

## ISOPROSTANII - STANDARD-UL DE AUR AL DETERMINĂRII STRESULUI OXIDATIV *IN VIVO*

NICOLAE MIU, ANDREEA LIANA RĂCHÎȘAN, SIMONA CĂINAP, ADRIAN HRUȘCĂ, MARIANA ANDREICA

Disciplina Pediatrie 2, Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca

### Rezumat

*Stresul oxidativ pare a fi implicat atât în apariția, cât și în întreținerea anumitor entități clinice. Multipli markeri de determinare ai stresului oxidativ in vitro sunt disponibili, însă niciunul nu pare a avea sensibilitatea și/sau specificitatea ideală pentru cuantificarea reacțiilor oxidative in vivo. Isoprostanii, izomeri ai prostaglandinelor, sunt o clasă fundamentală ai produșilor de oxidare în cursul reacțiilor de stres oxidativ.  $F_2$ Isoprostanii sunt un grup de 64 compuși izomerici ai prostaglandinei  $F_{2a}$ . Determinarea  $F_2$ Isoprostanilor pare a fi cea mai eficientă metodă de cuantificare a stresului oxidativ in vivo, devenind standardul de aur pentru măsurarea reacțiilor oxidative.*

**Cuvinte cheie:** isoprostani, stres oxidativ, radicali liberi de oxigen.

## ISOPROSTANES - THE GOLD STANDARD OF THE OXIDATIVE STRESS ASSESSMENT *IN VIVO*

### Abstract

*Oxidative stress seems to be involved in the generation and maintenance of several clinical entities. Several in vitro markers of oxidative stress are available, but most are of limited value in vivo because of low sensitivity and/or specificity. Isoprostanes, prostaglandin's isomers, are a fundamental class of products generated by the oxidative stress reactions.  $F_2$ Isoprostanes are a group of 64 isomeric compounds of prostaglandin  $F_{2a}$ . Determination of  $F_2$ Isoprostanes seems to be the most efficient method to quantify oxidative stress in vivo and has become the gold standard of the assessment of oxidative reactions.*

**Keywords:** isoprostanes, oxidative stress, reactive oxygen species.

### INTRODUCERE

Stresul oxidativ (SO) se caracterizează printr-un dezechilibru al balanței privind producția sau expunerea crescută la radicali liberi de oxigen (RLO) și apărarea antioxidantă deficitară. RLO afectează biomoleculele precum lipide, proteine și ADN, ducând la distrucția acestora. SO este cunoscut a fi implicat atât în patogeneza, cât și în întreținerea unor patologii precum cancer, boli cardiovasculare, boli neurodegenerative, diabet zaharat, obezitate, cât și în procesul normal de îmbătrânire. Cu toate acestea,

asocierea dintre SO și patologiile menționate a fost inexactă și mult timp nedovedită, datorită unor limitări privind demonstrarea prezenței SO *in vivo* [1]. Multipli markeri de stres oxidativ *in vitro* sunt disponibili, însă majoritatea sunt cu valoare limitată *in vivo* datorită sensibilității și/sau specificității scăzute a metodelor de determinare [2]. Dezvoltarea unor metode specifice și noninvasive de măsurare a SO *in vivo* este de o importanță fundamentală pentru stabilirea rolului RLO, atât în patogenia, cât și în întreținerea unor boli [3,4]. O clasă de produși de oxidare formați în abundență atât *in vitro*, cât și *in vivo*, sunt isoprostanii (IsoP). IsoP sunt compuși prostaglandin-like, produși *in vivo* independent de ciclooxigenază [5]. Formarea compușilor prostaglandin-like ca urmare a

Articol intrat la redacție în data de: 25.03.2012

Primit sub formă revizuită în data de: 12.06.2012

Acceptat în data de: 13.06.2012

Adresa pentru corespondență: andreea\_rachisan@yahoo.com

**Tabel I.** Boli în care determinarea IsoP a putut demonstra rolul stresului oxidativ și al radicalilor liberi de oxigen atât în patogenia, cât și în întreținerea procesului patologic [17,18,19].

Afecțiuni cardiovasculare	Boli metabolice	Neurologice
Ateroscleroza	Diabet zaharat	Alzheimer
Ischemia/Infarct	Obezitate	Coreea Huntington
Coronaropatii	Hipercolesterolemie	Scleroza multiplă
Boală renovasculară		Boala Creutzfeld-Jacob

procesului de oxidare a acizilor grași polinesaturați a fost pentru prima dată menționată în anii 1960-70, însă IsoP au fost descriși ca făcând parte din procesul de oxidare *in vivo* doar în anii '90 [6]. Studii ulterioare au arătat că acești produși prostaglandin-like sunt generați printr-un mecanism nonenzimatic de autooxidare a acidului arahidonic, independent de calea ciclooxigenazei. Datorită faptului că acești produși conțin legături F-prostan, au fost denumiți IsoP [7]. F<sub>2</sub>Isoprostanii (F<sub>2</sub>IsoP) sunt un grup de 64 compuși izomerici ca și structură cu prostaglandina F<sub>2α</sub>. Calea isoprostanilor dă naștere și altor produși intermediari, precum: E<sub>2</sub> și D<sub>2</sub> Isoprostanii, însă **măsurarea nivelului F<sub>2</sub>IsoP este cea mai fidelă metodă de determinare a SO *in vivo*, furnizând informații în stabilirea rolului SO în patogeneza unor boli** [8].

### CALEA ISOPROSTANILOR

Isoprostanii se pot forma prin două căi de peroxidare: un mecanism de endoperoxidare și calea dioxetan-endoperoxidare [9,10]. În procesul de endoperoxidare, acidul arahidonic, radicalii aracidonil și 4 izomeri peroxil sunt produși prin înlocuirea unui atom de hidrogen (H) cu unul de oxigen (O). Radicalii peroxil realizează endociclizarea și adăugarea unei noi molecule de O, pentru a forma 4 izomeri intermediari prostaglandin-like biciclici. Aceștia din urmă sunt reduși la 4 regioizomeri, fiecare având 8 diastereoizomeri racemici, rezultând 64 de IsoP izomeri [11]. Calea dioxetan-endoperoxidare duce, de asemenea, la formarea acelorași diastereoizomeri. **Sintetizând**, inițial are loc formarea radicalilor aracidonil, urmată de formarea a 4 radicali peroxil care realizează procesul de endociclizare, apoi are loc generarea a 4 bicicloendoperoxid izomeri care sunt reduși la IsoP. IsoP sunt formați prin esterificarea fosfolipidelor, dar mecanismul prin care aceștia sunt eliberați de la nivelul membranei rămâne necunoscut. Formarea IsoP este mediată de fosfolipază, fiind indusă de activatorii acesteia, precum calciu ionofor A23187 și peroxidul de hidrogen, lucru demonstrat *in vitro* [12]. De asemenea rolul factorului activator al trombocitelor a fost demonstrat în hidroliza IsoP *in vivo* [13].

### IsoP - INDICATORI DE STRES OXIDATIV *IN VIVO*

Cu toate că importanța determinării peroxidării lipidice ca marker de stres oxidativ era cunoscută și demonstrată, nici una dintre metodele de determinare nu era considerată ideală. Era imperios necesar elaborarea

unei metode noninvazive, dar și specifică de determinare a SO *in vivo*. Astfel, determinarea nivelului IsoP în diverse fluide ale organismului reprezintă actualmente standardul de aur pentru cuantificarea SO *in vivo* [14].

IsoP pot fi detectați atât în forma lor esterificată, cât și în forma liberă, în toate fluidele organismului: plasmă, urină, lichid bronchoalveolar, lichid cefalorahidian, bilă [15]. IsoP prezintă câteva caracteristici care le conferă statutul de markeri ideali de SO, precum: (1) sunt produși chimici stabili, (2) sunt produși specifici de peroxidare, (3) se formează *in vivo*, (4) pot fi detectați în diverse țesuturi și fluide biologice. IsoP nu sunt doar biomarkeri de SO, dar prezintă și diverse efecte biologice, sugerând faptul că aceștia pot fi și mediatori fiziopatologici ai injuriei oxidative. Producția IsoP își exercită efectele biologice atât prin medierea cu ajutorul unor receptori (ex. vasoconstricția realizată de IsoP), dar și prin propria reactivitate chimică [16].

Precum a fost specificat și mai sus, determinarea IsoP pare a fi metoda cea mai eficientă de demonstrare a peroxidării lipidice *in vivo* și reprezintă un instrument în demonstrarea rolului SO în patogenia unor boli. Valori crescute ale IsoP au fost regăsite în fluide ale organismului la pacienți suferind de diverse afecțiuni (Tabel I).

### CONCLUZII

Descoperirea inițială a F<sub>2</sub> isoprostanilor a fost o curiozitate biochimică, în sensul demonstrării existenței compușilor prostaglandin-like *in vivo* independent de calea ciclooxigenazei. **Măsurarea F<sub>2</sub> isoprostanilor a stabilit evidenta implicare a stresului oxidativ într-un număr mare de entități clinice.** Astfel, s-a demonstrat și acțiunea lor biologică receptor-dependentă sau prin alte mecanisme, participând astfel la injuria oxidativă. Studiul biochimic și farmacologic al IsoP, asociat unor studii clinice folosind F<sub>2</sub>IsoP ca și biomarker, ar putea aduce noi informații în ceea ce privește implicarea SO în fiziopatologia anumitor entități clinice.

### Bibliografie

- Halliwell B, Grootveld M. The measurement of free radical reactions in humans. Some thoughts for future experimentation. FEBS Lett, 1987; 213:9-14.
- Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F<sub>2</sub> isoprostanines as an index of oxidative stress in vivo. Free Radic Biol Med, 2000; 28:505-513.

3. Morrow JD. Quantification of Isoprostanes as Indices of Oxidant Stress and the Risk of Atherosclerosis in Humans. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*, 2005; 25:279-286.
4. Morrow JD, Chen Y, Brame CJ, et al. **The Isoprostanes:** Unique prostaglandin-like products of free radical initiated lipid peroxidation. *Drug Metab Rev*, 1999; 31:117-139.
5. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, et al. A series of prostaglandin F<sub>2</sub> like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc.Natl. Acad.Sci USA*, 1990; 87:9383-9387.
6. Pryor WA, Stanley JP, Blair E. Autooxidation of polyunsaturated fatty acids: A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids*, 1976; 370-379.
7. Morrow JD, Harris TM, Roberts LJ. Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Anal.Biochem*, 1990; 184:1-10.
8. Morrow JD, Roberts LJ. The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog.Lipid Res*, 1997; 36:1-21.
9. Huiyong Y. New techniques to detect oxidative stress markers: mass spectrometry-based methods to detect isoprostanes as gold standard for oxidative stress in vivo. *BioFactors*, 2008; 34:109-124.
10. Rokach J, Khanapure SP, Hwang SW, et al. The isoprostanes, a perspective. *Prostaglandins*, 1997; 54:823-851.
11. Montuschi P, Barnes P, Roberts LJ. Insights into Oxidative stress: the isoprostanes. *Current Medicinal Chemistry*, 2007; 14:703-717.
12. Sametz W, Hummer K, Butter M, et al. **Formation of 8-iso-PGF<sub>2α</sub> and thromboxane A<sub>2</sub>** by stimulation with several activators of phospholipase A<sub>2</sub> in the isolated human umbilical vein. *Br J Pharmacol*, 2000; 131:145-151.
13. Stafforini DM, Sheller JR, Blackwell TS, et al. Release of free F<sub>2</sub>-isoprostanes from esterified phospholipids is catalyzed by intracellular and plasma platelet-activating factor acetylhydrolases. *J Biol Chem*, 2006; 281:4616-4623.
14. Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, et al. **Biomarkers of oxidative stress study: Effects of the nonsteroidal anti-inflammatory agents indomethacin and meclofenamic acid on measurements of oxidative products of lipids.** *Free Radic Biol Med*, 2005; 3: 698.
15. Morrow JD, Roberts IL. Jackson Mass spectrometric quantification of F<sub>2</sub>-isoprostanes in biological fluids tissue as measure of oxidant stress. *Methods in Enzymology*. Academic Press, 1999; 3-12.
16. Milne GL, Gao L, Porta A, et al. Identification of the major urinary metabolite of the highly reactive cyclopentenone isoprostane 15-A(2t)-isoprostane in vivo. *J Biol Chem*, 2005; 280: 25178-25184.
17. Keaney JF, Larson MG, Vasan RS, et al. Framingham Study. *Arterioscler Tromb Vasc Biol*, 2003; 23:434.
18. Basu S. Bioactive eicosanoids: role of prostaglandin F(2α) and F<sub>2</sub>-isoprostanes in inflammation and oxidative stress related pathology. *Mol Cells*, 2010; 3:383-391.
19. Oliver SR, Rosa JS, Milne GL, et al. Increased oxidative stress and altered substrate metabolism in obese children. *Int J Pediatr Obes*, 2010; 5:436-444.