szczury w wieku 13 miesięcy 0,17 (0,12-0,25) | CAKATAY i współaut. 2003 |
| | | | | Szczury w wieku 24 miesięcy 0,24 (0,15-0,38) | |
| Szczur Sprague-Dawley | Etanol | Szczurom o masie 431-432 g podawano 12 g etanolu/kg masy ciała codziennie przez 3 tygodnie w płynnej diecie. | Mitochondria 0,65±0,05 | 1,04±0,05 | BAILEY i współaut. 2001 |
| | | | Cytozol 0,58±0,05 | 0,75±0,05 | |
| Szczur Fisher 344 | Promieniowanie Napromieniowywanie szczurów z 20% zawartością białka w diecie. | Szczury o masie 40-60 g podzielono na grupy z których jedna odżywiania była pokarmem z 5%, a druga z 20% (normalną) zawartością białka. Następnie napromieniowywano je dwa razy w tygodniu przez 3 tygodnie dawką 0,01 Gy w czasie każdej ekspozycji. | 5% białka w diecie 1,90±0,03 | 2,37±0,03 | YOUNGMAN i współaut. 1992 |
| | | | 20% białka w diecie 2,20±0,03 | 3,67±0,16 | |
| Szczur Wistar | Arszenik | Szczurom o masie 110-120 g podawano codziennie przez 30 dni 5,5 mg arszeniku na kg masy ciała. | 1,33±0,058 | 2,68±0,33 | PATEL i KALIA 2009 |
| Szczur Wistar | Dimetoat (środek insektybójczy) | Szczury o masie 160-170 g przez 30 dni piły wodę ze środkiem insektybójczym w ilości 0,2 g na litr wody. Natomiast osobniki z grupy kontrolnej piły czystą wodę. | 15.312±5.174 | 42.907±5.560 | AMARA i współaut. 2011 |

Tabela 2. Wpływ czynników indukujących stres oksydacyjny u zwierząt na zawartość 3-nitrotyrozyny w materiale biologicznym.

| Gatunek zwierzęcia | Czynnik indukujący utlenianie białek | Dawka/czas aplikacji/droga podania | Zawartość 3-nitrotyrozyny (3-NT) | | Literatura |
|--------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| | | | Grupa kontrolna | Grupa doświadczalna | |
| Mysz B6C3F1 | Paracetamol (APAP) | 6 tygodniowe myszy otrzymano po 300 mg na kg masy ciała paracetamolu w postaci iniekcji apapu. Następnie zbadano poziom 3-NT w komórkach wątroby po upływie 2, 4 i 8 godzin. | 0,20±0,02 pmol/mg białka | 2 godziny 0,26±0,02 pmol/mg białka 4 godziny 0,28±0,02 pmol/mg białka 8 godzin 0,25±0,02 pmol/mg białka | ISHII i współaut. 2006 |
| | | | | | |
| Szczur Wistar | Starzenie | W badaniu wykorzystano próbki mięśni pochodzące od szczurów karmionych standardową dietą w wieku 5 miesięcy (grupa kontrolna), 13 i 24 miesięcy (grupy doświadczalne). | Szczury w wieku 5 miesięcy 0,36 (0,30-0,39) ng/mg białka | Szczury w wieku 13 miesięcy 0,30 (0,27-0,43) ng/mg białka Szczury w wieku 24 miesięcy 0,44 (0,36-0,54) ng/mg białka | CAKATAY i współaut. 2003 |
| Świnka morska | Zakażenie bakterią <i>Escherichia coli</i> | Świnki morskie drogą iniekcji zostały zakażone bakterią <i>E. coli</i> w dawce 12×10^9 jednostek na kg masy ciała. Próbkę tkanek z nerek pobrano po 8 dniach od zakażenia. Grupę kontrolną stanowiły osobniki nie zakażone. | Nie wykrywalna | 4,91±0,91 ng/mg białka | TÜRKÖZKAN i współaut. 2005 |
| Mysz B6C3F1 | Benzen | Myszy podzielono na 6 grup. Czterem grupom podano benzen w różnych dawkach w formie iniekcji z olejem kukurydzianym. Grupy 5 i 6 były grupami kontrolnymi. Jednej z nich podano sam olej natomiast drugiej nie podawano nic. Próby do badań pobrano ze szpiku kostnego. | Iniekcje z oleju 1,77 ng/mg białka | 50 mg benzenu na kg masy ciała. 2,42±0,30 ng/mg białka 100 mg benzenu na kg masy ciała. 4,74±1,09 ng/mg białka | CHEN i współaut. 2005) |
| | | | Brak iniekcji. 1,46 ng/mg białka | 200 mg benzenu na kg masy ciała. 6,90±0,98 ng/mg białka 400 mg benzenu na kg masy ciała 4,15±0,81 ng/mg białka | |

| | | | | | |
|---------------|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------|
| Szczur Wistar | Marskość wątroby | Szczury podzielono na 4 grupy. 1 grupa to próba kontrolna. Szczury z 2 grupy dostały w postaci iniekcji lipopolisacharyd(LPS) <i>E. coli</i> w dawce 5-mg/kg masy ciała. Szczury z grup 3 i 4 dostawały wraz z wodą codziennie przez 3 miesiące ok. 10mg tioacetoamidu w celu wywołania marskości wątroby. Dodatkowo szczury z grupy 4 dostawały lipopolisacharydy w takiej samej dawce jak osobniki z grupy 2. Próbkę osocza pobrano 6 godzin po podaniu LPS. | 6,05 nmol/L | Grupa 2 z LPS 6,07 nmol/L | DOĞRU-ABBASOĞLU i współaut. 2007 |
| | | | | Grupa 3 z marskością 6,5 nmol/L | |
| | | | | Grupa 4 z marskością i LPS 8,2 nmol/L | |
| Mysz C57 | Niedobór apolipoproteiny E | Grupę kontrolną stanowiły myszy laboratoryjne z prawidłowym poziomem apolipoproteiny- E (Apo-E) Myszy z niedoborem Apo-E otrzymano w wyniku zmian genetycznych w komórkach macierzystych embrionalnych myszy. Po 60 dniach od narodzin myszy uśmiercono i pobrano tkanki mózgu, zestawiono wyniki, a następnie porównano wszystkie próbki. | 18,2±1,1 *1000/ tyrozyna | 25,6±1,3 *1000/tyrozyna | MATTHEWS i BEAL 1996 |
| | Indukowana hiperlipidemia | Szczury podzielono na dwie grupy. Grupę kontrolną przez 8 tygodni karmiono standardową karmą, natomiast doświadczalną karmą wzbogaconą w 2% cholesterolu. Szczurom dwa razy przed pobraniem tkanek (24h i 1h) podano dootrzewnowo po 20 µmol/kg FeTPPS katalizatora rozkładu ONOO ⁻ . | 18 nmol/L | 31 nmol/L | ÓNODY i współaut. 2003 |
| Szczur Wistar | | | | | |

WPLYW CZYNNIKÓW INDUKUJĄCYCH STRES OKSYDACYJNY U ZWIERZĄT LABORATORYJNYCH NA ZAWARTOŚĆ OKSYDACYJNIE ZMIENIONEJ ALBUMINY W MATERIALE BIOLOGICZNYM

Wszystkie badane zakażenia u szczurów powodują wzrost zaawansowanych produktów utleniania białek. Zakażenie pierwotniakiem *Blastocystis hominis* powoduje wzrost

oksydacyjnie zmienionej albuminy (AOPP) zarówno we krwi, jak i w moczu badanych szczurów. Dzięki temu markery uszkodzeń można łatwiej wykrywać ze względu na łatwość pozyskanie moczu od badanych szczurów (CHANDRAMATHI i współaut. 2009). U szczurów zainfekowanych drożdżakiem *Cryptococcus neoformans* poziom AOPP rośnie zarówno 10 dni po zakażeniu, jak i 20 dni później. Wzrost ten może być związany

Tabela 3. Wpływ czynników indukujących stres oksydacyjny u zwierząt laboratoryjnych na zawartość AOPP (oksydacyjnie zmienionej albuminy) w materiale biologicznym.

| Gatunek zwierzęcia | Czynnik indukujący utlenianie białek | Dawka/czas aplikacji/droga podania | Zawartość zaawansowanych produktów oksydacji białek (AOPP) | | Literatura |
|-----------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| | | | Grupa kontrolna | Grupa doświadczalna | |
| Świnia morską | Naświetlanie dawką 15 Gy | Świnie morskie zostały naświetlone pojedynczą dawką promieniowania o wartości 8 oraz 15 Gy. Grupę kontrolną stanowiły osobniki nie naświetlane. | 56,0±27,18 μmol/L | 8 Gy 59,65±18,64 μmol/L | (GÜNEY i współaut. 2006) |
| | | | | 15 Gy 97,97±37,53 μmol/L | |
| Szczur Wistar | Arszenik | Szczurom o masie 110-120 g podawano codziennie przez 30 dni 5,5 mg arszeniku na kg masy ciała. | 0,21±0,011 nmol/mg białka | 0,29±0,032 nmol/mg białka | PATEL i KALIA 2009) |
| Szczur Sprague-Dawley | Zakażenie <i>Blasotocystis hominis</i> | Od zakażonych szczurów pobierano codziennie przez 30 dni mocz i krew, oznaczano w nich poziom AOPP, a następnie zestawiono wyniki. | Krew | | CHANDRAMATHI i współaut. 2009 |
| | | | 195±0,05 μmol/L | 250±0,05 μmol/L | |
| Szczur Wistar | Infekcja <i>Cryptococcus neoformans</i> | Szczyry zainfekowano drożdżami <i>Cryptococcus neoformans</i> . Przed zakażeniem oraz w jednej z grup po 10 dniach, a w drugiej po 30 dniach od zakażenia oznaczono poziom AOPP w próbkach krwi. | Grupa I | | AZEVEDO i współaut. 2015 |
| | | | Przed zakażeniem | 10 dni po zakażeniu | |
| | | | 60,5±0,01 nmol/L | 70±0,01 nmol/L | |
| | | | Grupa II | | |
| | | | Przed zakażeniem | 30 dni po zakażeniu | |
| | | | 60±0,01 nmol/L | 83±0,01 nmol/L | |
| Szczur Wistar | Dimetomat (środek insektobójczy) | Szczyry o masie 160-170 g przez 30 dni piły wodę ze środkiem insektobójczym w ilości 0,2 g na litr wody. Natomiast osobniki z grupy kontrolnej piły czystą wodę. | 0,154±0,052 μmol/L | 0,591±0,122 μmol/L | AMARA i współaut. 2011 |

z reakcją zapalną organizmu i zwiększoną syntezą NO. W badaniu oznaczono również poziomy enzymów będących markerami stanu zapalnego: acetylocholinoesterazy (AChE) i butyrylocholinoesterazy (BChE); poziom AChE wzrósł, natomiast BChE spadł. Wyniki te wskazują na wzrost stanu zapalnego, wzmożonej syntezy immunoglobulin i NO (AZEVEDO i współaut. 2015).

Promieniowanie generuje w organizmie reaktywne formy tlenu, powodujące uszkodzenia komórek i procesy kancerogenezy. W badaniu wpływu promieniowania na świni-

ki morskie, wzrost AOPP zależał od dawki promieniowania. Określono również poziom antyoksydantów selenu i witaminy E, które powinny chronić składniki komórek przed utlenianiem. Po 24 godzinach od naświetlania poziom tych związków nie zmienił się. Może to świadczyć o tym, że naświetlanie powoduje wahania poziomów antyoksydantów dopiero po upływie pewnego czasu (GÜNEY i współaut. 2006).

Arszenik, podobnie jak pochodne karbo-nylowe, powodował wzrost AOPP, ze względu

na osłabienie mechanizmów antyoksydacyjnych organizmu (PATEL i KALIA 2010).

Dimetoat powodował znaczący wzrost AOPP w organizmach szczurów. Tak jak w przypadku pochodnych karbonylowych, zmierzono również ilość AOPP w przypadku zatrucia organizmu dimetoatem i dostarczenia antyoksydantów. U osobników, którym podawano jedynie insektycyd, poziom AOPP wynosił $0,591 \pm 0,122$ $\mu\text{mol/mg}$ białka, dodatek selenu obniżał ten poziom do $0,188 \pm 0,034$, natomiast w obecności witaminy E wartość ta wynosiła $0,189 \pm 0,053$. Połączenie obydwu substancji zmniejszało ilość AOPP do $0,155 \pm 0,033$ $\mu\text{mol/mg}$ białka (AMARA i współprac. 2011) (Tabela 3).

PODSUMOWANIE

Stres oksydacyjny powoduje utlenianie w komórkach związków takich jak białka, lipidy i DNA. Do oceny jego nasilenia wykorzystuje się różnorodne biomarkery. Do najtrwalszych należą markery białkowe. Wśród wielu takich wskaźników największym uznaniem cieszą się te, które są specyficzne dla badanej tkanki oraz najprostsze do oznaczenia: 3-nitrotyrozyna (3-NT), zawansowane produkty utleniania białek (AOPP), oraz pochodne karbonylowe (PC). Możliwość wykrywania tych modyfikacji umożliwia ocenę nasilenia stresu oksydacyjnego w organizmie, a także pomaga diagnozować wiele chorób i określać stan ich zaawansowania.

Wyniki badań wskazują, że zawartość biomarkerów oksydacyjnych uszkodzeń białek w ustroju wyraźnie wzrasta w odpowiedzi na stres oksydacyjny, wywołany takimi czynnikami jak niewłaściwa dieta, niedobór mikroelementów, zatrucie substancjami toksycznymi, infekcje czy starzenie się organizmu.

Streszczenie

Przewaga procesów prooksydacyjnych w organizmie skutkuje wystąpieniem stresu oksydacyjnego objawiającego się m.in. utlenianiem białek. Bezpośrednia analiza ilości reaktywnych form tlenu i azotu jest zadaniem bardzo trudnym, dlatego w ocenie nasilenia stresu oksydacyjnego częściej wykorzystuje się markery uszkodzeń, powstające w wyniku reakcji wolnych rodników z białkami. Są one o wiele trwalsze, a przez to łatwiejsze do analizy. Wśród najważniejszych biomarkerów oksydacyjnych uszkodzeń białek wyróżnia się pochodne karbonylowe, 3-nitrotyrozynę, S-nitrotriazole, kynureninę, 3-chlorotyrozynę, bromotyrozynę, sulfotlenek metioniny, dityrozynę, oksohistydynę oraz tzw. zaawansowane produkty oksydacji białek (AOPP).

W ocenie oksydacyjnych uszkodzeń białek u zwierząt laboratoryjnych najlepiej sprawdzają się pochodne karbonylowe, 3-nitrotyrozyna i AOPP. Ich zawartość w ustroju wyraźnie wzrasta w odpowiedzi na stres oksydacyjny wywołany takimi czynnikami, jak: niewłaściwa dieta, niedobór mikroelementów, zatrucie substancjami toksycznymi, infekcje czy starzenie.

LITERATURA

- AMARA I. B., SOUDANI N., HAKIM A., TROUDI A., ZEGHAL K. M., BOUDAWARA T., ZEGHAL N., 2011. *Selenium and vitamin E, natural antioxidants, protect rat cerebral cortex against dimethoate-induced neurotoxicity*. Pesticide Biochem. Physiol. 101, 165-174.
- AZEVEDO M. I., FERREIRO L., DA SILVA A. S., TONIN A. A., THORSTENBERG M. L., CATILHOS L. G., FRANÇA R. T., LEAL D. B. R., DUARTE M. M. M. F., LOPES S. T. A., SANGOI M. B., MORESCO R. N., FIGHERA R., SANTURIO J. M., 2015. *Cholinesterase of rats experimentally infected by Cryptococcus neoformans: Relationship between inflammatory response and pathological findings*. Pathol. Res. Practice 211, 851-857.
- BAILEY S. M., PATEL V. B., YOUNG T. A., ASAYAMA K., CUNNINGHAM C. C., 2001. *Chronic ethanol consumption alters the glutathione/ glutathione peroxidase-1 system and protein oxidation status in rat liver*. Clin. Exp. Res. 25, 726-732.
- ÇAKATAY U., TELCI A., KAYALI R., TEKELI F., AKÇAY T., SIVAS A., 2003. *Relation of aging with oxidative protein damage parameters in the rat skeletal muscle*. Clin. Biochem. 36, 51-55.
- CHANDRAMATHI S., SURESH K., ANITA Z. B., 2009. *Comparative assessment of urinary oxidative indices in breast and colorectal cancer patients*. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 135, 319-323.
- CHAPMAN A. L. P., SENTHILMOHAN R., WINNTERBOURN C. C., KETTLE A. J., 2000. *Comparison of mono- and dichlorinated tyrosines with carbonyls for detection of hypochlorous*. Acid Modif. Prot. 377, 95.
- CHEN K. M., EL-BAYOUMY K., HOSEY J., CUNNINGHAM J., ALIAGA C., MELIKIAN A. A., 2005. *Benzene increases protein-bound 3-nitrotyrosine in bone marrow of B6C3F₁ mice*. Chem.- Biol. Interact. 156, 81-91.
- DALLE-DONNE I., ROSSI R., GIUSTARINI D., MILZANI A., COLOMBO R., 2003. *Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress*. Clin. Chim. Acta 329, 23-28.
- DALLE-DONNE I., SCALONI A., GIUSTARINI D., CAVARRA E., TELL G., LUNGARELLA G., COLOMBO R., ROSSI R., MILZANI A., 2005. *Protein as biomarkers of oxidative/ nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics*. Mass Spectrom. Rev. 24, 55-99.
- DOĞRU-ABBASOĞLU S., PARILDAR-KARPUZOĞLU H., BALKAN J., AYKAÇ-TOKER G., UYSAL M., 2007. *Nitrotyrosine formation and heme oxygenase-1 expression in endotoxemic cirrhotic rats*. Arch. Med. Res. 38, 28-33.
- EHRENSHAFT M., DETERDING L. J., MASON R. P., 2015. *Tripping up Trp: Modification of protein tryptophan residues by reactive oxygen species, modes of detection, and biological consequences*. Free Rad. Med. 89, 220-228.
- GAUT J. P., BYUN J., TRAN H. D., HEINECKE J. W., 2002. *Artifact-free quantification of free 3-chlorotyrosine, 3-bromotyrosine, and 3-nitrotyrosine in human plasma by electron capture-negative chemical ionization gas chromatography mass spectrometry and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Anal. Biochem. 300, 252-259.
- GIULIVI C., TRASETH N. J., DAVIES J. A., 2003. *Tyrosine oxidation products: analysis and biological relevance*. Amino Acids 25, 227-231.
- GRIMSRUD P. A., XIE H., GRIFFIN T. J., BERNLOHR D. A., 2008. *Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes*. J. Biol. Chem. 283, 21837-21841.

- GÜNEY Y., TÜRKÇÜ Ö.Ü., MERTOĞLU Ö., BILGHAN A., HIÇSÖNMEZ A., ANDRIEU M. N., KURTMAN C., 2006. *Serum AOPP, selenium and vitamin E levels after irradiation*. Turk. J. Cancer 36, 19-21.
- HUANG C, LIU Y., TAI H., 2015. *Synthesis of peptides containing 2-oxohistidine residues and their characterization by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J. Peptide Sci. 21, 114-119.
- ISHII Y., IJIMA M., UMEMURA T., NISHIKAWA A., IWASAKI Y., ITO R., SAITO K., HIROSE M., NAKAZAWA H., 2006. *Determination of nitrotyrosine and tyrosine by high-performance liquid chromatography with tandem mass-spectrometry and immunohistochemical analysis in livers of mice administered acetaminophen*. J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 41, 1325-1331.
- KAROLKIEWICZ J., 2011. *Wpływ stresu oksydacyjnego na strukturę i funkcje komórek oraz konsekwencje wynikające z uszkodzeń wolnorodnikowych – związek z procesami starzenia*. Gerontologia Polska 19, 59-65.
- KOŁODZIEJCZYK J., 2010. *3-nitrotyrozyna- marker stresu oksydacyjnego in vitro i in vivo*. J. Lab. Diagnost. 46, 141-145.
- MATTHEWS R. T., FLINT BEAL M., 1996. *Increased 3-nitrotyrosine in brains of Apo E- deficient mice*. Brain Res. 718, 181-184.
- OTEIZA P. I., OLIN K. L., FRAGA C. G., KEEN C. L., 1995. *Zinc deficiency causes oxidative damage to proteins, lipids and DNA in rat testes*. J. Nutr. 95, 823-828.
- ÓNODY A., CSONKA C., GIRICZ Z., FERDINANDY P., 2003. *Hyperlipidemia induced by a cholesterol-rich diet leads to enhanced peroxynitrite formation in rat heart*. Cardiovasc. Res. 58, 663-670.
- PATEL H. V., KALIA K., 2010. *Sub-chronic arsenic exposure aggravates nephrotoxicity in experimental diabetic rats*. Ind. J. Exp. Biol. 48, 762-768.
- PATTISON D. I., DAVIES M. J., 2004. *Kinetic analysis of the reactions of hypobromous acid with protein components: implications for cellular damage and use of 3-bromotyrosine as a marker of oxidative stress*. Biochemistry 43, 4799, 4800.
- PIWOWAR A., 2010. *Zaawansowane produkty utleniania białek. Część I. Mechanizm powstawania, struktura i właściwości*. Polski Merkurusz Lekarski 28, 166-169.
- PONCZEK M.B., WACHOWICZ B., 2005. *Oddziaływanie reaktywnych form tlenu i azotu z białkami*. Post. Biochem. 51, 140-144.
- SCHÖNEICH C., 2000. *Mechanisms of metal-catalyzed oxidation of histidine to 2-oxo-histidine in peptides and proteins*. J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 21, 1093-1094.
- SHACTER E., 2000. *Quantification and significance of protein oxidation in biological samples*. Drug Metab. Rev. 32, 307-326.
- SOCHASKI M. A., JENKINS A. J., LYONS T. J., THORPE S. R., BAYNES J. W., 2001. *Isotope dilution gas chromatography/ mass spectrometry method for the determination of methionine sulfoxide in protein*. Analyt. Chem. 73, 4662-4667.
- STADTMAN E. R., LEVINE R. L., 2003. *Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins*. Amino Acids 25, 207-218.
- SZUBA A., WOJTASZEK P., 2010. *Modyfikacje strukturalne białek wywołane przez tlenek azotu*. Post. Biochem. 56, 107-112.
- TÜRKÖZKAN N., SEVEN I., ERDAMAR H., ÇİMEN B., 2005. *Effect of vitamin A pretreatment on Escherichia coli- induced lipid peroxidation and level of 3-nitrotyrosine in kidney of guinea pig*. Mol. Cell. Biochem. 278, 33-37.
- UCHIDA K., KAWAKISHI S., 1993. *2-Oxo-histidine as a novel biological marker for oxidatively modified proteins*. Fed. Europ. Biochem. Soc. 332, 208-210.
- WŁODEK L., ICIEK M., 2003. *S-tiolacja białek jako mechanizm antyoksydacyjnej regulacji*. Post. Biochem. 49, 78-79.
- WU W., CHEN Y., AVIGNON A., HAZEN S. L., 1999. *3-Bromotyrosine and 3,5-Dibromotyrosine are major products of protein oxidation by eosinophil peroxidase: potential markers for eosinophil – dependent tissue injury in vivo*. Biochemistry 38, 3539-3548.
- YOUNGMAN L. D., PARK J.-Y. K., AMES B. N., 1992. *Protein oxidation associated with aging is reduced by dietary restriction of protein or calories*. Med. Sci. 89, 9112-9116.

KOSMOS Vol. 67, 2, 347–359, 2018

KATARZYNA OGNIK, EWELINA CHOLEWIŃSKA

Department of Biochemistry and Toxicology, Faculty of Biology, Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, 13 Akademicka Str., 20-950 Lublin, E-mail: kasiaognik@poczta.fm

BIOMARKERS OF PROTEINS OXIDATIVE DAMAGE

Summary

The prevalence of prooxidative processes in the body is associated with development of oxidative stress, one of the symptoms of which is oxidation of proteins. Direct analysis of the amount of reactive forms of oxygen and nitrogen is a very difficult task. Therefore, in assessing the severity of oxidative stress, markers generated by free radical reactions with proteins are often used. They are much more durable and thus easier to analyze. The most important biomarkers of oxidative damage of proteins are protein carbonyl compounds, 3-nitrotyrosine, S-nitrotriazoles, kynurenine, 3-chloro-4-hydroxyphenylalanine, bromo-5-hydroxytryptophan, methionine sulfoxide, dityrosine, oxohistidine and so called advanced oxidation protein products (AOPP).

Protein carbonyls, 3-nitrotyrosine and AOPP are the best indicators for evaluating of oxidative damage of proteins in laboratory animals. Their content in the body is clearly increasing in response to oxidative stress caused by such factors as improper diet, micronutrient deficiencies, toxic poisoning, infections or aging.

Key words: 3-nitrotyrosine, advanced oxidation protein products, biomarker, oxidative stress, protein, protein carbonyl