

IZOPROSTANY JAKO BIO-WSKAŹNIKI STRESU OKSYDACYJNEGO *IN VIVO*

ISOPROSTANES AS BIOMARKERS OF AN *IN VIVO* OXIDATIVE STRESS

Katarzyna KLARZYŃSKA^{1,2}, Dorota ŚCIEGLIŃSKA², Aleksander L. SIEROŃ¹

¹Zakład Biologii Molekularnej, Katedra Biologii Molekularnej i Genetyki,
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

²Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów,
Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Streszczenie: Izoprostany są produktami wolnorodnikowej reakcji peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład fosfolipidów. Związki te powstają również na drodze enzymatycznej zależnej od cyklooksygenazy-1 i cyklooksygenazy-2. Pozwala to przypuszczać, że izoprostany, tak jak inne związki powstające na drodze enzymatycznej przemiany kwasów tłuszczowych, wykazują aktywność biologiczną. Izoprostany występują w organizmie w formie związanej z błoną komórkową oraz w formie wolnej w płynach biologicznych ciała. Obecnie, do najlepiej poznanych izoprostanów należą pochodne kwasu arachidonowego, będące izomerami przestrzennymi prostaglandyn. Ze względu na swój długi okres półtrwania i stabilność chemiczną, izoprostany są uznawane za najbardziej wiarygodne wskaźniki odzwierciedlające stres oksydacyjny organizmu i utlenienie lipidów *in vivo*. Uważa się, że izoprostany o strukturze podobnej do prostaglandyn F_2 , w tym głównie 15- F_{2t} -IsoP (inaczej: 8-iso-PGF_{2α}, 8-epi-PGF_{2α}, oraz iPF_{2α}-III), są szczególnie wartościowymi bio-wskaźnikami peroksydacji lipidów. Pomiar stężenia izoprostanów ma potencjalną wartość prognostyczną w odniesieniu do chorób, których etiologia powiązana jest ze stresem oksydacyjnym, jak przykładowo niektóre choroby płuc (w tym rak płuca).

Słowa kluczowe: izoprostany, utlenianie lipidów, stres oksydacyjny, niedrobnokomórkowy rak płuca, reaktywne formy tlenu

Summary: Isoprostanes are products of free radical attack on polyunsaturated fatty acids of phospholipids. They are also produced by cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 dependent pathway. The above may imply that isoprostanes, as well as other compounds created by enzymatic conversion of fatty acids, may have some biological activity. In the body isoprostanes are either esterified to cell membrane or, after detachment, are present as free compounds in body fluids. The best known iso-

prostanes are derivatives of arachidonic acid, which are spatial isomers of prostaglandins. Due to their long half-life and chemical stability, isoprostanes are considered to be the most reliable markers reflecting the *in vivo* oxidative stress and lipid peroxidation status of the organism. Prostaglandin F₂ like isoprostanes, especially 15-F_{2t}-IsoP (also known under the following names: 8-iso-PGF_{2α}, 8-epi-PGF_{2α}, or iPF_{2α}-III), are considered valuable markers of lipid peroxidation. Measuring the concentration of isoprostanes has a potential prognostic value for diseases etiologically associated with oxidative stress, like for example certain lung diseases (including lung cancer).

Keywords: isoprostanes, lipid peroxidation, oxidative stress, non-small cell lung cancer, reactive oxygen species

Wykaz stosowanych skrótów: **15-F_{2t}-IsoP-M** – 2,3-dinor-5,6-dihydro-15-F_{2t}-IsoP; **AA** – kwas arachidonowy (ang. *Arachidonic Acid*); **AC** – cyklaza adenylowa (ang. *Adenyl Cyclase*); **ADP** – difosforan adenozy (ang. *Adenosine Diphosphate*); **AP-1** – kompleks białkowy aktywujący transkrypcję (ang. *Activator Protein 1*); **cAMP** – cykliczny adenozylo monofosforan (ang. *cyclic Adenosine Monophosphate*); **COX** – cyklooksygenaza (ang. *Cyclooxygenase*); **COX-1** – cyklooksygenaza 1; **COX-2** – cyklooksygenaza 2; **CT** – tomografia komputerowa (ang. *Computed Tomography*); **EBC** – kondensat powietrza wydychanego (ang. *Exhaled Breath Condensate*); **EC** – epoksygenazy cytochromowe; **EDTA** – wersenian dwusodowy; **EET** – kwasy epoksyekoizatrienowe (ang. *Epoxyeicosatrienoic Acids*); **EIA** – test immunoenzymatyczny (ang. *Enzyme Immunoassay*); **ELISA** – immunoenzymatyczny test fazy stałej (ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*); **ESI** – jonizacja typu elektrorozpylania (ang. *Electrospray Ionization*); **F₂-IsoP** – IsoP o strukturze podobnej do prostaglandyn F₂; **F_{2α}-IsoP** – IsoP o strukturze podobnej do prostaglandyn F_{2α}; **FR** – wolne rodniki (ang. *Free Radicals*); **GC** – chromatografia gazowa (ang. *Gas Chromatography*); **GC-ESI-MS** – chromatografia gazowa połączona ze spektrometrią mas z wykorzystaniem jonizacji typu elektrorozpylania; **GC-NICI-MS** – chromatografia gazowa połączona z tandemową spektrometrią mas, z wykorzystaniem ujemnej jonizacji chemicznej; **GC-MS** – chromatografia gazowa połączona ze spektrometrią mas; **GC-MS/MS** – chromatografia gazowa połączona z tandemową spektrometrią mas; **HC** – hydroksylazy cytochromowe; **HETE** – kwasy hydroekoizatrienowe (ang. *Hydroxyeicosatetraenoic acids*); **HPLC** – wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *High-Performance Liquid Chromatography*); **HPLC-ESI-MS/MS** – połączenie wysokosprawnej chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas, z wykorzystaniem jonizacji typu elektrorozpylania; **IAC** – chromatografia immunopowinowactwa (ang. *Immunoaffinity Chromatography*); **IsoP** – izoprostany (ang. *Isoprostanes*); **ISR** – receptor izoprostanów (ang. *Isoprostane Receptor*); **IUPAC** – Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej (ang. *International Union of Pure and Applied Chemistry*); **LC** – chromatografia cieczowa (ang. *Liquid Chromatography*); **LC-MS** – chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią mas; **LC-MS/MS** – chromatografia cieczowa połączona z tandemową spektrometrią mas; **LOX** – lipooksygenaza (ang. *Lipoxygenase*); **LT** – leukotrieny (ang. *Leukotrienes*); **LX** – lipoksyny (ang. *Lipoxins*); **MDA** – dialdehyd malonowy; **MLC-P** – ufosforylowane łańcuchy lekkie miozyny (ang. *Phosphorylated Myosin Light chain*); **MLCph** – fosfataza łańcucha lekkiego miozyny (ang. *Myosin Light Chain Phosphatase*); **MS** – spektrometria masowa (ang. *Mass Spectrometry*); **MS/MS** – tandemowa spektrometria masowa (ang. *tandem Mass Spectrometry*); **NF-κB** – jądrowy czynnik transkrypcyjny κB (ang. *Nuclear Factor κB*); **NICI** – ujemna jonizacja chemiczna (ang. *Negative-Ion Chemical Ionization*); **NIEHS** – Narodowy Instytut Nauk Zdrowia Środowiskowego w Stanach Zjednoczonych (ang. *National Institute of Environmental Health Sciences*); **NIH** – Narodowy Instytut Zdrowia w Stanach Zjednoczonych (ang. *National Institutes of Health*); **NLPZ** – niesteroidowe leki przeciwzapalne; **NSCLC** – niedrobnokomórkowy rak płuca (ang. *Non-Small Lung Cell Lung Carcinoma*); **PAF-AH** – acetylohydrolaza czynnika aktywującego płytki (ang. *Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase*);

PLC β – fosfolipaza C beta (ang. *Phospholipase C β*); **PG** – prostaglandyna; **PGF₂** – prostaglandyna F₂; **PGHS** – syntaza cyklicznego nadtlenu prostaglandynowego (ang. *Prostaglandin-endoperoxide Synthase*); **PKC** – kinaza białkowa C (ang. *Protein Kinase C*); **POChP** – przewlekła obturacyjna choroba płuc; **PUFA** – wielonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. *Polyunsaturated Fatty Acids*); **RIA** – test radioimmunologiczny (ang. *Radioimmunoassay*); **ROCK** – kinaza zależna od białka Rho (ang. *Rho-associated protein Kinase*); **RFT** – reaktywne formy tlenu; **SPE** – ekstrakcja do fazy stałej (ang. *Solid-Phase Extraction*); **TLC** – chromatografia cienkowarstwowa (ang. *Thin-Layer Chromatography*); **TPR** – receptor tromboksanu (ang. *Thromboxane Receptor*); **TNF- α** – czynnik martwicy nowotworu α (ang. *Tumour Necrosis Factor α*); **TX** – tromboksany (ang. *Thromboxanes*).

BIO-WSKAŹNIKI STRESU OKSYDACYJNEGO

DEFINICJA BIO-WSKAŹNIKA STRESU OKSYDACYJNEGO

Stres oksydacyjny, czyli stan zakłócenia równowagi między wytwarzaniem wolnych rodników (FR) a aktywnością antyoksydacyjną organizmu, uważa się za przyczynę wielu zespołów chorobowych takich jak m.in. choroby płuc, choroby sercowo-naczyniowe, nowotwory czy choroby neurodegeneracyjne [6, 14, 16]. Dlatego też, niezwykle istotnym zadaniem wydaje się być znalezienie odpowiednich bio-wskaźników pozwalających określić poziom stresu oksydacyjnego *in vivo* [16]. Zgodnie z definicją opracowaną przez ekspertów Narodowego Instytutu Zdrowia (NIH) w Stanach Zjednoczonych, „bio-wskaźniki” są możliwymi do obiektywnego mierzenia cechami pozwalającymi na ocenę fizjologicznych procesów biologicznych, procesów patologicznych lub odpowiedzi organizmu na działania terapeutyczne [11]. Definicja „bio-wskaźnika stresu oksydacyjnego” określa dodatkowo, iż jest to biomolekuła, której struktura została zmodyfikowana przez reaktywne formy tlenu (RFT), i która może służyć do oceny stresu oksydacyjnego zarówno w modelach zwierzęcych, jak i u ludzi [19].

Sugeruje się, iż wiarygodny bio-wskaźnik stresu oksydacyjnego, powinien być: (a) cząsteczką stabilną, niemożliwą do sztucznego wytworzenia, niepodatną na utlenienie czy zanik w wyniku sposobu obchodzenia się z analitem; (b) głównym produktem uszkodzenia oksydacyjnego; (c) dostępny w tkance docelowej lub w innym miejscu w organizmie w ilościach, które odzwierciedlają zmiany oksydacyjne tkanki docelowej; (d) obecny w wystarczająco wysokich stężeniach umożliwiających detekcję; (e) niewrażliwy na czynniki środowiskowe; (f) możliwy do oznaczenia z wykorzystaniem metod nieinwazyjnych; (g) możliwy do zmierzenia specyficznymi, czułymi i powtarzalnymi metodami; (h) łatwy do wykrycia i zmierzenia w analizowanych populacjach; a także wykazywać: (i) niewielką zmienność stężenia podczas pomiaru w tych samych warunkach, u tej samej osoby w różnych punktach czasowych; oraz (j) stabilność wewnątrz próby w porównaniu do zmienności międzypersonicznej [19].

IZOPROSTANY, WIARYGODNE BIO-WSKAŹNIKI STRESU OKSYDACYJNEGO

Wśród cech stresu oksydacyjnego poddających się ilościowej ocenie można wymienić obecność nadmiernej ilości FR lub struktur przez nie uszkodzonych [62]. Bezpośredni pomiar ilości FR jest bardzo trudny ze względu na ich wysoką reaktywność i/lub krótki okres półtrwania. Większą stabilność wykazują produkty reakcji FR z biomolekułami [19, 62]. Największy potencjał dostrzeżono w produktach utlenienia wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) [91]. Spośród wszystkich produktów utlenienia kwasów tłuszczowych, za najlepszy bio-wskaźnik stresu oksydacyjnego *in vivo* uważa się natomiast tzw. izoprostany (IsoP), a w szczególności F_2 -IsoP, czyli IsoP o strukturze podobnej do prostaglandyny (PG) F_2 (PGF_2) [91]. F_2 -IsoP posiadają kilka cech, które sprawiają, że związki te są interesującymi kandydatami na bio-wskaźniki stresu oksydacyjnego *in vivo*. Związki te są stabilnymi chemicznie, bezpośrednimi produktami peroksydacji fosfolipidów powstającymi *in vivo*, niezależnymi od ilości tłuszczu w diecie i cyklu dobowego. Ponadto, F_2 -IsoP występują we wszystkich tkankach i płynach biologicznych ciała na możliwym do oznaczenia poziomie podstawowym, co pozwala ustalić wartości referencyjne dla oznaczeń tych związków w stanach chorobowych. F_2 -IsoP mogą być oznaczane nawet w pikomolowych stężeniach z różnorodnego materiału biologicznego za pomocą metod instrumentalnych i testów immunologicznych [19, 64]. Badanie dotyczące bio-wskaźników stresu oksydacyjnego (BOSS II) przeprowadzone przez Narodowy Instytut Nauk Zdrowia Środowiskowego (NIEHS, część NIH) w Stanach Zjednoczonych, wykazało że ilościowy pomiar F_2 -IsoP w moczu lub osoczu krwi stanowi wiarygodną metodę pozwalającą określić stan stresu oksydacyjnego organizmu *in vivo* w zwierzęcym modelu stresu oksydacyjnego [47].

Podwyższony poziom F_2 -IsoP zaobserwowano w wielu schorzeniach powiązanych ze stresem oksydacyjnym, takich jak np. nowotwory, choroby sercowo-naczyniowe, choroby metaboliczne i neurodegeneracyjne [8]. Niektórzy wskazują jednakże, iż IsoP ulegają zwykle szybkiemu metabolizmowi, dlatego też ich wzrost może być nie tylko efektem nasilenia stresu oksydacyjnego, lecz spowolnionego metabolizmu tych związków [39].

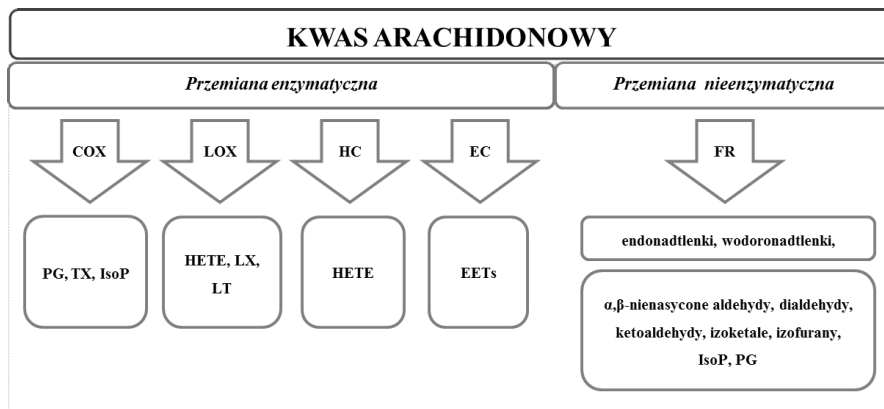
W piśmiennictwie najczęściej opisywanym związkiem należącym do rodziny F_2 -IsoP jest $15-F_{2t}$ -IsoP. Został on przebadany w blisko 500 badaniach na zwierzętach i 900 badaniach na ludziach. Pomiar stężenia tego związku jest powszechnie uważany za złoty standard w ocenie peroksydacji lipidów *in vivo* [91].

CHARAKTERYSTYKA IZOPROSTANÓW

IZOPROSTANY TO PRODUKTY UTLENIANIA KWASU ARACHIDONOWEGO

Kwas arachidonowy (AA), 20-węglowy nienasycony kwas tłuszczowy posiadający cztery wiązania podwójne [12], występuje w organizmie głównie w formie związanej w pozycji sn-2 fosfolipidów błon komórkowych oraz w obrębie lipoprotein [38, 42]. Fosfolipidy błonowe są głównym obiektem uszkodzeń oksydacyjnych ponieważ tlen i FR są lepiej rozpuszczalne w płynnej dwuwarstwie lipidowej, niż w roztworach wodnych. Dodatkowo, wrażliwość PUFA na atak RFT zwiększa się wraz z ilością wiązań podwójnych (grup metylenowych) [68]. AA ulega licznym przemianom enzymatycznym i nieenzymatycznym, które przedstawiono na rycinie 1 [42, 47, 60, 68, 71, 90, 94].

Pierwsze doniesienie o możliwości wystąpienia nieenzymatycznej autooksydacji PUFA miało miejsce w 1967 roku, kiedy to Nugteren i wsp. zaobserwowali, iż na skutek autooksydacji kwasu dihomogamma-linolenowego w warunkach *in vitro* powstaje niewielka ilość PG E1 [6, 67]. Podobne zjawisko odnotowano później w warunkach *in vitro* także w stosunku do AA. Pochodne powstające na skutek autooksydacji AA przypominały swoją strukturą PG [55]. Obserwacje te zyskały na znaczeniu dopiero w roku 1990, kiedy Morrow i wsp. [65] odkryli powstawanie tych pochodnych, znanych dziś jako F_2 -IsoP, także *in vivo* na skutek nieenzymatycznej peroksydacji [38, 65]. Przez długi czas powszechnie uważano, że proces nieenzymatycznej peroksydacji lipidów jest głównym źródłem F_2 -IsoP [47, 90]. Obecnie wiadomo, że niektóre IsoP mogą być produkowane także na drodze enzymatycznej przemiany AA zależnej od syntazy cyklicznego nadtlenku prostaglandynowego (PGHS) typu 1 i typu 2, nazywanej również cyklooksygenazą-1 i -2 (COX-1, COX-2). Choć początkowo zakładano, że w ten sposób powstają jedynie znikome ilości IsoP [47], to najnowsze wyniki uzyskane przez badaczy NIEHS wykazały, że IsoP powstające na drodze enzymatycznej stanowią znaczącą część całkowitej puli tych związków. Procentowy udział frakcji nieenzymatycznej i enzymatycznej IsoP jest zależny od rodzaju i dawki czynnika indukującego stres oksydacyjny [91]. Zdaniem badaczy NIEHS, dopiero stosunek $15-F_{2t}$ -IsoP/PGF_{2 α} stanowi bezwzględną miarę stresu oksydacyjnego *in vivo*. Przeliczenia pozwalające określić udział dwóch różnych frakcji $15-F_{2t}$ -IsoP w surowicy uwzględniają odmiennie proporcje w jakich $15-F_{2t}$ -IsoP i PGF_{2 α} powstają podczas przemiany AA na drodze nieenzymatycznej oraz enzymatycznej [90, 91].



RYCINA 1. Przemiany enzymatyczne i nieenzymatyczne kwasu arachidonowego (AA). Przemiana enzymatyczna AA. Pod wpływem cyklooksygenaz (COX) następuje przemiana AA do prostaglandyn (PG), tromboksanów (TX), oraz izoprostanów (IsoP). Na skutek działania lipooksygenazy (LOX) z AA powstają kwasy hydroeikozatetraenowe (HETE), lipoksyny (LX) i leukotrieny (LT). Enzymy cytochromu CYP 450 mogą katalizować przemianę AA dwutorowo: (1) aktywność hydroksylaz cytochromowych (HC) skutkuje przemianą w HETE, (2) a aktywność epoksygenaz cytochromowych (EC) prowadzi do powstania kwasów epoksyekozatrienowych (EETs) [47]. **Przemiana nieenzymatyczna AA:** na skutek działania wolnych rodników (FR) powstają pierwotne i wtórne produkty peroksydacji lipidów. Do pierwotnych produktów peroksydacji lipidów należą endonadtlenki i wodoronadtlenki nienasyconych kwasów tłuszczowych, do wtórnych zaliczane są produkty fragmentacji pierwotnych produktów peroksydacji, takie jak α,β -nienasycone aldehydy np. 4-hydrokso-2-nonenal, akroleina; dialdehyd malonowy (MDA), gliksal; ketoaldehydy, izoketale, izofurany, IsoP [60, 68, 71, 94] oraz PG [32]

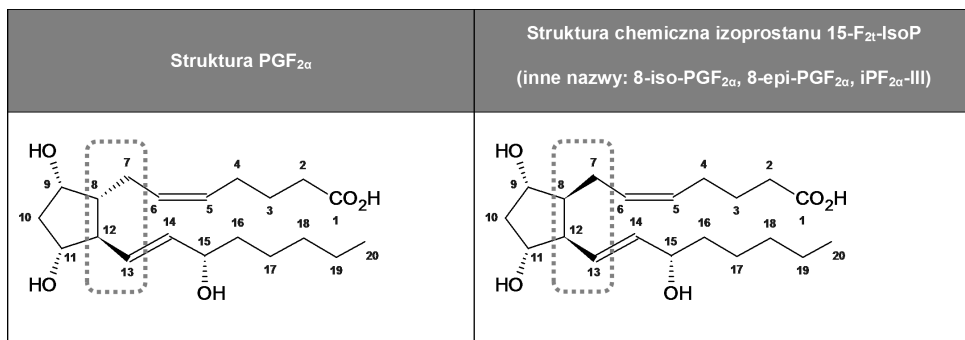
FIGURE 1. Enzymatic and non-enzymatic conversion of arachidonic acid (AA). Enzymatic conversion of AA. Cyclooxygenases (COX) convert AA into prostaglandins (PG), thromboxanes (TX) and isoprostanones (IsoP). Activity of lipoxygenase (LOX) is responsible for the generation of hydroxy-eicosatetraenoic acids (HETEs), lipoxins (LXs), and leukotrienes (LTs). Cytochrome P-450 can catalyze AA conversion in two ways: (1) cytochrome hydroxylase enzymes (HC) generate HETEs; (2) cytochrome epoxigenase enzymes (EC) generate epoxyeicosatrienoic acids (EETs) [47]. **Non-enzymatic conversion of AA.** As a result of free radicals (FR) actions, primary and secondary lipid peroxidation products are produced. Primary lipid peroxidation products include endoperoxides and hydroperoxides of unsaturated fatty acids. Secondary lipid peroxidation products include fragmentation products of primary peroxidation products such as α,β -unsaturated aldehydes such as 4-hydroxy-2-nonenal, acrolein; dialdehydes e.g. malonate dialdehyde (MDA), glyoxal; ketoaldehydes; isoketals, isofurans, IsoP [60, 68, 71, 94] and PG [32]

Nie jest do końca jasne czy IsoP powstają jako bezpośrednie produkty aktywności cyklooksygenaz (COX), czy też jako produkty pośrednie, na skutek pojawiania się RFT towarzyszących działaniu COX. W ludzkich komórkach śródbłonna, ilość 15-F_{2t}-IsoP była zależna od COX (produkcja tego związku była hamowana przez indometacynę i kwas acetylosalicylowy) oraz aktywności katalazy (wskazując na rolę nadtlenku wodoru wytworzonego przez COX w powstawaniu 15-F_{2t}-IsoP) [45]. Uważa się, że powstawanie IsoP na drodze enzymatycznej zależnej od COX implikuje obecność w organizmie specyficznego receptora i funkcję biologiczną IsoP [23].

NAZEWNICTWO IZOPROSTANÓW

Z chemicznego punktu widzenia, IsoP powstające z AA są izomerami przestrzennymi (stereoizomerami) PG (ryc. 2). Do tego strukturalnego podobieństwa nawiązuje jeden z systemów nazewnictwa IsoP. Poza nim stosowane są także inne, w tym zaaprobowane przez Międzynarodową Unię Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC) nazewnictwo opracowane przez Taber'a i wsp. [86], oraz nomenklatura opisana przez Rokach i wsp. [77]. Różnorodność ta sprawia, że jedna struktura może występować w piśmiennictwie fachowym pod kilkoma różnymi nazwami (tab. 1).

W zależności od tego, który atom wodoru AA jako pierwszy zostanie poddany atakowi FR, mogą powstać cztery regioizomery F_2 -IsoP różniące się położeniem podwójnego wiązania licząc od końca metylowego, oraz położeniem podstawnika hydroksylowego licząc od końca karboksylowego łańcucha węglowego. Stanowi to podstawę do podziału IsoP na cztery różne typy/serie [86] (tab. 1). Z każdego z czterech regioizomerów może powstać osiem racemicznych diastereoizomerów (łącznie 16 diastereoizomerów), tak więc w sumie na drodze nieenzymatycznej peroksydacji AA może powstać 64 różnych F_2 -IsoP [10, 94]. Zaobserwowano, że ilość regioizomerów F_2 -IsoP serii 5- i 15- jest o co najmniej jeden rząd wielkości wyższa niż ilość F_2 -IsoP serii 8- i 12 [97].



RYCINA 2. Struktura prostaglandyny $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) oraz izoprostanu o strukturze podobnej do $PGF_{2\alpha}$ na przykładzie 15- F_{2t} -IsoP [88]. W swojej strukturze, izoprostany (IsoP) mają analogiczny do prostaglandyn (PG) cyklopentanowy układ pierścieniowy wraz z tlenowymi grupami funkcyjnymi. Te dwa rodzaje związków różni stereochemia wiązań łączących łańcuchy alkilowe z pierścieniem cyklopentanowym (obszar zaznaczony przerywaną linią). W PG wiązania te mają konfigurację *trans*, w IsoP powstawać mogą zarówno wiązania o konfiguracji *trans* jak i *cis*, przy czym te ostatnie są tworzone preferencyjnie [8, 15, 66, 97]

FIGURE 2. Structure of prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) and $PGF_{2\alpha}$ -like isoprostane on the example of 15- F_{2t} -IsoP [88]. Structure of isoprostanes (IsoP) is analogous to prostaglandin (PG) due to presence of cyclopentane ring system with specific oxygen functionalities. These two kinds of compounds have different stereochemistry of the bonds connecting the alkyl chains to the cyclopentane ring (area indicated by a dashed line). In PG, these bonds have a *trans* configuration. Both *trans* and *cis* configurations can be formed in IsoP, with the latter being preferentially created [8, 15, 66, 97]

TABELA 1. Nazewnictwo izoprostanów o strukturze podobnej do prostaglandyny F_2 przykładzie $15-F_{2t}$ -IsoP [15, 66, 77, 86, 97]

TABLE 1. Nomenclature of isoprostanes with structure similar to prostaglandin F_2 on example of the $15-F_{2t}$ -IsoP [15, 66, 77, 86, 97]

Nazewnictwo izoprostanów nawiązujące do podobieństwa strukturalnego do prostaglandyn	Nazewnictwo izoprostanów według Rokach i wsp.	Nazewnictwo izoprostanów według Taber'a i wsp.
<p>Ogólny wzór[#]: Y-iso/epi-PGF_{xa} np. 8-iso-PGF_{2a}, 8-epi-PGF_{2a} (patrz rycina 2)</p> <p>Y – numer węgla izoprostanu (IsoP), który wykazuje konfigurację odmienną w stosunku do prostaglandyn (PG)</p> <p>iso/epi –PG – skrót dla izoprostanów; z chemicznego punktu widzenia, IsoP są izomerami/epimerami (iso/epi) PG</p> <p>F – poszczególne PG zostały podzielone ze względu na budowę pierścienia pentanowego na rodziny oznaczone symbolem literowym; podstawienie pierścienia IsoP przez grupy funkcyjne przypomina pierścień prostaglandyny F_2 (PGF₂), dlatego nazywa się je F_2-IsoP</p> <p>x – ilość wiązań podwójnych w łańcuchach bocznych IsoP (przykładowy związek posiada dwa wiązania podwójne)</p> <p>α/β – jedna z dwóch możliwych konfiguracji grup hydroksylowych pierścienia α – „na dół” lub β „do góry” (przykładowy związek ma konfigurację α)</p>	<p>Ogólny wzór[#]: iPF_{xa/β}-III-VI np. iPF_{2a}-III (patrz rycina 2)</p> <p>iP – skrót dla izoprostanów</p> <p>F – podstawienie pierścienia IsoP przypomina pierścień PGF₂</p> <p>x – ilość wiązań podwójnych w łańcuchach bocznych (przykładowy związek posiada dwa wiązania podwójne)</p> <p>α/β – jedna z dwóch możliwych konfiguracji grup hydroksylowych pierścienia α – „na dół” lub β „do góry” (przykładowy związek ma konfigurację α)</p> <p>III-VI* – cztery klasy szkieletu węglowego F_2-IsoP (przykładowy związek należy do F_2-IsoP klasy III)</p>	<p>Ogólny wzór[#]: 5/8/12/15-F_{xc/t}-IsoP np. 15-F_{2t}-IsoP (patrz rycina 2)</p> <p>5/8/12/15* – cztery serie F_2-IsoP; numer w nazwie serii odpowiada numerowi węgla łańcuchów bocznych, przy którym znajduje się podstawnik hydroksylowy licząc od węgla grupy karboksylowej (przykładowy związek należy do F_2-IsoP serii 15)</p> <p>F – podstawienie pierścienia F_2-IsoP przypomina pierścień PGF₂</p> <p>x – ilość wiązań podwójnych w łańcuchach bocznych (przykładowy związek posiada dwa wiązania podwójne)</p> <p>c/t – łańcuchy boczne F_2-IsoP mogą być w konfiguracji <i>cis</i> lub <i>trans</i> (jak w podanym przykładzie) względem grup hydroksylowych pierścienia. (nie należy mylić z konfiguracją wiązań łączących łańcuchy alkilowe z pierścieniem cyklopentanowym, która dla przykładowego związku jest w pozycji <i>cis</i>)</p> <p>IsoP – skrót dla izoprostanów</p>

[#]Ogólny wzór został opracowany przez autorów dla czytelniejszego przedstawienia zasad nazewnictwa IsoP

*Seria 5 = klasa VI; seria 8 = klasa IV; seria 12 = klasa V; seria 15 = klasa III [15]

AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA IZOPROSTANÓW

IZOPROSTANY ZWIĄZANE I WOLNE

Aktywność biologiczna IsoP może wynikać zarówno z faktu, że lokalizują się one *in situ* w obrębie błon komórkowych, jak też z tego, że po uwolnieniu z błon mogą oddziaływać z docelowym receptorem [45, 88].

W porównaniu z AA, IsoP są cząsteczkami o zniekształconej strukturze. Dlatego też, gdy pozostają one związane z błoną komórkową mogą wpływać na jej hydrofobowość, płynność oraz integralność [45, 88], sprzyjając ujawnieniu się cech typowych dla peroksydowanych lipidów [45]. W rezultacie, zmianie mogą ulec właściwości całych tkanek, co z kolei sprzyja rozwojowi przewlekłych stanów chorobowych [88].

F₂-IsoP mogą zostać uwolnione z błony komórkowej na skutek działania enzymów takich jak fosfolipaza A2 czy acetylohydrolaza czynnika aktywującego płytki (PAF-AH) [8]. Po dotarciu do krążenia ogólnego, IsoP podlegają częściowemu metabolizmowi, a następnie, zarówno niezmetylizowane IsoP jak i ich metabolity ulegają filtracji kłębuszkowej w nerkach i są wydalane w moczu [8]. Głównym metabolitem 15-F_{2t}-IsoP powstającym na drodze β-oksydacji jest 2,3-dinor-5,6-dihydro-15-F_{2t}-IsoP (nazywany również 15-F_{2t}-IsoP-M) [25].

Aktywność biologiczna wolnych F₂-IsoP (w tym 15-F_{2t}-IsoP) badano najczęściej w kontekście ich wpływu na mięśnie gładkie naczyń krwionośnych oraz płytki krwi (trombocyty) [45]. Ze względu na strukturalne podobieństwo do PGF₂, przypuszczano że F₂-IsoP powinny silnie oddziaływać z tzw. receptorem prostaglandynowym F [45]. Jednakże, na podstawie danych doświadczalnych postuluje się, iż działanie F₂-IsoP ujawnia się na skutek ich interakcji z receptorem tromboksanu (TPR) i/lub z hipotetycznym receptorem izoprostanowym (ISR), który ma wykazywać podobieństwo do TPR i być wrażliwym na działanie antagonistów TPR [45, 88]. W badaniach na trombocytach wykazano, że 15-F_{2t}-IsoP wiąże się z resztami aminokwasowymi Phe184, Asp193 i Phe196 receptora TPR. Ten ostatni aminokwas ma stanowić unikalne miejsce wiązania 15-F_{2t}-IsoP w obrębie TPR [50].

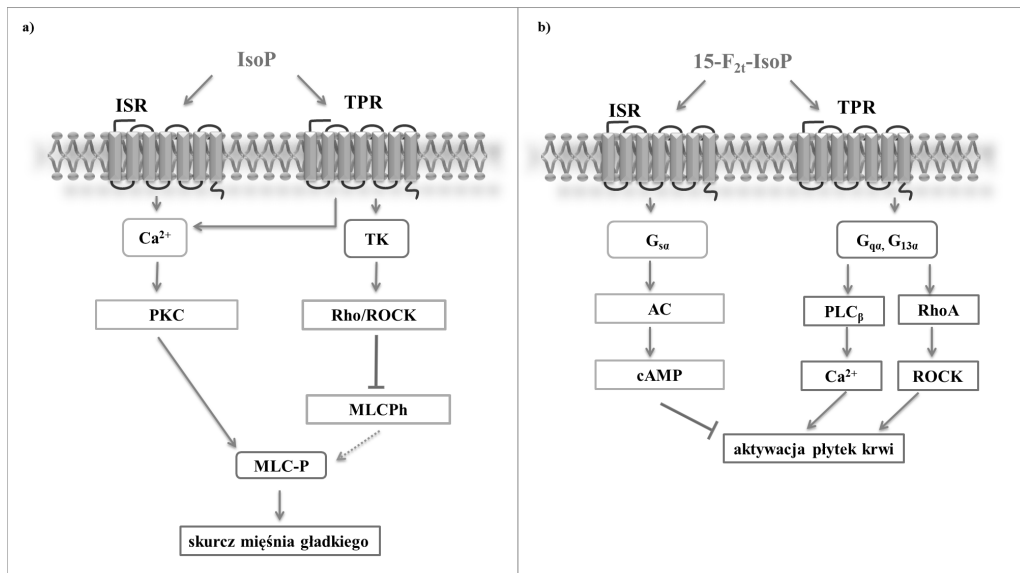
WPLYW IZOPROSTANÓW NA MIĘŚNIE GŁADKIE NACZYŃ KRWIONOŚNYCH

Aktywność biologiczna 15-F_{2t}-IsoP badano po raz pierwszy w nerkowych naczyniach krwionośnych szczurów, gdzie związek ten w stężeniach nanomolowych wykazał zależne od dawki działanie obkurczające naczynia krwionośne (działanie wazokonstrykcyjne) [45, 65]. Efektu takiego nie zaobserwowano po podaniu takich

samych dawek PGF₂ oraz biologicznie aktywnego metabolitu PGD₂, 9 α ,11,8,-PGF₂ [65]. Zauważono, że na sposób w jaki PG i IsoP oddziałują z receptorami błonowymi może wpływać odmienność ich struktury przestrzennej. PG mają kształt klina, IsoP natomiast są płaskimi, gęsto upakowanymi cząsteczkami [45]. Ponadto, badania króliczych naczyń krwionośnych wykazały, iż 15-F_{2t}-IsoP nasila wazokonstrykcyjne działanie podprogowych stężeń noradrenaliny i angiotensyny II. Ponieważ działania takiego nie zaobserwowano w przypadku 15-F_{3t}-IsoP, wysunięto hipotezę, iż zdolność do obkurczania naczyń krwionośnych może być zależna od ilości wiązań podwójnych w łańcuchach bocznych IsoP [80]. Rycina 3a przedstawia schemat modelu oddziaływań IsoP receptorami błon komórkowych mięśni gładkich naczyń krwionośnych.

WPLYW IZOPROSTANÓW NA TROMBOCYTY

Wykazano, że 15-F_{2t}-IsoP działa jak częściowy agonista ludzkich trombocytów, powodując zmianę ich kształtu, lecz bez nieodwracalnej agregacji, czy też uwalniania substancji zmagazynowanych w ziarnistościach płytkowych [70]. W badaniach *in vitro*, zastosowanie wysokich stężeń 15-F_{2t}-IsoP (> 20 μ M) powodowało słabą, odwracalną agregację płytek krwi. Natomiast niższe stężenia 15-F_{2t}-IsoP (10 nM -10 μ M), stymulowały działanie agonistów płytek np. kolagenu, difosforanu adenozy (ADP), AA, analogów tromboksanu A2 (I BOP) i PG H₂ (U46619) obecnych w stężeniach podprogowych, wywołując w efekcie nieodwracalną agregację płytek [74]. Sądzi się, że synergizm pomiędzy różnymi agonistami płytek krwi wiąże się z aktywacją kaskady sygnałowej jonów Ca²⁺, a wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca²⁺ wywołany przez jednego z agonistów, wzmacnia odpowiedź płytek na działanie kolejnego [78]. Takie oddziaływania mogą mieć szczególnie istotne znaczenie w stanach chorobowych, w których aktywacja płytek i generacja FR zbiegają się w czasie [74]. Wykazano jednak, że stężenia IsoP w osoczu krwi, nawet w stanach stresu oksydacyjnego, są na poziomie daleko poniżej tych, które mogłyby modulować funkcjonowanie płytek krwi. Podczas gdy 15-F_{2t}-IsoP w osoczu zdrowych ochotników wahało się między 31 pmol/l a 65 pmol/l (mediana: 48 pmol/l), to stężenie u pacjentów z marskością wątroby wynosiło od 57 pmol/l do 204 pmol/l (mediana: 147 pmol/l) [74]. Należy zauważyć, że są to stężenia całkowite w osoczu i niewykluczone, że są one istotnie wyższe lokalnie w miejscu, w którym wystąpił stres oksydacyjny [45]. Jednakże, nawet jeśli ilości IsoP w osoczu są rzeczywiście tak niskie, 15-F_{2t}-IsoP mógłby aktywować trombocyty płytek przez synergistyczne działanie z innymi agonistami, co jak wydaje się może zachodzić lokalnie w sposób charakterystyczny dla działania autakoidów [23]. Taki mechanizm działania 15-F_{2t}-IsoP wymagałby dostarczania jego skoncentrowanych ilości do docelowego receptora [74]. Mogłoby to następować w momencie odrywania mikropęcherzyków, pełniących rolę mediatorów, od zaktywowanych płytek krwi [74], lub poprzez selektywną inkorporację do błony komórkowej uprzednio wydzielonych IsoP [88].



RYCINA 3. Schematy prezentujące oddziaływania izoprostanów z receptorami błonowymi na powierzchni a) mięśni gładkich naczyń krwionośnych [37]: oddziaływanie izoprostanów (IsoP) z hipotetycznym receptorem dla IsoP (ISR) mogłoby prowadzić do podwyższenia wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} , aktywacji kinazy białkowej C (PKC) i powstania ufosforylowanych łańcuchów lekkich miozyny (MLC-P), a w konsekwencji do skurczu mięśnia gładkiego. Oddziaływanie IsoP z receptorem tromboksanu (TPR) prawdopodobnie angażuje kinazę tyrozynową (TK), białko Rho oraz kinazę zależną od białka Rho (ROCK), co prowadzi do fosforylacji, a tym samym zmniejszenia aktywności fosfatazy łańcucha lekkiego miozyny (MLCPh). W efekcie MLC-P nie ulegają defosforylacji, co podtrzymuje skurcz mięśni gładkich. Mechanizm oddziaływania przez TPR prowadzi też do zwiększenia wewnątrzkomórkowej ilości jonów Ca^{2+} ; **b) płytek krwi [50, 88]:** potencjalne oddziaływania 15-F_{2t}-IsoP z hipotetycznym ISR związanym z białkiem G_s, mogłyby indukować sygnał hamujący aktywację płytek poprzez aktywację cyklazy adenylowej (AC) i wzrost ilości cyklicznego adenozylo mono fosforanu (cAMP), mechanizm ten jest jeszcze słabo poznany. Oddziaływanie 15-F_{2t}-IsoP z TPR związanym z białkami G_q oraz G₁₃ może prowadzić do aktywacji płytek krwi poprzez aktywację fosfolipazy C beta (PLCβ) prowadzącą do wzrostu stężenia Ca^{2+} (sygnalizacja poprzez G_q) oraz poprzez aktywację białek RhoA i ROCK. Warto zauważyć, że pierwszą oznaką aktywacji płytek krwi jest zmiana ich kształtu wywołana m.in. przez MLC-P

FIGURE 3. Diagrams showing the interaction of isoprostanos with membrane receptors on the surface of a) smooth muscle of blood vessels [37]: the interaction of isoprostane (IsoP) with the hypothetical IsoP receptor (ISR) could lead to an increase in intracellular Ca^{2+} , protein kinase C (PKC) activation and rise of phosphorylated myosin light chains (MLC-P) and, consequently, smooth muscle contraction. The interaction of IsoP with the thromboxane receptor (TPR) is likely to involve tyrosine kinase (TK), Rho protein, and Rho-associated protein kinase (ROCK), leading to phosphorylation, and thus reduced activity, of myosin light chain phosphatase (MLCPh). As a result, MLC-P is not dephosphorylated, which supports smooth muscle contraction. The mechanism of action by interaction with TPR also leads to an increase in intracellular amount of Ca^{2+} . **b) blood platelets [50, 88]:** Potential interaction of 15-F_{2t}-IsoP with a hypothetical ISR coupled with G_s protein, could induce platelet inhibitory signal by activating adenylyl cyclase (AC) and increasing cyclic adenosine monophosphate (cAMP), yet this mechanism is still poorly understood. Interaction 15-F_{2t}-IsoP with TPR coupled with G_q and G₁₃ proteins may lead to activation of platelets by activation of phospholipase Cβ (PLCβ) leading to increased Ca^{2+} concentration (G_q signaling) and by activation of RhoA and ROCK. It is noteworthy that the first sign of platelet activation is the change in their shape induced among others by MLC-P

Na drodze słabo jeszcze poznanego mechanizmu, 15-F_{2t}-IsoP generują również sygnały hamujące trombocyty. Mechanizm ten mógłby uwzględnić oddziaływanie 15-F_{2t}-IsoP z hipotetycznym ISR [50].

Rycina 3b przedstawia schemat modelu oddziaływań IsoP receptorami błon komórkowych trombocytów.

POMIAR STĘŻENIA IZOPROSTANÓW

MATERIAŁ BIOLOGICZNY

Pomiar endogennego stężenia F₂-IsoP może obejmować oznaczanie: (1) *wolnych, niezmetabolizowanych IsoP* w płynach biologicznych takich jak np. osocze krwi, mocz, płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn owodniowy, żółć, płyn z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego, kondensat powietrza wydychanego (EBC) czy płwocina indukowana; (2) *IsoP związanych z fosfolipidami* w pozyskanych bioptatach, lipoproteinach i elementach morfotycznych krwi; oraz (3) *metabolitów IsoP* wydalanych w moczu [20, 44, 52, 63]. Do przeprowadzenia ilościowej analizy wystarczy już ok. 0.2 – 1 ml wybranego płynu biologicznego (np. osocza, moczu), 50-100 mg tkanki stałej lub 1-5 miliona komórek [92]. Jednakże, oznaczanie produktów peroksydacji lipidów wymaga zazwyczaj nawet kilku etapów ich ekstrakcji z matrycy biologicznej przed wykonaniem właściwego pomiaru [92]. Ponadto, aby oznaczyć całkowitą ilość IsoP (wolnych niezmetabolizowanych oraz związanych z fosfolipidami) w osoczu oraz tkankach stałych, potrzebne jest uprzednie wydzielenie fosfolipidów z powierzchni błon komórkowych, które poddaje się następnie saponifikacji (reakcji hydrolizy estrów w środowisku zasadowym) w celu uwolnienia zestryfikowanych IsoP [20, 62].

Ze względu na łatwość oraz niewielką inwazyjność pozyskania materiału, pomiar IsoP najczęściej wykonywany jest w osoczu krwi i w moczu [63], płynach ustrojowych które mogą odzwierciedlać stan stresu oksydacyjnego panujący w całym organizmie [62]. Jednak zdaniem niektórych, mierząc IsoP w tych płynach traci się informację o miejscu ich pochodzenia [39]. Warto nadmienić, iż za kluczową wadę analizy tych związków w osoczu (oraz innych płynach biologicznych i tkankach zawierających lipidy) powszechnie uznaje się ryzyko sztucznego powstawania IsoP [57] lub PG [13] w trakcie pozyskiwania, przetwarzania czy przechowywanie analitu. W związku z tym, zalecane jest stosowanie różnego rodzaju środków zapobiegawczych zmniejszających prawdopodobieństwo powstania artefaktów (część z nich przedstawiono w tabeli 2). Istnieje także szerokie przekonanie, że analiza IsoP w moczu oferuje liczne korzyści, w tym: (1) łatwość pozyskania dużych ilości próbki [96]; (2) stężenie IsoP w moczu jest wyższe niż w osoczu krwi [96]; (3) w przeciwieństwie do osocza krwi oraz tkanek stałych, IsoP oraz ich metabolity występują w moczu w postaci wolnej [79], co ułatwia/

przyspiesza przygotowanie próbki do analizy [57]; (4) IsoP obecne w moczu, jak też ich metabolity, nie powstają na drodze autooksydacji [25, 79]; (5) jak wykazano, w moczu IsoP pozostają stabilne do 5 dni w temperaturze pokojowej, zatem nie ma konieczności stosowania specjalnych środków podczas przechowywania próbek [79]. Tradycyjnie, ilość IsoP w moczu wyrażana jest na jednostkę kreatyniny (pg/mg kreatyniny lub ng/mg kreatyniny) [46].

Z powodu rozbieżności w wynikach oznaczania zawartości IsoP w osoczu i moczu (wraz z metabolitami), proponuje się aby pomiarów dokonywać w obu tych płynach jednocześnie. Sugeruje się, że postępowanie takie powinno zapewnić kompletny obraz stanu oksydacyjnego organizmu [63]. Należy jednak mieć świadomość, że obraz ten może być zaburzony u osób z chorobami nerek powiązanych ze stresem oksydacyjnym, kiedy to bezpośrednio do moczu wydalana jest dodatkowa porcja niezmetylizowanych IsoP [20].

TABELA 2. Zalecane środki minimalizujące ryzyko powstawania artefaktów w materiale biologicznym podczas analizy izoprostanów [5, 20, 62]

TABLE 2. Recommended measures to minimize the risk of artefact formation in biological material during analysis of isoprostanes [5, 20, 62]

Rekomendowane środki zapobiegawcze	Referencje
KREW/ OSOCZE KRWI	
Pobieranie krwi ze szczególną ostrożnością, tak aby nie doprowadzić do hemolizy (uwolnione na skutek hemolizy żelazo może utleniać obecne we krwi lipidy).	[20]
Pobieranie krwi do próbek z wersenianem dwusodowym (EDTA) z dodatkiem butylowanego hydroksytoluenu i glutationu. Krew może być pobierana zarówno w temperaturze 4°C jak i pokojowej, a następnie przechowywana do 4h przed dalszą analizą.	[5]
Dodanie niesteroidowego leku przeciwzapalnego (NLPZ) np. indometacyny do próbek, do której pobierana jest krew. Dodatek NLPZ zahamuje tworzenie się <i>ex vivo</i> prostaglandyn (PG), które mogłyby zakłócać pomiar izoprostanów (IsoP).	[13]
Przechowywanie krwi w niskiej temperaturze aż do wirowania.	[20]
Przechowywanie osocza w temperaturze -80°C, przez możliwie jak najkrótszy czas.	[5]
PLYNY BIOLOGICZNE, TKANKI STAŁE	
Przetworzenie próbki płynu biologicznego / tkanki stałej od razu po pozyskaniu.	[62]
Dodanie substancji o właściwościach przeciwutleniających i/lub redukujących np. butylowanego hydroksytoluenu i/lub trifenylfosfory do roztworów organicznych stosowanych w trakcie procesu ekstrakcji i saponifikacji.	[62]
Próbki nieanalizowane od razu po pobraniu, należy zamrozić przy użyciu ciekłego azotu, co w przypadku tkanek stałych pozwala na jednoczesne zamrożenie całej objętości materiału biologicznego. Następnie próbkę należy przechowywać w -70°C.	[62]

METODY POMIAROWE

Można wyróżnić dwie grupy metod analizy ilościowej IsoP: (1) *spektrometrię mas (MS) połączoną z technikami separacyjnymi (metody instrumentalne)*; oraz (2) *testy immunologiczne* [9].

Metody instrumentalne

W tej grupie metod można wymienić: MS i tandemową spektrometrię mas (MS/MS), które poprzedzone są chromatografią gazową (GC) lub ciekową (LC), czyli GC-MS i LC-MS oraz GC-MS/MS i LC-MS/MS [17, 92]. Zastosowanie technik separacyjnych przed analizą złożonych mieszanin za pomocą MS pozwala zapobiec otrzymaniu skomplikowany, trudnych do interpretacji widm [85]. W przypadku oznaczania 15-F_{2t}-IsoP, rozdział chromatograficzny pozwala oddzielić ten związek od innych F₂-IsoP klasy III/serii 15, które mogą mieć podobne ścieżki fragmentacji [17]. MS/MS charakteryzuje się wyższą specyficznością niż MS, gdyż pomaga rozróżnić izomery IsoP o tej samej masie molekularnej, lecz o odmiennych ścieżkach fragmentacji [17].

GC-MS to metoda pomiarowa o sub-pikogramowym poziomie czułości [9], która jako pierwsza znalazła zastosowanie w ocenie ilościowej IsoP [96] i do dziś uważana jest za referencję dla innych metod pomiaru tych związków [10, 75, 82]. Ustalone za jej pomocą wyjściowe stężenie F₂-IsoP w osoczu i moczu osób zdrowych wynosi odpowiednio 35 ± 6 pg/ml i 1.6 ± 0.6 ng/mg kreatyniny [62]. Metody GC-MS oraz GC-MS/MS z wykorzystaniem ujemnej jonizacji chemicznej (NICI), czyli odpowiednio GC-NICI-MS oraz GC-NICI-MS/MS, uznaje się za techniki niezawodne w ocenie IsoP [9]. Natomiast GC-MS z wykorzystaniem jonizacji typu elektrorozpylania (ESI), czyli GC-ESI-MS, jest według jej twórców, przydatna do specyficznego oznaczania w moczu F₂-IsoP serii 15, a w szczególności 15-F_{2t}-IsoP [9]. GC-ESI-MS charakteryzuje się niższą czułością niż GC-NICI-MS, ze względu na silną fragmentację badanego związku [9]. GC-MS oraz GC-MS/MS wymagają odpowiedniego przygotowania próbki biologicznej, która musi zostać poddana ekstrakcji do fazy stałej (SPE) z wykorzystaniem adsorbentów w postaci C₁₈ i/lub krzemionki, oczyszczeniu za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC), dwóm etapom derywatywacji (chemicznej konwersji) oraz kilkukrotnemu suszeniu i rekonstytucji [57]. Niektóre procedury oczyszczania nie wymagają TLC, a derywatywacja jest jednoetapowa [9]. Wskazuje się, iż tak rozbudowana procedura przygotowania próbki jest nie tylko kosztowna i czasochłonna, ale może także prowadzić do powstania zanieczyszczeń i artefaktów [57, 82]. Pomimo, iż GC-MS uznawana jest za metodę czułą i specyficzną [3], to jak wykazano nie pozwala ona na rozróżnienie poszczególnych izomerów IsoP [62]. GC-MS mierzy F₂-IsoP o czasach retencji analogicznych do standardu wewnętrznego (15-F_{2t}-IsoP-d4), czyli oprócz 15-F_{2t}-IsoP są to także: 8-iso-(15R)-PGF_{2α} oraz 9b,11a-PGF_{2α} [75, 83]. Fakt ten może tłumaczyć różnice w ilości 15-F_{2t}-IsoP zmierzonych za pomocą GC-MS w porównaniu z LC-MS/MS czy immunoenzymatycznym testem

fazy stałej (ELISA) [83]. Jak wykazano, specyficzność oznaczeń 15-F_{2t}-IsoP metodą GC-NICI-MS/MS można znacznie poprawić stosując uprzednie oczyszczanie próbki metodą chromatografii immunopowinowactwa (IAC) [89].

Obecnie, za preferowaną alternatywę GC-MS w oznaczaniu IsoP uchodzi LC-MS, a szczególnie z zainteresowaniem cieszy się LC-MS/MS [3]. Istnieją jednak obawy odnośnie limitu detekcji IsoP za pomocą tej metody, który jest zwykle dużo wyższy niż dla GC-MS [62]. Połączenie wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) i MS/MS z jonizacją typu ESI, czyli HPLC-ESI-MS/MS, charakteryzuje się specyficznością podobną do GC-NICI-MS oraz limitem detekcji wynoszącym 5 pg [87]. Warto zauważyć, że w pomiarach spektrometrycznych poprzedzonych LC, próbka nie wymaga derywatywacji jak w metodach połączonych z GC, a jej przygotowanie obejmuje pojedynczy etap ekstrakcji [92] np. SPE [96], ekstrakcji typu ciecz-ciecz [3] lub oczyszczania za pomocą IAC [57, 96]. Ostatni z wymienionych sposobów oczyszczania powinien umożliwić analizę tylko jednego izomeru IsoP [57], lecz w niektórych pracach obserwowano jednak występowanie reakcji krzyżowych, co ujawniało się w postaci dodatkowych pików w widmie masowym [17, 83]. Niemniej jednak, wysoka czułość, łatwość oraz krótki czas przygotowania próbki, wraz z dobrą korelacją z GC-MS sprawiają, że LC-MS/MS staje się złotym standardem ilościowych oznaczeń IsoP [79, 96].

Testy immunologiczne

Testy immunologiczne stosowane w analizie IsoP opierają się na reakcji antygen-przeciwciała oraz zjawisku współzawodnictwa. Wykrywany antygen (badany IsoP) współzawodniczy o przyłączenie się do specyficznego przeciwciała ze swoją odpowiednio znakowaną wersją, wprowadzoną do układu pomiarowego przez badacza w znanej ilości. Przyjmuje się, że ilość znakowanego antygeny związanego z przeciwciałem jest odwrotnie proporcjonalna do ilości IsoP w badanym materiale [13, 54]. W zależności od rodzaju stosowanego znacznika, wyróżnia się: (1) *testy radioimmunologiczne* (RIA), w których znacznikiem jest izotop promieniotwórczy, oraz (2) *testy immunoenzymatyczne* (EIA), w których znacznikiem jest stabilny enzym zdolny do katalizowania reakcji, w wyniku której powstaje barwny produkt [44, 92]. Zasada działania EIA jest bardzo podobna do ELISA, dlatego też często te dwa terminy używane są zamiennie [33].

Jeden z niekomercyjnych testów RIA opracowanych do detekcji 15-F_{2t}-IsoP w próbkach moczu i osocza, wykazywał limit detekcji na poziomie 23 pmol/l, z bardzo niskim stosunkiem reakcji krzyżowych i dobrą korelacją z GC-MS [7]. Pomimo licznych zalet (niskie koszty, wysoka specyficzność, czułość i łatwość przygotowania próbki [44]), według najlepszej wiedzy autorów, obecnie brak jest komercyjnych zestawów RIA przeznaczonych do oznaczania IsoP. Metoda ta ma jednak istotne ograniczenie polegające na narażaniu wykonawcy na radioaktywność (do znakowania antygeny stosowany jest izotop [³H]) [87]. Dlatego też RIA jest w praktyce laboratoryjnej zastępowany przez test ELISA [54].

TABELA 3. Porównanie wybranych zestawów ELISA do ilościowego oznaczania 15-F_{2t}-IsoP (opracowanie wykonane na podstawie dostępnych materiałów ze stron internetowych producentów [1, 2, 26, 27, 29] oraz danych z piśmiennictwa [4, 22])

TABLE 3. Comparison of selected ELISA kits for quantitative determination of 15-F_{2t}-IsoP (based on available materials from manufacturers' web sites [1, 2, 26, 27, 29] and literature data [4, 22])

Abcam (nr kat. ab175819)	Cayman Chemicals (nr kat. 516351)	Enzo (nr kat. ADI-900-091)	Enzo (nr kat. ADI-900-010)
Materiał biologiczny			
Mocz, osocze, surowica, homogenat komórkowy, tkanki [1, 2]	Mocz, osocze, tkanki, materiał pobrany za pomocą aspiracji lub płukania, pożywka z hodowli komórkowych [13]	Osocze, surowica, tkanki [27, 29]	Mocz, pożywka z hodowli komórkowych, tkanki [28]
Czułość			
1 pg/ml [1, 2]	3 pg/ml ¹ [13]	40.0 pg/ml ¹ [29]	16.3 pg/ml ¹ [28]
Zakres			
0.005 ng/ml - 5 ng/ml [1]	0.8 - 500 pg/ml [13]	160 - 100,000 pg/ml [29]	6.1 - 100,000 pg/ml [28]
Zalecane substancje przeciwutleniające, inhibitory COX			
trifenylofosfina ² [2]	0.005% BHT ^{3,4} [13]	Nie dotyczy	indometacyna, kwas mefenamowy ² [26]
Reakcje hydrolizy przed analizą próbeki			
Saponifikacja ⁵ [2]	Saponifikacja ⁵ [13]	Saponifikacja ⁵ [27]	Nie dotyczy
Dodatkowe oczyszczanie próbeki (ekstrakcja lub chromatografia immunopowinowactwa)			
<i>Homogenat komórkowy, osocze, surowica, tkanki: ekstrakcja ciecz-ciecz</i> [2]	SPE lub IAC ⁶ [13]	Nie dotyczy	<i>Tkanki:</i> SPE [26]
Przeciwciała			
Przeciwciało anty - 15-F _{2t} -IsoP [1]	<i>Pierwszorzędowe:</i> królicze poliklonalne przeciwciało anty-15-F _{2t} -IsoP [13] <i>Drugorzędowe:</i> mysie monoklonalne przeciwciało antykrólicze [13]	<i>Pierwszorzędowe:</i> królicze poliklonalne przeciwciało anty-15-F _{2t} -IsoP [26, 27] <i>Drugorzędowe:</i> Kozie poliklonalne przeciwciało antykrólicze [26, 27]	

Abcam (nr kat. ab175819)	Cayman Chemicals (nr kat. 516351)	Enzo (nr kat. ADI-900-091)	Enzo (nr kat. ADI-900-010)
Reakcja kolorymetryczna			
<u>Reakcja enzymatyczna:</u> <i>Enzym:</i> Peroksydaza chrzanowa <i>Substrat:</i> tetrametylobenzydyna ⁷ [2] <i>Produkt:</i> utleniona forma tetrametylobenzydiny (koloru żółtego) [4] <u>Pomiar gęstości optycznej:</u> $\lambda = 450$ nm [2]	<u>Reakcja enzymatyczna⁸:</u> <i>Enzym:</i> acetylocholinoesteraza [13] <i>Substrat:</i> acetylocholina (w odczynniku Ellmana) [13] <i>Produkt:</i> tiocholina [13] <u>Reakcja nieenzymatyczna⁸:</u> <i>Substrat 1:</i> tiocholina [13]; <i>substrat 2:</i> kwas 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowym) (w odczynniku Ellmana) [13] <i>Produkt:</i> kwas 5-tio-2-nitrobenzoesowy (koloru żółtego) [13] <u>Pomiar gęstości optycznej:</u> $\lambda = 412$ nm [13]	<u>Reakcja enzymatyczna:</u> <i>Enzym:</i> Fosfataza zasadowa [26, 27] <i>Substrat:</i> fosforan p-nitrofenylu [26, 27] <i>Produkt:</i> p-nitrofenol (koloru żółtego) [22] <u>Pomiar gęstości optycznej:</u> $\lambda = 405$ nm [26, 27]	

¹ Definicje czułości testu przedstawione są w materiałach informacyjnych na stronach producentów testów [13, 26, 27]; ² Podczas przetwarzania niektórych próbek [2, 27]; ³ Przy przechowywaniu materiału biologicznego w -80°C [13]; ⁴ Przy homogenizacji tkanek [13]; ⁵ Stosowana przed pomiarem całkowitej ilości IsoP w homogenatach komórkowych, tkankowych, krwi, osoczu. ⁶ Próbki materiału biologicznego pobranego za pomocą aspiracji lub płukanki, moczu, medium z hodowli komórkowych wymagają zwykle jedynie odpowiedniego rozcieńczenia. Producent testu zaleca oczyszczanie tych materiałów biologicznych w przypadku uzyskania niespójnych wyników [13]; ⁷ Zgodnie z opisanym w piśmiennictwie mechanizmem utlenienia tetrametylobenzydiny, w reakcji enzymatycznej katalizowanej przez peroksydazę chrzanową, tetrametylobenzydyna odgrywa rolę donora wodoru dla nadtlenu wodoru. Tetrametylobenzydyna ulega utlenieniu, a nadtlenek wodoru ulega redukcji do wody [4]; ⁸ W wyniku reakcji enzymatycznej, acetylocholinoesteraza powoduje hydrolizę acetylocholino (znajdującej się w odczynniku Ellmana) do tiocholiny. Następnie, w wyniku nieenzymatycznej reakcji między tiocholimą a kolejną składową odczynnika Ellmana, kwasem 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowym), powstaje kwas 5-tio-2-nitrobenzoesowy [13]

W porównaniu z metodami instrumentalnymi, zaletą ELISA jest wysoka przepustowość i niższe koszty oprzyrządowania pomiarowego [92]. Istotną wadą analizy F_2 -IsoP za pomocą ELISA jest występowanie reakcji krzyżowych [92], które wynikają z faktu, iż związki te łączy wspólny element strukturalny, a mianowicie pierścień 1,3-syn-hydroksypentanowy, który determinuje ich właściwości antygenowe [53]. ELISA wymaga też intensywnego oczyszczania niektórych złożonych próbek biologicznych [53] takich jak surowica, osocze czy homogenaty tkanek [2, 13, 26]. Poprawę selektywności ELISA względem 15 F_{21} -IsoP uzyskano stosując

wstępne oczyszczanie próbki metodą IAC lub SPE [83]. Zgodnie z instrukcjami producentów wielu komercyjnych zestawów ELISA, w przypadku analizy IsoP w próbkach moczu, etap oczyszczania materiału może zostać pominięty [1, 26].

Kolejną kwestią dotyczącą przydatności stosowania testów ELISA do analizy IsoP są doniesienia wskazujące, iż wyniki otrzymane za pomocą tej metody słabo korelują z GC-MS [10, 15, 75]. Przyczyny niezgodności można upatrywać w tym, że metody te mogą wykrywać inny zestaw związków. W GC-MS, oprócz 15-F_{2t}-IsoP wykrywane są dodatkowo dwa jego izomery, natomiast związki wykrywane za pomocą ELISA zależą od swoistości stosowanego przeciwciała [10, 75, 83]. Dlatego też, niektórzy badacze postulują, aby unikać porównywania danych klinicznych uzyskanych przy użyciu tych dwóch metod [10]. Ponadto, zaobserwowano występowanie niezgodności pomiędzy wynikami uzyskanymi przy użyciu komercyjnych zestawów ELISA różnych producentów [53], co może wynikać z odmiennych zaleceń odnośnie przygotowania próbki, ogólnego schematu analitycznego (patrz tab. 3), i/lub swoistości stosowanych przeciwciał [53].

Warto nadmienić, iż w 2016 ukazała się praca opisująca możliwość wykorzystania do pomiaru IsoP elektrochemicznych immunoczuJNIKÓW wykorzystujących układ reakcyjny podobny do tego stosowanego w ELISA, w którym znacznikiem antygeny jest peroksydaza chrzanowa [81]. W układzie tym, specyficzne przeciwciało anty-IsoP umieszczone jest na powierzchni elektrody węglowej. Oznaczenie ilościowe wykorzystuje amperometryczny pomiar natężenia prądu wytworzonego w trakcie reakcji redoks zachodzącej z udziałem peroksydazy chrzanowej (enzym), nadtlenu wodoru (substrat) i hydrochinonu (mediator reakcji redoks) [81].

POTENCJALNE ZNACZENIE DIAGNOSTYCZNE IZOPROSTANÓW NA PRZYKŁADZIE CHORÓB PŁUC

STRES OKSYDACYJNY W PŁUCACH

Ze względu na swoje funkcje, płuca są bezpośrednio narażone na wysokie stężenia tlenu oraz stres oksydacyjny, będący efektem normalnych procesów metabolicznych oraz narażenia na powietrze zawierające substancje drażniące oraz zanieczyszczenia, np. dym papierosowy [14]. Do najważniejszych mechanizmów chroniących płuca przed stresem oksydacyjnym zalicza się aktywność: (1) dysmutaz ponadtlennokowych, konwertujących anionorodnik ponadtlennokowy do mniej reaktywnego nadtlenu wodoru, H₂O₂; (2) katalazy redukującej H₂O₂ do wody oraz (3) peroksydazy glutationowej, redukującej H₂O₂ do wody przy pomocy glutationu [51, 69]. Stres oksydacyjny wynikający z zaburzenia równowagi między pro- i antyoksydantami w płucu [93] łączony jest z patogenezą poważnych schorzeń układu oddechowego takich jak np.

astma, idiopatyczne zwłóknienie płuc, choroba ziarniniakowa płuc [51], przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP) [43], czy rak płuca [31].

Pojawienie się w płucu prooksydantów (np. na skutek palenia tytoniu) aktywuje komórki nieswoistej odpowiedzi odpornościowej oraz prowadzi do uwolnienia endogennych alarmin przez uszkodzone komórki nabłonka płuc. W konsekwencji rozwija się stan zapalny, a w komórkach nabłonka i makrofagach dochodzi do aktywacji wielu prozapalnych czynników transkrypcyjnych np. czynnika transkrypcyjnego κB (NF- κB) czy AP-1, syntezy cytokin takich jak interleukina-6, interleukina-8 oraz czynnik martwicy nowotworu (TNF- α) [58]. Wzrost stężenia cytokin prozapalnych przyciąga do ogniska zapalnego kolejne neutrofile oraz makrofagi zdolne to wytwarzania RFT i nasilania istniejącego stanu zapalnego [58, 76].

NIEDROBNOKOMÓRKOWY RAK PŁUCA

Niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC), najczęstszy rodzaj nowotworu złośliwego tego narządu (80% przypadków), cechuje bardzo złe rokowanie [34]. Jest to związane z faktem, że większość przypadków NSCLC jest rozpoznawana w zaawansowanych stadiach choroby, czego głównych przyczyn należy upatrywać w braku swoistych objawów oraz wiarygodnych bio-wskaźników umożliwiających wczesne rozpoznanie choroby [40]. Narodowy Program Badań Przesiewowych w Raku Płuca, sponsorowany przez Narodowy Instytut Onkologii w Stanach Zjednoczonych wykazał, że wdrożenie do badań przesiewowych w kierunku raka płuca niskodawkowej tomografii komputerowej (CT), zamiast tradycyjnego badania radiologicznego klatki piersiowej, może pozwolić na zmniejszenie względnego ryzyka zgonu o 20% w populacji badanej. Warto jednak zauważyć, że procedura CT jest kosztowna oraz charakteryzuje ją wysoka częstość wyników fałszywie pozytywnych [72]. W publikacji z 2016 roku Europejska Grupa Ekspertów ds. procedur diagnostycznych w NSCLC rekomenduje, aby u osób z podejrzeniem raka płuca powziętym na podstawie nieprawidłowości w obrazie CT wykonać biopsję tkanki płucnej, celem potwierdzenia rozpoznania. Dlatego też, aby zmniejszyć ilość poważnych interwencji medycznych, Eksperci wskazują na potrzebę znalezienia bio-wskaźników molekularnych, które pozwoliłyby na: (1) zidentyfikowanie, którzy palacze (aktywni, byli) odniosą korzyść z corocznych badań przesiewowych metodą CT; (2) rozróżnienie wykrytych w obrazowaniu CT zmian o charakterze łagodnym od zmian złośliwych [24].

Z racji tego, że komórki rakowe pozostają w stanie trwałego stresu oksydacyjnego [36], jako potencjalne bio-wskaźniki tej choroby wskazuje się RFT lub produkty ich aktywności [14, 18, 84]. Pomiar poziomu dialdehydu malonowego w krwi pełnej [31] oraz 15-F_{2t}-IsoP w surowicy krwi [18] potwierdziły, że u osób z rakiem płuca dochodzi do nasilonej peroksydacji lipidów. Wyższe

stężenie 15-F_{2t}-IsoP w moczu powiązано z podwojeniem ryzyka rozwoju raka płuca u mężczyzn, niezależnie od statusu palenia [30]. Podobnie, u chorych w zaawansowanym stadium NSCLC (IIIB-IV), niezależnie od statusu palenia, wykryto wyższy poziom F₂-IsoP (w tym 15-F_{2t}-IsoP) niż u osób zdrowych [14, 18]. Jednakże, zmiany te były albo statystycznie nieistotne [14], albo ujawniały się tylko w niektórych z przebadanych płynów biologicznych (w surowicy, lecz nie w EBC) [18]. W związku z powyższym zaproponowano, że oznaczanie stężenia 15-F_{2t}-IsoP w surowicy (ale nie w EBC) mogłoby służyć do detekcji zaawansowanego raka płuca [18].

STRES OKSYDACYJNY A NOWOTWÓR PŁUCA ORAZ POTENCJALNA ROLA IZOPROSTANÓW

Terapie przeciwnowotworowe generujące reaktywne formy tlenu

Warto zauważyć, że RFT mogą zarówno hamować, jak i promować rozwój nowotworów [35]. Wiadomo, że umiarkowany wzrost poziomu RFT może uruchamiać proces proliferacji, natomiast jego wzrost przewyższający zdolności adaptacyjne komórek sprzyja aktywacji śmierci komórkowej [21]. To ostatnie zjawisko towarzyszy działaniu pochodnych platyny [34] oraz większości innych chemioterapeutyków takich jak np. antracykliny, etopozyd, adriamycyny, bleomycyna, cyklofosfamid [59] stosowanych w standardowych schematach leczenia pierwszego rzutu we wczesnym i zaawansowanym NSCLC [35]. Działanie cytotoksyczne cisplatyny polega między innymi na tworzeniu przez nią adduktów z jądrowym DNA, które jeśli nie zostaną naprawione, powodują śmierć komórki w wyniku blokowania replikacji i transkrypcji. Do aktywności cytotoksycznej leku przyczyniają się też RFT generowane w mitochondrium na skutek oddziaływania cisplatyny z mitochondrialnym DNA [34]. Stosowaniu cisplatyny towarzyszy spadek ilości antyoksydantów w osoczu, co może świadczyć o ich zużyciu w trakcie walki ze stresem oksydacyjnym wywołanym działaniem leku [95]. Ponieważ poziom RFT generowany w czasie chemioterapii może przewyższyć potencjał antyoksydacyjny komórek nowotworowych, ale też aktywność anty-nowotworową całego organizmu, wydaje się że status antyoksydacyjny pacjentów onkologicznych może odgrywać istotną rolę w ich odpowiedzi na leczenie [34].

Uważa się, że komórki nowotworowe są przystosowane do warunków stresu oksydacyjnego [41]. Przykładowo, w nowotworach opornych na leczenie stwierdzono zwiększoną ekspresję enzymów mitochondrialnych, które wychwytyują RFT [61]. Dlatego też uważa się, że obiecującą strategią, także w leczeniu zmian opornych, mogłoby być połączenie klasycznej chemioradioterapii z czynnikiem blokującym mechanizmy adaptujące komórki nowotworowe do zmian stanu re-

doks (np. poprzez inhibicję metaboliczną lub blokowanie wybranych systemów antyoksydacyjnych) [35, 69]. Takie podejście miałyby minimalny wpływ na komórki zdrowe, gdyż ich podstawowy poziom RFT jest niższy w porównaniu z komórkami nowotworowymi [69].

Obecnie, w praktyce klinicznej nie wykorzystuje się bio-wskaźników, które mogłyby określić odpowiedź chorego na terapię generującą RFT [49]. Dotychczas podjęto nieliczne próby pomiaru ilości 15-F_{2t}-IsoP u pacjentów poddawanych leczeniu przeciwnowotworowemu. Wykazano przykładowo, że poziom 15-F_{2t}-IsoP w EBC chorych na NSCLC poddanych sześciu cyklom chemioterapii opartej o związki platyny lub taskany znacząco spadał u pacjentów z częściową odpowiedzią oraz w stadium IB-IIIIB. Badacze zasugerowali, że 15-F_{2t}-IsoP w EBC mógłby stanowić bio-wskaźnik odpowiedzi na chemioterapię pacjentów z NSCLC, natomiast podstawowy poziom 15-F_{2t}-IsoP mógłby służyć do oceny szansy rocznego przeżycia [84]. W innej pracy wykazano, że stężenie 15-F_{2t}-IsoP w moczu pacjentów z zaawansowanym NSCLC leczonych połączeniem cisplatyny z etopozydem lub paklitakselem z karboplatiną silnie wzrastało po drugim i trzecim cyklu chemioterapii. Jednak nie analizowano zależności między zmianą poziomu 15-F_{2t}-IsoP a odpowiedzią na leczenie [46].

Blokowanie cytoprotekcyjnej autofagii w warunkach akumulacji reaktywnych form tlenu

Mechanizmem cytoprotekcyjnym, który może chronić komórki nowotworowe przed cytotoksycznością leczenia przeciwnowotworowego jest proces autofagii [56]. Wykazano, że hamowanie autofagii sprzyja powstawaniu RFT w komórkach NSCLC, co zwiększa przepuszczalność błony mitochondrialnej i nasila apoptozę po podaniu cisplatyny [48]. Obecnie wiadomo, że w zależności od stadium oraz pochodzenia pierwotnego nowotworu, autofagia może hamować, jak i promować wzrost nowotworu. Uważa się, że na wczesnych etapach rozwoju nowotworu, autofagia może zapobiegać uszkodzeniom DNA i białek powodowanych przez RFT, tym samym hamując nowotworzenie [73]. Natomiast na etapie progresji i tworzenia przerzutów, autofagia eliminuje stres metaboliczny wywołany przez RFT oraz zapewnia niezbędne składniki odżywcze, zatem promuje wzrost nowotworu. Można więc przyjąć, że nowe strategie przeciwnowotworowe mogłyby opierać się o specyficzne inhibitory autofagii. Blokowanie cytoprotekcyjnej autofagii w warunkach akumulacji RFT pozwoliłoby na przesunięcie równowagi w komórkach nowotworowych w kierunku śmierci komórkowej i regresji nowotworu *in vivo*. Dlatego przewiduje się, iż w terapiach przyszłości, przed wdrożeniem leczenia, niezbędne będzie określenie indywidualnej charakterystyki guza na poziomie komórkowym (poziom autofagii, ilość RFT). Jak zasugerowano, do oceny poziomu RFT mógłby posłużyć pomiar 15-F_{2t}-IsoP oraz 15-F_{2t}-IsoP-M [73].

Biologiczna rola izoprostanów w drogach oddechowych

Warto także zauważyć, że zainteresowanie IsoP w odniesieniu do patofizjologii płuca nie ogranicza się do ich potencjalnego znaczenia jako bio-wskaźników. Związki te są obficie produkowane przez praktycznie każdy typ komórek płucnych, zarówno poprzez mechanizm aktywowany przez RFT uwalniane z komórek zapalnych obecnych w drogach oddechowych, jak też na drodze mechanizmu zależnego od COX. IsoP wywierają istotny biologicznie wpływ na drogi oddechowe oraz płucne naczynia krwionośne. Działania te mogą przyczyniać się do powstania objawów charakteryzujących wiele chorób płuca, takich jak np. niespecyficzną nadreaktywność mięśni gładkich, skurcz oskrzeli, nadciśnienie, obrzęk czy hipertrofia [45].

PODSUMOWANIE

IsoP są stabilnymi chemicznie, bezpośrednimi produktami peroksydacji fosfolipidów, które powstają *in vivo* niezależnie od składu diety i cyklu dobowego, oraz występują we wszystkich tkankach i płynach biologicznych ciała na możliwym do oznaczenia poziomie podstawowym. Wśród stosowanych metod pomiaru ilości IsoP wymienić można metody instrumentalne oraz testy immunoenzymatyczne.

Związanie IsoP z błoną komórkową sprzyja ujawnieniu się cech typowych dla obecności peroksydowanych lipidów, co może sprzyjać rozwojowi przewlekłych stanów chorobowych. Podwyższoną ilość F_2 -IsoP obserwuje się w wielu schorzeniach i procesach patologicznych powiązanych ze stresem oksydacyjnym, takich jak nowotwory, choroby układu oddechowego, choroby sercowo-naczyniowe, choroby metaboliczne i neurodegeneracyjne. W piśmiennictwie najczęściej opisywanym związkiem należącym do rodziny F_2 -IsoP jest $15-F_{2t}$ -IsoP. Pomiar stężenia tego związku jest powszechnie uważany za złoty standard w ocenie peroksydacji lipidów *in vivo*. $15-F_{2t}$ -IsoP wykazuje także aktywność biologiczną na skutek oddziaływania z TPR i z hipotetycznym ISR, co wzbudza zainteresowanie IsoP jako potencjalnymi mediatorami w patofizjologii różnych schorzeń.

Wnioskowanie o poziomie stresu oksydacyjnego na podstawie pomiaru $15-F_{2t}$ -IsoP, może w przyszłości znaleźć zastosowanie w ocenie zaawansowania niektórych chorób o etiologii powiązanej ze stresem oksydacyjnym (np. chorób układu oddechowego, w tym raka płuca), czy też oceny efektu terapeutycznego wdrożonego leczenia. Tym samym IsoP stanowią grupę interesujących cząsteczek o dużym potencjale w diagnostyce klinicznej.

PODZIĘKOWANIA

Praca została sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2013/09/B/NZ5/01815

LITERATURA

- [1] ABCAM. 8 isoprostane ELISA Kit (ab175819). <http://www.abcam.com/8-isoprostane-elisa-kit-ab175819.html> (05.07.2017)
- [2] ABCAM. ab175819-8 isoprostane ELISA Kit Instructions for Use. A competitive immunoenzymatic assay for the quantitative measurement of 8 isoprostane in urine, serum, plasma, cells and tissues. Version 4 Last Updated 26 October 2016. [http://www.abcam.com/ps/products/175/ab175819/documents/ab175819%20-%208%20isoprostane%20ELISA%20Kit%20-%20%20protocol%20v4%20\(website\).pdf](http://www.abcam.com/ps/products/175/ab175819/documents/ab175819%20-%208%20isoprostane%20ELISA%20Kit%20-%20%20protocol%20v4%20(website).pdf) (05.07.2017).
- [3] ASZYK J, KOT J, TKACHENKO Y, WOŹNIAK M, BOGUCKA-KOCKA A, KOT-WASIK A. Novel liquid chromatography method based on linear weighted regression for the fast determination of isoprostane isomers in plasma samples using sensitive tandem mass spectrometry detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2017; **1051**: 17-23.
- [4] BALLY RW, GRIBNAU TC. Some aspects of the chromogen 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as hydrogen donor in a horseradish peroxidase assay. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989; **27**: 791-796.
- [5] BARDEN AE, MAS E, CROFT KD, PHILLIPS M, MORI TA. Minimizing artifactual elevation of lipid peroxidation products (F2-isoprostanes) in plasma during collection and storage. *Anal Biochem* 2014; **449**: 129-131.
- [6] BASU S. Isoprostanes: novel bioactive products of lipid peroxidation. *Free Radic Res* 2004; **38**: 105-122.
- [7] BASU S. Radioimmunoassay of 8-iso-prostaglandin F2alpha: an index for oxidative injury via free radical catalysed lipid peroxidation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1998; **58**: 319-325.
- [8] BAUER J, RIPPERGER A, FRANTZ S, ERGÜN S, SCHWEDHELM E, BENNDORF RA. Pathophysiology of isoprostanes in the cardiovascular system: implications of isoprostane-mediated thromboxane A2 receptor activation. *Br J Pharmacol* 2014; **171**: 3115-3131.
- [9] BERDEAUX O, SCRUEL O, CRACOWSKI JL, DURAND T. F2-Isoprostanes: Review of Analytical Methods. *Current Pharmaceutical Analysis* 2006; **2**: 69-78.
- [10] BESSARD J, CRACOWSKI JL, STANKE-LABESQUE F, BESSARD G. Determination of isoprostaglandin F2a type III in human urine by gas chromatography-electronic impact mass spectrometry. Comparison with enzyme immunoassay. *J Chromatogr B* 2001; **754**: 333-343.
- [11] BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; **69**: 89-95.
- [12] BOJAROWICZ H, WOŹNIAK H. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe oraz ich wpływ na skórę. *Prob Hig Epidemiol* 2008; **89**: 471-475.
- [13] CAYMAN CHEMICALS. 8-Isoprostane ELISA Kit Item № 516351; Booklet. <https://www.caymanchem.com/pdfs/516351.pdf> (05.07.2017).
- [14] CHAN HP, TRAN V, LEWIS C, THOMAS Ps. Elevated levels of oxidative stress markers in exhaled breath condensate. *J Thorac Oncol* 2009; **4**: 172-178.
- [15] CRACOWSKI JL, DURAND T, BESSARD G. Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends Pharmacol Sci* 2002; **23**: 360-366.
- [16] CZERSKA M, MIKOŁAJEWSKA K, ZIELIŃSKI M, GROMADZIŃSKA J, WĄSOWICZ W. Today's oxidative stress markers. *Med Pr* 2015; **66**:393-405.
- [17] DAHL JH, VAN BREEMEN RB. Rapid Quantitative Analysis of 8-iso-PGF2α Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Comparison to an Enzyme Immunoassay Method. *Anal Biochem* 2010; **404**: 211-216.
- [18] DALAVERIS E, KERENIDI T, KATSABEKI-KATSAFLI A, KIROPOULOS T, TANOU K, GOURGOULIANIS KI, KOSTIKAS K. VEGF, TNF-alpha and 8-isoprostane levels in exhaled breath condensate and serum of patients with lung cancer. *Lung Cancer* 2009; **64**: 219-225.
- [19] DALLE-DONNE I, ROSSI R, COLOMBO R, GIUSTARINI D, MILZANI A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006; **52**: 601-623.
- [20] DAVIES SS, ROBERTS LJ 2ND. F2-isoprostanes as an indicator and risk factor for coronary heart disease. *Free Radic Biol Med* 2011; **50**: 559-566.

- [21] DE MIGUEL D, CORDERO MD. Oxidative Therapy Against Cancer. In: Lushchak VU, Gospodaryov DV eds. *Oxidative Stress and Diseases*. InTech, 2012; 497-520.
- [22] DEAN RL. Laboratory Exercises. Kinetic Studies with Alkaline Phosphatase in the Presence and Absence of Inhibitors and Divalent Cations. *Biochem Mol Biol Educ* 2002; **30**: 401-407.
- [23] DELANTY N, REILLY M, PRATICO D, FITZGERALD DJ, LAWSON JA, FITZGERALD GA. 8-Epi PGF2 alpha: specific analysis of an isoeicosanoid as an index of oxidant stress *in vivo*. *Br J Clin Pharmacol* 1996; **42**: 15-19.
- [24] DIETEL M, BUBENDORF L, DINGEMANS AM, DOOMS C, ELMBERGER G, GARCÍA RC, KERR KM, LIM E, LÓPEZ-RÍOS F, THUNNISSEN E, VAN SCHIL PE, VON LAFFERT M. Diagnostic procedures for non-small-cell lung cancer (NSCLC): recommendations of the European Expert Group. *Thorax* 2016; **71**: 177-184.
- [25] DORJGOCHOO T, GAO YT, CHOW WH, SHU XO, YANG G, CAI Q, ROTHMAN N, CAI H, LI H, DENG X, FRANKE A, ROBERTS LJ, MILNE G, ZHENG W, DAI Q. Major metabolite of F2-isoprostane in urine may be a more sensitive biomarker of oxidative stress than isoprostane itself. *Am J Clin Nutr* 2012; **96**: 405-414.
- [26] ENZO. Product Manual. 8-iso-PGF2 α ELISA kit Catalog #: ADI-900-010. http://www.enzolifesciences.com/fileadmin/files/manual/ADI-900-010_insert.pdf (05.07.2017).
- [27] ENZO. Product Manual. Direct 8-iso-PGF2 α ELISA kit Catalog #: ADI-900-091 96 Well Kit. For use with serum, plasma, and tissue. http://www.enzolifesciences.com/fileadmin/files/manual/ADI-900-091_insert.pdf (05.07.2017).
- [28] ENZO. Product Data Sheet. 8-iso-PGF2 α ELISA kit ADI-900-010. <http://www.enzolifesciences.com/ADI-900-010/8-iso-pgf2alpha-elisa-kit/pdf/> (05.07.2017).
- [29] ENZO. Product Data Sheet. Direct 8-iso-PGF2 α ELISA kit. ADI-900-091, Highly sensitive ELISA, measuring 8-iso-Prostaglandin F2 α in plasma, serum and tissue. <http://www.enzolifesciences.com/ADI-900-091/direct-8-iso-pgf2alpha-elisa-kit/pdf/> (05.07.2017).
- [30] EPPLEIN M, FRANKE AA, COONEY RV, MORRIS JS, WILKENS LR, GOODMAN MT, MURPHY SP, HENDERSON BE, KOLONEL LN, LE MARCHAND L. Association of plasma micronutrient levels and urinary isoprostane with risk of lung cancer: The Multiethnic Cohort Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; **18**: 1962-1970.
- [31] ESME H, CEMEK M, SEZER M, SAGLAM H, DEMIR A, MELEK H, UNLU M. High levels of oxidative stress in patients with advanced lung cancer. *Respirology* 2008; **13**: 112-116.
- [32] GAO L, ZACKERT WE, HASFORD JJ, DANEKIS ME, MILNE GL, REMMERT C, REESE J, YIN H, TAI HH, DEY SK, PORTER NA, MORROW JD. Formation of prostaglandins E2 and D2 via the isoprostane pathway: a mechanism for the generation of bioactive prostaglandins independent of cyclooxygenase. *J Biol Chem* 2003; **278**: 28479-28489.
- [33] GRANGE RD, THOMPSON JP, LAMBERT DG. Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays. *Br J Anaesth* 2014; **112**: 213-216.
- [34] GUPTA A, SRIVASTAVA S, PRASAD R, NATU SM, MITTAL B, NEGI MP, SRIVASTAVA AN. Oxidative stress in non-small cell lung cancer patients after chemotherapy: association with treatment response. *Respirology* 2010; **15**: 349-356.
- [35] GUPTA SC, HEVIA D, PATCHVA S, PARK B, KOH W, AGGARWAL BB. Upsides and Downsides of Reactive Oxygen Species for Cancer: The Roles of Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis, Prevention, and Therapy. *Antioxid Redox Signal* 2012; **16**: 1295-1322.
- [36] GUPTA A, MUMPER RJ. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treat Rev* 2009; **35**: 32-46.
- [37] HABIB A, BADR KF. Molecular pharmacology of isoprostanes in vascular smooth muscle. *Chem Phys Lipids* 2004; **128**: 69-73.
- [38] HALLIWELL B, LEE CY. Using isoprostanes as biomarkers of oxidative stress: some rarely considered issues. *Antioxid Redox Signal* 2010; **13**: 145-156.

- [39] HALLIWELL B, WHITEMAN M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004; **142**: 231-255.
- [40] HIRSCH FR, MERRICK DT, FRANKLIN WA. Role of biomarkers for early detection of lung cancer and chemoprevention. *Eur Respir J* 2002; **19**: 1151-1158.
- [41] HO JC, CHAN-YEUNG M, HO SP, MAK JC, IP MS, OOI GC, WONG MP, TSANG KW, LAM WK. Disturbance of systemic antioxidant profile in nonsmall cell lung carcinoma. *Eur Respir J* 2007; **29**: 273-278.
- [42] IMG JD. Epoxides and soluble epoxide hydrolase in cardiovascular physiology. *Physiol Rev* 2012; **92**: 101-130.
- [43] INONU H, DORUK S, SAHIN S, ERKORKMAZ U, CELIK D, CELIKEL S, SEYFIKLI Z. Oxidative stress levels in exhaled breath condensate associated with COPD and smoking. *Respir Care* 2012; **57**: 413-419.
- [44] JANICKA M, KOT-WASIK A, KOT J, NAMIEŚNIK J. Isoprostanes-biomarkers of lipid peroxidation: their utility in evaluating oxidative stress and analysis. *Int J Mol Sci* 2010; **11**: 4631-4659.
- [45] JANSSEN LJ. Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; **280**: L1067-1082.
- [46] JOHNS NP, JOHNS JR. Assessment of 8-isoprostane (8-isoPGF₂α) in urine of non- small cell lung cancer (NSCLC) patients undergoing chemotherapy. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; **13**: 775-780.
- [47] KADIISKA MB, GLADEN BC, BAIRD DD, GERMOLEC D, GRAHAM LB, PARKER CE, NYSKA A, WACHSMAN JT, AMES BN, BASU S, BROTH N, FITZGERALD GA, FLOYD RA, GEORGE M, HEINECKE JW ET AL. Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl₄ poisoning? *Free Radic Biol Med* 2005; **38**: 698-710.
- [48] KAMINSKY VO, PISKUNOVA T, ZBOROVSKAYA IB, TCHEVKINA EM, ZHIVOTOVSKY B. Suppression of basal autophagy reduces lung cancer cell proliferation and enhances caspase-dependent and -independent apoptosis by stimulating ROS formation. *Autophagy* 2012; **8**: 1032-1044.
- [49] KERR KM, BUBENDORF L, EDELMAN MJ, MARCHETTI A, MOK T, NOVELLO S, O'BYRNE K, STAHEL R, PETERS S, FELIP E, PANEL MEMBERS. Second ESMO consensus conference on lung cancer: pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2014; **25**: 1681-1690.
- [50] KHASAWNEH FT, HUANG JS, MIR F, SRINIVASAN S, TIRUPPATHI C, LE BRETON GC. Characterization of isoprostane signaling: evidence for a unique coordination profile of 8-iso-PGF(2alpha) with the thromboxane A(2) receptor, and activation of a separate cAMP-dependent inhibitory pathway in human platelets. *Biochem Pharmacol* 2008; **75**: 2301-2315.
- [51] KINNULA VL, CRAPO JD. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; **167**: 1600-1619.
- [52] KINNULA VL, ILUMETS H, MYLLÄRNIEMI M, SOVIJÄRVI A, RYTIÄ P. 8-Isoprostane as a marker of oxidative stress in nonsymptomatic cigarette smokers and COPD. *Eur Respir J* 2007; **29**: 51-55.
- [53] KLAWITTER J, HASCHKE M, SHOKATI T, KLAWITTER J, CHRISTIANS U. Quantification of 15-F_{2t}-isoprostane in human plasma and urine: results from enzyme-linked immunoassay and liquid chromatography/tandem mass spectrometry cannot be compared. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2011; **25**: 463-468.
- [54] KOIVUNEN ME, KROGSRUD RL. Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories. *Lab Med* 2006; **37**: 490-497.
- [55] LAWSON JA, ROKACH J, FITZGERALD GA. Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation in vivo. *J Biol Chem* 1999; **274**: 24441-24444.
- [56] LEISCHING G, LOOS B, BOTHA M, ENGELBRECHT AM. A nontoxic concentration of cisplatin induces autophagy in cervical cancer: selective cancer cell death with autophagy inhibition as an adjuvant treatment. *Int J Gynecol Cancer* 2015; **25**: 380-388.
- [57] LIANG Y, WEI P, DUKE RW, REAVEN PD, HARMAN SM, CUTLER RG, HEWARD CB. Quantification of 8-iso-prostaglandin-F(2alpha) and 2,3-dinor-8-iso-prostaglandin-F(2alpha) in human urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Free Radic Biol Med* 2003; **34**: 409-418.

- [58] LIM MY, THOMAS PS. Biomarkers in Exhaled Breath Condensate and Serum of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Non-Small-Cell Lung Cancer. *Int J Chronic Dis* 2013; **2013**: 578613.
- [59] LOOK MP, MUSCH E. Lipid peroxides in the polychemotherapy of cancer patients. *Chemotherapy* 1994; **40**: 8-15.
- [60] ŁUCZAJ W, SKRZYDLEWSKA E. Współczesne spojrzenie na peroksydację lipidów. *Postepy Biochem* 2006; **52**: 173-179.
- [61] MARULLO R, WERNER E, DEGTJAREVA N, MOORE B, ALTAVILLA G, RAMALINGAM SS, DOETSCH PW. Cisplatin Induces a Mitochondrial-ROS Response That Contributes to Cytotoxicity Depending on Mitochondrial Redox Status and Bioenergetic Functions. *PLoS One* 2013; **8**: e81162.
- [62] MILNE GL, YIN H, BROOKS JD, SANCHEZ S, ROBERTS LJ 2ND, MORROW JD. Chapter six. Quantification of F2-Isoprostanes in Biological Fluids and Tissues as a Measure of Oxidant Stress. In: Brown HA eds. *Methods in Enzymology. Volume 433, Lipidomics and Bioactive Lipids: Specialized Analytical Methods and Lipids in Disease*. Elsevier, 2007; 113-126.
- [63] MILNE GL, YIN H, HARDY KD, DAVIES SS, ROBERTS LJ 2ND. Isoprostane generation and function. *Chem Rev* 2011; **111**: 5973-5996.
- [64] MONTUSCHI P, BARNES PJ, ROBERTS LJ 2ND. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J* 2004; **18**: 1791-1800.
- [65] MORROW JD, HILL KE, BURK RF, NAMMOUR TM, BADR KF, ROBERTS LJ 2ND. A series of prostaglandin F2-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.
- [66] MUELLER MJ. Isoprostane nomenclature: inherent problems may cause setbacks for the development of the isoprostanoid field. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2010; **82**: 71-81.
- [67] NUGTEREN DH, VONKEMAN H, VAN DORF DA. Non-enzymatic conversion of all-cis 8,11,14-eicosatrienoic acid into prostaglandin PGE1. *Recl Trav Chim Pays-Bas* 1967; **86**: 1237-1245.
- [68] PAMPLONA R. Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1777**: 1249-1262.
- [69] PANIERI E, SANTORO MM. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death Dis* 2016; **7**: e2253.
- [70] PATRIGNANI P, SANTINI G, PANARA MR, SCIULLI MG, GRECO A, ROTONDO MT, DI GIAMBERARDINO M, MACLOUF J, CIABATTONI G, PATRONO C. Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in human monocytes associated with cyclo-oxygenase-dependent F2-isoprostane formation. *Br J Pharmacol* 1996; **118**: 1285-1293.
- [71] PILACIK B, NOFER TW, WASOWICZ W. F2-isoprostanes biomarkers of lipid peroxidation: their utility in evaluation of oxidative stress induced by toxic agents. *Int J Occup Med Environ Health* 2002; **15**: 19-27.
- [72] PINSKY PF, GIERADA DS, NATH PH, KAZEROONI E, AMOROSA J. National Lung Screening Trial: Variability in Nodule Detection Rates in Chest CT Studies. *Radiology* 2013; **268**: 865-873.
- [73] POILLET-PEREZ L, DESPOUY G, DELAGE-MOURROUX R, BOYER-GUITTAUT M. Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. *Redox Biology* 2015; **4**: 184-192.
- [74] PRATICÒ D, SMYTH EM, VILOLI F, FITZGERALD GA. Local Amplification of Platelet Function by 8-Epi Prostaglandin F2 α Is Not Mediated by Thromboxane Receptor Isoforms. *J Biol Chem* 1996; **271**: 14916-14924.
- [75] PROUDFOOT J, BARDEN A, MORI TA, BURKE V, CROFT KD, BEILIN LJ, PUDDY IB. Measurement of urinary F2-isoprostanes as markers of in vivo lipid peroxidation: a comparison of enzyme immunoassay with gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Biochem* 1999; **272**: 209-215.
- [76] REUTER S, GUPTA SC, CHATURVEDI MM, AGGARWAL BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med* 2010; **49**: 1603-1616.

- [77] ROKACH J, KHANAPURE SP, HWANG SW, ADIYAMAN M, LAWSON JA, FITZGERALD GA. Nomenclature of isoprostanes: a proposal. *Prostaglandins* 1997; **54**: 853-873.
- [78] SAEED SA, RASHEED H, FECTO FA, ACHAKZAI MI, ALI R, CONNOR JD, GILANI AU. Signaling mechanisms mediated by G-protein coupled receptors in human platelets. *Acta Pharmacol Sin* 2004; **25**: 887-892.
- [79] SAENGER AK, LAHA TJ, EDENFIELD MJ, SADRZADEH SMH. Quantification of urinary 8-iso-PGF₂ α using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and association with elevated troponin levels. *Clin Biochem* 2007; **40**: 1297-1304.
- [80] SAMETZ W, GROBUSCHEK T, HAMMER-KOGLER S, JUAN H, WINTERSTEIGER R. Influence of isoprostanes on vasoconstrictor effects of noradrenaline and angiotensin II. *Eur J Pharmacol* 1999; **378**: 47-55.
- [81] SÁNCHEZ-TIRADO E, GONZÁLEZ-CORTÉS A, YUDASAKA M, IJIMA S, LANGA F, YÁÑEZ-SEDEÑO P, PINGARRÓN JM. Electrochemical immunosensor for the determination of 8-isoprostane aging biomarker using carbon nanohorns-modified disposable electrodes. *J Elect Chem* 2017; **793**: 197-202.
- [82] SIRCAR D, SUBBAIAH PV. Isoprostane measurement in plasma and urine by liquid chromatography-mass spectrometry with one-step sample preparation. *Clin Chem* 2007; **53**: 251-258.
- [83] SMITH KA, SHEPHERD J, WAKIL A, KILPATRICK ES. A comparison of methods for the measurement of 8-iso-PGF(2 α): a marker of oxidative stress. *Ann Clin Biochem* 2011; **48**: 147-154.
- [84] STATHOPOULOS D, LOUKIDES S, SYRIGOS K. 8-Isoprostane in exhaled breath condensate of patients with non-small cell lung cancer: the effect of chemotherapy. *Anticancer Res* 2014; **34**: 5143-5145.
- [85] SUDER P. Chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią mas (LC-MS). In: Kraj A, Drabik A, Silberring J eds. *Proteomika i metabolomika*. Warszawa: Wydawnictwa Uniwersytetu Warszawskiego, 2010; 151-166.
- [86] TABER DF, MORROW JD, ROBERTS LJ 2ND. A nomenclature system for the isoprostanes. *Prostaglandins* 1997; **53**: 63-67.
- [87] TACCONELLI S, CAPONE ML, PATRIGNANI P. Measurement of 8-iso-prostaglandin F₂ α in biological fluids as a measure of lipid peroxidation. *Methods Mol Biol* 2010; **644**: 165-178.
- [88] TING HJ, KHASAWNEH FT. Platelet function and Isoprostane biology. Should isoprostanes be the newest member of the orphan-ligand family? *J Biomed Sci* 2010; **17**: 24.
- [89] TSIKAS D, SCHWEDHELM E, SUCHY MT, NIEMANN J, GUTZKI FM, ERPENBECK VJ, HOHLFELD JM, SURDACKI A, FROLICH JC. Divergence in urinary 8-iso-PGF(2x) (iPF(2x)-III 15-F-2t-IsoP) levels from gas chromatography tandem mass spectrometry quantification after thin-layer chromatography and immunoaffinity column chromatography reveals heterogeneity of 8-iso-PGF(2x) – possible methodological, mechanistic and clinical implications. *J Chromatogr B* 2003; **794**: 237-255.
- [90] VAN'T ERVE TJ, LIH FB, JELSEMA C, DETERDING LJ, ELING TE, MASON RP, KADIJSKA MB. Reinterpreting the best biomarker of oxidative stress: The 8-iso-prostaglandin F₂ α /prostaglandin F₂ α ratio shows complex origins of lipid peroxidation biomarkers in animal models. *Free Radic Biol Med* 2016; **95**: 65-73.
- [91] VAN'T ERVE TJ, LIH FB, KADIJSKA MB, DETERDING LJ, ELING TE, MASON RP. Reinterpreting the Best Biomarker of Oxidative Stress: The 8-iso-PGF₂ α / PGF₂ α Ratio Distinguishes Chemical from Enzymatic Lipid Peroxidation. *Free Radic Biol Med* 2015; **83**: 245-251.
- [92] VIGOR C, BERTRAND-MICHEL J, PINOT E, OGER C, VERCAUTEREN J, LE FAUDER P, GALANO JM, LEE JC, DURAND T. Non-enzymatic lipid oxidation products in biological systems: assessment of the metabolites from polyunsaturated fatty acids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2014; **964**: 65-78.
- [93] VILLEGAS L, STIDHAM T, NOZIK-GRAYCK E. Oxidative Stress and Therapeutic Development in Lung Diseases. *J Pulm Respir Med* 2014; **4**:194.
- [94] WACHOWICZ B, KULIFER A, OLAS B. Właściwości biologiczne izoprostanów. *KOSMOS – Problemy Nauk Biologicznych* 2011; **60**: 33-42.

- [95] WEILL NI, HOPMAN GD, WIPKINK-BAKKER A, LENTJES EG, BERGER HM, CLETON FJ, OSANTO S. Cisplatin combination chemotherapy induces a fall in plasma antioxidants of cancer patients. *Ann Oncol* 1998; **9**: 1331-1337.
- [96] XIAO Y, FU X, PATTENGALE P, DIEN BARD J, XU YK, O'GORMAN MR. A sensitive LC-MS/MS method for the quantification of urinary 8-iso-prostaglandin F2 α (8-iso-PGF2 α) including pediatric reference interval. *Clin Chim Acta* 2016; **460**: 128-134.
- [97] YIN H, XU L, PORTER NA. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev* 2011; **111**: 5944-5972.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 13.11.2017

Przyjęto: 20.12.2017

Katarzyna Klarzyńska

Zakład Biologii Molekularnej, Katedra Biologii Molekularnej i Genetyki

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

ul. Medyków 18, 40-752, Katowice

tel.: +48-32-208-83-94, fax: +48-32-208-83-82

e-mail: katarzyna.klarzynska@gmail.com