

## TECHNIKA LC-MS/MS JAKO METODA OZNACZANIA IZOPROSTANÓW: KRÓTKI PRZEGLĄD LITERATURY

LC-MS/MS AS A METHOD FOR THE DETERMINATION OF ISOPROSTANES:  
A BRIEF REVIEW

Magdalena Beata Król, Sławomir Brzeźnicki

Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera / Nofer Institute of Occupational Medicine, Łódź, Poland  
Centralne Laboratorium / Central Laboratory

### STRESZCZENIE

Izoprostany to duża grupa związków, które budową przypominają prostaglandyny. Powstają jako produkty wolnorodnikowej reakcji utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i występują powszechnie we wszystkich tkankach oraz płynach biologicznych ciała w możliwym do oznaczenia stężeniu. Od 2018 r. oznaczanie izoprostanów techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej lub gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas jest uznawane za złoty standard wśród oznaczeń markerów stresu oksydacyjnego w kontekście oksydacyjnych uszkodzeń lipidów. Publikacja jest syntetycznym przeglądem najnowszej literatury dotyczącej wykorzystania izoprostanów jako markera peroksydacji lipidów z użyciem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas. Przedstawiono w niej wyniki badań wykorzystujące oznaczanie izoprostanów w pracy klinicystów i wskazano potencjał zastosowania tych oznaczeń do monitoringu osób pracujących w narażeniu na szkodliwe substancje oraz ich przydatność w badaniach dotyczących stylu życia. Med. Pr. 2023;74(2):119–125

**Słowa kluczowe:** markery stresu oksydacyjnego, izoprostany, peroksydacja lipidów, zastosowanie izoprostanów, LC-MS/MS, izomery prostaglandyn

### ABSTRACT

Isoprostanes are a large group of compounds formed as products of free radical oxidation of polyunsaturated fatty acids, which are isomers of prostaglandin. They are present in all body tissues and biological fluids in quantifiable concentrations. Since 2018, the determination of isoprostanes by chromatographic technique with mass spectrometry is the golden standard of the oxidative stress markers determination in relation to oxidative damage to lipids. The publication is a synthetic review of recently published articles on the use of isoprostanes as a marker of lipid peroxidation determined with the liquid chromatography with tandem mass spectrometry technique. It presents the results of research using isoprostanes as a marker in medicine, in monitoring people working in exposure to harmful substances and in lifestyle research. Med Pr. 2023;74(2):119–25

**Key words:** oxidative stress markers, isoprostanes, lipid peroxidation, application of isoprostanes, LC-MS/MS, prostaglandin isomers

Autorka do korespondencji / Corresponding author: Magdalena Beata Król, Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera, Centralne Laboratorium, ul. św. Teresy 8, 91-348 Łódź, e-mail: magdalena.krol@imp.lodz.pl  
Nadesłano: 15 listopada 2022, zatwierdzono: 16 lutego 2023

## WSTĘP

F2-Izoprostany (F2-IzoP) są produktami utleniania lipidów, które ze względu na swoje właściwości chemiczne są uznawane za właściwe biomarkery stresu oksydacyjnego (SO) [1]. Pierwsze doniesienia o ich powstawaniu na drodze nieenzymatycznego utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w warun-

kach *in vitro* pochodzą z lat 60. XX w. Dopiero lata 90. przyniosły jednak przełom, którym było wykazanie w warunkach *in vivo*, że na skutek autooksydacji kwasu arachidonowego (AA) powstają związki przypominające strukturą prostaglandyny. F2-Izoprostany charakteryzują się niezwykle stabilnością chemiczną, a ich stężenie w organizmie jest niezależne od ilości spożywanych z dietą tłuszczów. Występują one powszechnie we

wszystkich tkankach i płynach ustrojowych ciała w stężeniach możliwych do oznaczenia współczesnymi technikami analitycznymi. Mimo upływu lat F2-IzoP wciąż pozostają w centrum zainteresowania badaczy, głównie w kontekście wykorzystania jako biomarkery SO w różnych stanach patologicznych.

Stres oksydacyjny to zaburzenie równowagi pomiędzy ilością generowanych reaktywnych form tlenu (RFT) a aktywnością enzymów antyoksydacyjnych, czyli aparatem je neutralizującym [2]. W warunkach fizjologicznych RFT pełnią funkcję przekaźników informacji podczas każdego etapu życia komórki. Są one zaangażowane w procesy wzrostu, różnicowania i apoptozy, m.in. poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego AP-1 i aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, który jest odpowiedzialny za regulację odpowiedzi immunologicznej na infekcję. Reaktywne formy tlenu mogą wpływać na działanie enzymów poprzez utlenianie reszt aminokwasowych znajdujących się w ich centrach katalitycznych. Szczególnie podatne na działanie RFT są reszty cysteiny, których utlenienie może aktywować lub hamować działania enzymu. Ponadto nadmierne stężenie RFT powoduje nieodwracalne zmiany w komórkach, takie jak peroksydacja lipidów, utleniania białek, w tym białek strukturalnych, i uszkodzenia DNA.

Izoprostany powstają z lipidów błonowych, tj. kwasów AA, dokozaheksaenowego (DHA) i eikozapentaenowego, na skutek bezpośredniego działania RFT. F2-Izoprostany są charakterystycznymi produktami nieenzymatycznego mechanizmu wolnorodnikowego utleniania wielonienasyconego kwasu AA. Powstałe F2-IzoP na skutek działania fosfolipaz są uwalniane w wolnej formie z błon komórkowych do płynów ustrojowych, gdzie są oznaczane jako markery stresu oksydacyjnego. Dodatkowo w następstwie uruchomienia sekwencji reakcji utleniania kwasu AA powstają alkany, alkeny i aldehydy, w tym najbardziej mutagenny aldehyd malonowy i najbardziej toksyczny 4-hydrokso-2-nonenal [1,3].

Obecnie rozróżniamy 4 serie F2-IzoP: 5-, 8-, 12- i 15-, będące regioizomerami prostaglandyn, które różnią się położeniem wiązania podwójnego oraz położeniem podstawnika hydroksylowego w łańcuchach bocznych cząsteczki w zależności od tego, który atom wodoru zostanie zaatakowany przez RFT. Z każdego regioizomeru może powstać 16 diastereizomerów, czyli w sumie 64 różne F2-IzoP. W efekcie peroksydacji kwasu AA w zdecydowanej przewadze powstają F2-IzoP serii 5- i 15-, których budowa jest stabilniejsza i nie ulegają one dalszym przemianom, tak jak F2-IzoP serii 8- i 12-.

Oprócz izoprostanów będących pochodnymi prostaglandyn, z grupą hydroksylową przy 9 i 11 atomie węgla pierścienia pentozowego cząsteczki, wyróżniamy również izoprostany typu E2, D2, A2 i J2 różniące się rodzajem i położeniem grup funkcyjnych przy tym pierścieniu. Do najczęściej badanych cząsteczek izoprostanów w kontekście markerów peroksydacji lipidów należą 8-isoPGF<sub>2 $\alpha$</sub>  i 8-isoPGE<sub>2</sub>, będące regioizomerami serii 15- [3].

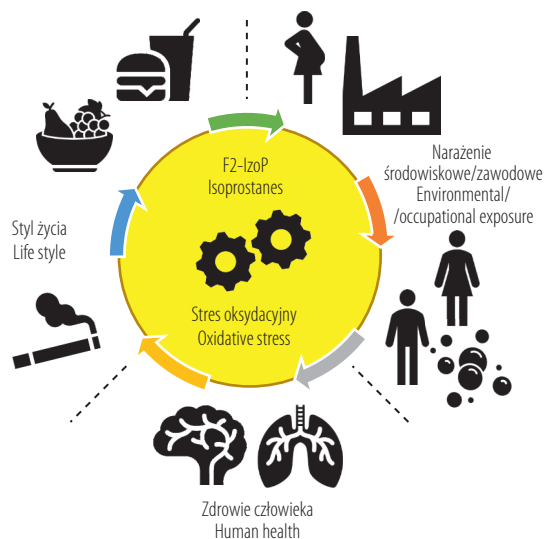
Do oznaczania stężenia F2-IzoP są wykorzystywane głównie testy immunologiczne lub analiza chromatograficzna sprzężona ze spektrometrią mas. Techniki chromatograficzne umożliwiają identyfikację poszczególnych cząsteczek izoprostanów i dokładne określenie ich stężenia w badanym materiale biologicznym. Stanowi to niepodważalną zaletę w porównaniu z technikami immunologicznymi, w których na skutek występowania reakcji krzyżowych oznacza się całą pulę cząsteczek o takim samym fragmencie strukturalnym niekoniecznie będących izoprostanami, przez co otrzymane wyniki mogą być obarczone dużym błędem.

W 2018 r. Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (European Food Safety Authority – EFSA) zarekomendował badanie stężeń F2-IzoP jako właściwych markerów peroksydacji lipidów, które musi być wykonane technikami chromatografii gazowej (*gas chromatography* – GC) lub cieczowej (*liquid chromatography* – LC) sprzężonymi ze spektrometrią mas (*mass spectrometry* – MS), czyli GC-MS lub LC-MS [4]. Od tego momentu F2-IzoP uznawane są za złoty standard wśród oznaczeń markerów peroksydacji lipidów.

Celem pracy jest przedstawienie potencjału oznaczeń F2-IzoP w różnych aspektach życia (rycina 1), przy założeniu, że pomiar stężenia tych związków był wykonany techniką chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (*liquid chromatography with tandem mass spectrometry* – LC-MS/MS), a prace zostały opublikowane po wydaniu przez EFSA rekomendacji dotyczącej metodyki oznaczeń tych związków.

## METODY PRZEGLĄDU

Niniejsza praca jest subiektywnym przeglądem literatury skupiającym się na artykułach opublikowanych po 2018 r., czyli po uznaniu F2-IzoP za złoty standard oznaczeń markerów peroksydacji lipidów. Przegląd piśmiennictwa dotyczy prac doświadczalnych przeprowadzonych z wykorzystaniem ludzkiego materiału biologicznego, w których do oznaczeń F2-IzoP stosowano



**Rycina 1.** Wykorzystanie oznaczeń izoprostanów w różnych aspektach życia

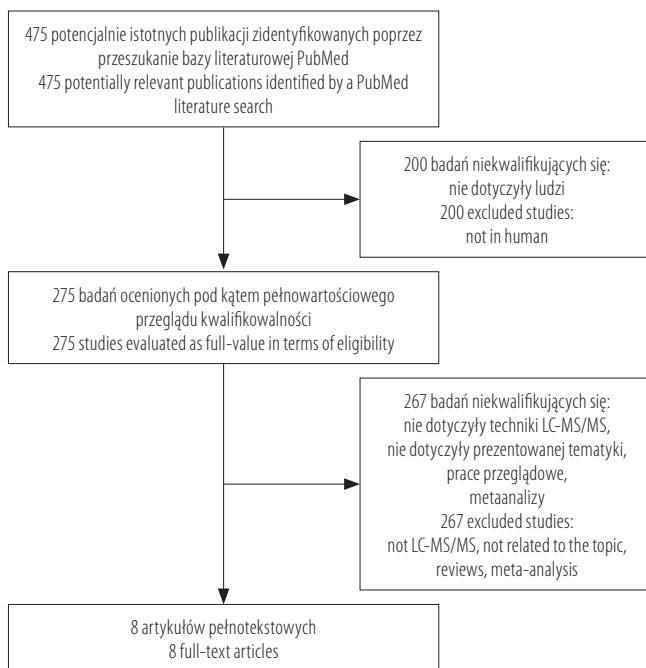
**Figure 1.** The use of isoprostanol determination in various aspects of life

technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (*high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry* – HPLC-MS/MS). Autorzy dokonali przeglądu literatury dostępnej w bazie MEDLINE (PubMed), wyszukując odpowiednie publikacje za pomocą następujących fraz kluczowych: (isoprostanol[Title/Abstract]) AND „(,2019/01/”1”[Dat- - Publication],, „2022/10/”1”[Dat- - Publication]), z zastosowaniem filtru „Human”.

## WYNIKI PRZEGLĄDU

Od stycznia 2019 r. do końca października 2022 r. w PubMed zostało opublikowanych 475 pozycji odnoszących się do słowa kluczowego „isoprostanol” zidentyfikowanego w tytule lub streszczeniu publikacji. Jeżeli zawężą się obszar wyszukiwania do publikacji dotyczących ludzi poprzez użycie filtru „Human”, to liczba tych pozycji zmniejsza się do 275. Analiza treści streszczeń lub pełnego tekstu wyszukanych publikacji pozwoliła na wybranie 8 prac doświadczalnych spełniających założone kryteria przydatności, m.in. zastosowaną technikę analityczną (rycina 2).

We wszystkich wybranych pracach stężenie izoprostanów było oznaczane w materiale biologicznym pochodzącym od ludzi techniką HPLC-MS/MS z wykorzystaniem jonizacji typu elektrorozpylanie w trybie ujemnym (*electrospray ionization negative ion mode* – ESI<sup>-</sup>). Dane dotyczące oznaczanych rodzajów izoprostanów, zakresy pomiarowe, granice wykrywalności



**Rycina 2.** Diagram wyszukiwania badań dotyczących oznaczenia izoprostanów techniką ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas z wykorzystaniem jonizacji typu elektrorozpylanie w trybie ujemnym (HPLC-ESI<sup>-</sup>-MS/MS) opublikowanych w latach 2019–2022 włączonych do przeglądu literaturowego

(*limit of detection* – LOD), granice oznaczalności (*limit of quantification* – LOQ) oraz informacje dotyczące matrycy i metody oczyszczania/ekstrakcji próbki szczegółowo opisano w tabeli 1.

Jak wspomniano we wstępie F2-IzoP występują we wszystkich płynach ustrojowych w organizmie człowieka, przy czym zdecydowana większość opublikowanych prac dotyczy badań, w których jako matrycę wykorzystywano mocz, gdzie stężenie F2-IzoP jest najwyższe. Nie brakuje też publikacji, w których stężenie F2-IzoP oznaczano w osoczu/surowicy, płynie mózgowo-rdzeniowym, tkankach pobranych *post mortem* czy kondensacie wydychanego powietrza (*exhaled breath condensate* – EBC).

## Oznaczanie stężenia F2-IzoP w diagnostyce chorób

Podwyższone stężenie F2-IzoP w moczu w odniesieniu do grupy kontrolnej zaobserwowano w wielu schorzeniach powiązanych ze stresem oksydacyjnym, takich jak choroby sercowo-naczyniowe, metaboliczne i neurodegeneracyjne oraz nowotwory.

**Tabela 1.** Zestawienie oznaczanych izoprostanów oraz danych metodycznych dla techniki ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas z wykorzystaniem jonizacji typu elektroizopylanie w trybie ujemnym (HPLC-ESI<sup>-</sup>-MS/MS) z wybranych do przeglądu literatury artykułów z lat 2019–2022  
**Table 1.** Summary of determined isoprostanos and methodological data for the technique of ultra-high-performance liquid chromatography coupled with a tandem mass spectrometer using electrospray ionization in the negative mode (HPLC-ESI<sup>-</sup>-MS/MS) from articles selected for literature review from 2019–2022

| Forma izoprostanu<br>Isoprostanos form        | Matryca<br>Matrix  | Metoda oczyszczania/<br>ekstrakcji próbki<br>Method of sample<br>purification/extraction | LOD          | LOQ<br>[pg/ml] | Zakres roboczy<br>metody<br>Method range<br>[ng/ml] | Stężenie<br>w grupie kontrolnej<br>Concentration<br>in control group<br>(M) | Badanie<br>Reference                      |
|---|--------------------|--|--------------|----------------|---|---|---|
| 8-Iso-PGF <sub>2α</sub>                       | osocze /<br>plasma | SPE  | 0,8 pg/ml    | 2,5            | 0,25–1000   | 8,26 pg/ml  | Ma i wsp. [5]                             |
|   |                    | strącanie białek<br>metanolem /<br>precipitation of proteins<br>with methanol            | -            | 25,0           | 0,5–25,0  | -   | Coviello i wsp. [6]                       |
|   | mocz /<br>urine    | SPE  | 50,0 pg/ml   | -              | -   | 0,89 ng/ml  | Taibl i wsp. [7]                          |
|   |                    |  | -            | -              | -   | 0,20 ng/mg crea   | Wu i wsp. [8]                             |
|   |                    |  | 20,0 pg/ml   | 50,0           | 0,1–5   | 0,22 ng/mg crea   | Sambaglio i wsp. [9]                      |
|   |                    |  | 0,03 pmol/ml | -              | -   | 1,31 pg/mg crea   | Carmella i wsp. [10]                      |
|   |                    | LLE  | -            | 7,0            | -   | 0,21 ng/mg crea   | Il'Yasova i wsp. [11], Hoover i wsp. [12] |
|   | EBC                | SPE  | -            | -              | -   | 3,93 pg/ml  | Wu i wsp. [8]                             |
| 2,3-Dinor-8-iso-PGF <sub>2α</sub>             | mocz /<br>urine    | SPE  | 50,0 pg/ml   | -              | -   | 4,13 ng/ml  | Taibl i wsp. [7]                          |
|   |                    |  | -            | -              | -   | 1,50 ng/mg crea   | Wu i wsp. [8]                             |
|   |                    | LLE  | -            | 340,0          | -   | 1,90 ng/mg crea   | Il'Yasova i wsp. [11], Hoover i wsp. [12] |
|   |                    | LLE  | -            | 250,0          | -   | 4,05 ng/mg crea   | Il'Yasova i wsp. [11], Hoover i wsp. [12] |
| 5-Iso-PGF <sub>2α</sub> -VI                   | mocz /<br>urine    | LLE  | -            | 120,0          | -   | 5,35 ng/mg crea   | Il'Yasova i wsp. [11], Hoover i wsp. [12] |
| 8,12-Iso-PGF <sub>2α</sub> -VI                | mocz /<br>urine    | LLE  | -            | -              | -   | -   | -   |
| 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-Iso-PGF <sub>2α</sub> | mocz /<br>urine    | SPE  | 50,0 pg/ml   | -              | -   | 1,09 ng/ml  | Taibl i wsp. [7]                          |

Crea – kreatynina / creatinine, LLE – ekstrakcja ciecz-ciecz / liquid-liquid extraction, LOD – granica wykrywalności / limit of detection, LOQ – granica oznaczalności / limit of quantification, SPE – ekstrakcja ciecz-ciało stałe / solid-phase extraction.  
 n<sup>a</sup> – brak danych / no data.

Doniesienie literaturowe z 2022 r. wskazuje, że oznaczenie stężenia 8-iso-PGF<sub>2α</sub> techniką HPLC-MS/MS w osoczu może cechować się potencjałem diagnostycznym wykrywania raka płuca we wczesnym stadium [5]. W opisywanym badaniu porównano stężenia 8-iso-PGF<sub>2α</sub> w osoczu pomiędzy pacjentami ze zdiagnozowanym rakiem płuca, osobami z łagodnymi zmianami nowotworowymi w płucach i grupą kontrolną, którą stanowiły osoby cierpiące na obturacyjną chorobę płuc lub astmę. Na podstawie otrzymanych wyników wykazano istotne statystycznie wyższe stężenie 8-iso-PGF<sub>2α</sub> u pacjentów z rakiem płuca w porównaniu z grupą kontrolną lub osobami ze zmianami łagodnymi. Ponadto zaobserwowano istotną statystycznie liniową zależność dla wzrostu stężenia 8-iso-PGF<sub>2α</sub> od grupy kontrolnej poprzez grupę ze zmianami łagodnymi do grupy z rakiem płuca, co może świadczyć o wpływie postępu zmian patologicznych na stężenie 8-iso-PGF<sub>2α</sub>.

W innym badaniu, w którym również wykorzystano do oznaczeń 8-iso-PGF<sub>2α</sub> w osoczu, określano wpływ stężenia tego związku na ryzyko uszkodzeń mózgu u wcześniaków [6]. Mózg tych noworodków jest szczególnie podatny na stres oksydacyjny. Szybkie namnażanie komórek generuje duże ilości RFT, a system enzymów antyoksydacyjnych w III trymestrze ciąży jest niewystarczający do przeciwdziałania negatywnym skutkom działania RFT. Efektem tego może być wysokie stężenie F2-IzoP pochodzących z utleniania kwasu eikozatetraenowego, będącego prekursorem kwasu DHA, który jest składnikiem budulcowym kory mózgowej. Grupę badaną stanowiły dzieci urodzone przed 28 tyg. ciąży, od których pobierano do badań krew pępowinową, a następnie krew żylną, pomiędzy 24 a 48 godz. życia. Oznaczone techniką HPLC-MS/MS stężenie 8-iso-PGF<sub>2α</sub> w tych 2 punktach czasowych porównywano z wynikami badań zintegrowanej elektroencefalografii amplitudowej. Wykazano, że dzieci o niższej aktywności mózgu cechowały się istotnie wyższym stężeniem 8-iso-PGF<sub>2α</sub> w osoczu pobranym w 2 dobie życia. Wykazanie tego związku może być pomocne w identyfikacji wcześniaków z wysokim ryzykiem uszkodzenia mózgu.

### **Oznaczanie stężenia F2-IzoP w monitoringu efektów narażenia środowiskowego na substancje chemiczne**

Oznaczanie stężenia F2-IzoP może być pomocne nie tylko w przypadku chorób lub stanów patologicznych ściśle związanych z występowaniem stresu oksydacyjnego. Prowadzone są również badania nad możliwością wykorzystania tego markera do monitorowania

efektów narażenia środowiskowego na substancje chemiczne, w tym syntetyczne związki per- i polifluoroalkilowe (*per- and polyfluoroalkyl substances* – PFAS). Substancje te występują powszechnie w środowisku na terenach zurbanizowanych oraz uprzemysłowionych i są zaliczane do grupy trwałych zanieczyszczeń organicznych. Narażenie na PFAS może zwiększać ryzyko nadciśnienia tętniczego, udaru, chorób sercowo-naczyniowych, obniżenia odporności, nowotworów czy zaburzeń płodności. Badania przeprowadzone na modelach komórkowych i zwierzęcych wskazują, że PFAS wpływają na homeostazę redoks w komórce oraz zwiększają ryzyko stresu oksydacyjnego.

Zależność ta była również badana u ludzi w kontekście prawidłowości przebiegu ciąży [7]. Grupę badaną stanowiły kobiety będące w II trymestrze ciąży, u których określano narażenie na PFAS na podstawie oznaczenia stężenia tych związków we krwi, a otrzymane wyniki korelowano ze stężeniem 8-iso-PGF<sub>2α</sub> i jego metabolitów w moczu, przy uwzględnieniu parametrów dotyczących przebiegu ciąży. Otrzymane rezultaty nie pozwoliły jednak jednoznacznie stwierdzić, że stężenie 8-iso-PGF<sub>2α</sub> i jego metabolitów jest zależne od narażenia na PFAS w trakcie ciąży ani że może być pomocne w monitorowaniu jej przebiegu.

W innym eksperymencie oceniano przydatność oznaczania stężenia 8-iso-PGF<sub>2α</sub> i jego metabolitu w moczu oraz w EBC jako markera narażenia zawodowego na nanomateriały [8]. Grupę badaną stanowili pracownicy fabryk produkujących lub rozpylających jako powłoki nanocząstki tlenków metali (nano-TiO<sub>2</sub> i nano-SiO<sub>2</sub>) i nanorurki węglowe (*carbon nanotubes* – CNT), a grupę kontrolną stanowiły osoby pracujące w biurach. Otrzymane wyniki jednoznacznie wskazały, że praca w narażeniu na nano-TiO<sub>2</sub> i nano-SiO<sub>2</sub> oraz CNT zwiększa poziom stresu oksydacyjnego, czego dowodem było wyższe stężenie zarówno 8-iso-PGF<sub>2α</sub> i jego metabolitu w moczu, jak i 8-iso-PGF<sub>2α</sub> w EBC u pracowników fabryk w porównaniu z grupą kontrolną. Dodatkowo badacze wykazali istotną statystycznie liniową zależność pomiędzy stężeniem 8-iso-PGF<sub>2α</sub> w moczu i w EBC, co wskazuje na duży potencjał wykorzystania EBC jako matrycy do badania stresu oksydacyjnego indukowanego narażeniem zawodowym na nanomateriały.

### **Oznaczanie stężenia F2-IzoP w badaniach stylu życia**

F2-Izopropany są często wykorzystywanym wskaźnikiem stresu oksydacyjnego w badaniach dotyczących stylu życia. W badaniu w grupie osób palących wyroby

tytoniowe określano zależność pomiędzy stężeniem 8-iso-PGF<sub>2α</sub> w moczu a substancjami szkodliwymi zawartymi w dymie tytoniowym [9]. Na podstawie otrzymanych wyników wykazano, że stężenie 8-iso-PGF<sub>2α</sub> jest proporcjonalnie zależne od stężenia substancji szkodliwych obecnych w dymie tytoniowym, takich jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, lotne związki organiczne i nitrozoaminy charakterystyczne dla dymu tytoniowego. Na otrzymane zależności nie wpływały inne czynniki związane ze stylem życia, takie jak ilość deklarowanej aktywności fizycznej, jakość snu czy używanie alkoholu.

W innym badaniu z udziałem grupy palaczy sprawdzano efekt palenia tytoniu na poziom stresu oksydacyjnego w dłuższej perspektywie czasowej [10]. Uczestnicy badania otrzymali przygotowane wcześniej przez badaczy wystandaryzowane papierosy, które palili przez 20 tygodni, a w tym czasie 5-krotnie pobierano od nich mocz do badań. Otrzymane wyniki stężenia 8-iso-PGF<sub>2α</sub> nie różniły się istotnie pomiędzy badanymi punktami czasowymi, co świadczy o stabilności poziomu stresu oksydacyjnego u osób palących. Wykazano natomiast istotną statystycznie dodatnią zależność pomiędzy stężeniem sumy metabolitów nikotyny w moczu a stężeniem 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, co wskazuje, że liczba wypalanych papierosów niekorzystnie wpływa na poziom stresu oksydacyjnego.

Oznaczanie stężenia F2-IzoP znajduje zastosowanie w monitorowaniu wpływu stosowanej diety na poziom stresu oksydacyjnego w organizmie. W badaniu CALARIE 2 [11] grupa zdrowych ochotników o prawidłowym wskaźniku masy ciała (*body mass index* – BMI) przez 2 lata stosowała dietę o obniżonej o 25% od zalecanej dziennej kaloryczności. W tym czasie od badanych 3-krotnie pobierano mocz i krew do analiz – na początku badania oraz po 12 i 24 mies. jego trwania. Otrzymane wyniki porównano z wynikami pochodzącymi od osób z grupy kontrolnej, które nie stosowały diety o obniżonej kaloryczności. Wszyscy uczestnicy badania byli suplementowani preparatem multiwitaminowym i wapniem w dawce 1000 mg/dobę przez cały czas trwania doświadczenia. W efekcie wykazano, że stosowanie diety o obniżonej kaloryczności zmniejszało poziom stresu oksydacyjnego, o czym świadczą istotnie statystycznie niższe stężenia wybranych do oznaczeń F2-IzoP w moczu w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną.

W innym eksperymencie oceniano, czy stężenie F2-IzoP w moczu może być przydatne jako biochemiczny wskaźnik utraty trzewnej tkanki tłuszczowej

(*visceral adipose tissue* – VAT) w grupie osób w starszym wieku (>60 r.ż.) z otyłością (BMI >30 kg/m<sup>2</sup>) [12]. Uczestnicy badania zostali podzieleni na 2 grupy, z których jedna otrzymywała dietę niskowęglowodanową, a druga – dietę niskotłuszczową przez 8 tygodni. Dodatkowo od każdej osoby pobrano krew i mocz do analizy oraz wykonano u niej badanie rezonansu magnetycznego w celu określenia dystrybucji tkanki tłuszczowej w ciele. Badania te wykonano dwukrotnie – na początku i na końcu eksperymentu. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że utrata VAT skutkuje podwyższeniem stężenia oznaczanych F2-IzoP określanych jako sumaryczny wskaźnik stężenia dla 4 oznaczanych związków w moczu, ale tylko w grupie osób stosujących dietę niskowęglowodanową. Dodatkowo stężenie F2-IzoP dodatkowo korelowało ze stężeniem interleukiny-6, uznawanej za przydatny, choć nieswoisty marker utraty VAT, co może świadczyć o przydatności oznaczania F2-IzoP w badanym kontekście.

## WNIOSKI

Oznaczanie F2-IzoP znajduje praktyczne zastosowanie w wielu dziedzinach i gałęziach badań. Badacze chętnie wykorzystują ten marker nie tylko w kontekście zaburzeń zdrowotnych związanych ze stresem oksydacyjnym, ale również poszukują możliwości zastosowania go do monitorowania zmian zachodzących w organizmie na skutek narażenia na czynniki zewnętrzne czy zmianę stylu/jakości życia.

Pomimo obowiązującej od 2018 r. rekomendacji EFSA tylko nieliczne opublikowane prace wykorzystywały do oznaczeń ilościowych izoprostanów zalecaną technikę chromatografii gazowej lub cieczonej sprzężonej ze spektrometrią mas. W 2022 r. spośród 63 publikacji w 4 wykorzystano technikę LC-MS/MS, a w 6 – GC-MS, przy czym dla tej metody 2 publikacje dotyczyły tej samej badanej kohorty.

Tematyka badań nad powiązaniem między stresem oksydacyjnym, poszukiwaniem nowych markerów oraz dalszym monitorowaniem ludzi nadal pozostają w centrum zainteresowań naukowców. Dostęp do zaawansowanej aparatury badawczej umożliwia wykorzystanie techniki LC-MS/MS do oznaczania markerów stresu oksydacyjnego dotyczących uszkodzeń DNA, tj. m.in. 8-hydroksy-2-deoksyguanozyny czy markerów peroksydacji lipidów, czyli izoprostanów, z wykorzystaniem różnorodnych matryc badawczych. Technika LC-MS/MS pozwala na równoczesne oznaczenie różnych markerów SO i czynników chemicznych ten stres

indukujących w tej samej próbce badawczej. Możliwość uzyskania wiarygodnych wyników techniką LC-MS/MS przy jednoczesnej mniejszej pracochłonności w porównaniu z techniką GC-MS, a także rekomendowanie przez EFSA technik chromatograficznych sprzężonych ze spektrometrią mas do oznaczeń F2-IzoP powoduje coraz powszechniejsze ich wykorzystanie.

## PIŚMIENNICTWO

1. Menzel A, Samouda H, Dohet F, Loap S, Ellulu MS, Bohn T. Common and Novel Markers for Measuring Inflammation and Oxidative Stress Ex Vivo in Research and Clinical Practice – Which to Use Regarding Disease Outcomes? *Antioxidants*. 2021;10(3):414. <https://doi.org/10.3390/antiox10030414>.
2. Su L-J, Zhang J-H, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D, et al. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:1–13. <https://doi.org/10.1155/2019/5080843>.
3. Andries A, Rozenski J, Vermeersch P, Mekahli D, Van Schepdael A. Recent progress in the LC–MS/MS analysis of oxidative stress biomarkers. *Electrophoresis*. 2021; 42(4):402–28. <https://doi.org/10.1002/elps.202000208>.
4. Turck D, Bresson JL, Burlingame B, Dean T, Fairweather-Tait S, Heinonen M, et al. Guidance for the scientific requirements for health claims related to antioxidants, oxidative damage and cardiovascular health. *EFSA Journal*. 2018;16(1). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5136>.
5. Ma L, Sun D, Xiu G, Lazarus P, Vachani A, Penning TM, et al. Quantification of Plasma 8-Isoprostane by High-Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry in a Case-Control Study of Lung Cancer. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(19):12488. <https://doi.org/10.3390/ijerph191912488>.
6. Coviello C, Perrone S, Buonocore G, Negro S, Longini M, Groenendaal F, et al. Oxidative Stress Biomarkers and Early Brain Activity in Extremely Preterm Infants: A Prospective Cohort Study. *Children*. 2022;9(9):1376. <https://doi.org/10.3390/children9091376>.
7. Taibl KR, Schantz S, Aung MT, Padula A, Geiger S, Smith S, et al. Associations of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) and their mixture with oxidative stress biomarkers during pregnancy. *Environ Int*. 2022;169:107541. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107541>.
8. Wu W-T, Jung W-T, Lee H-L. Lipid peroxidation metabolites associated with biomarkers of inflammation and oxidation stress in workers handling carbon nanotubes and metal oxide nanoparticles. *Nanotoxicology*. 15(5):577–87. <https://doi.org/10.1080/17435390.2021.1879303>.
9. Sambiagio N, Berthet A, Wild P, Sauvain J-J, Auer R, Schoeni A, et al. Associations between urinary biomarkers of oxidative stress and biomarkers of tobacco smoke exposure in smokers. *Sci Total Environ*. 2022;852:158361. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158361>.
10. Carmella SG, Heskin AK, Tang MK, Jensen J, Luo X, Le CT, et al. Longitudinal stability in cigarette smokers of urinary eicosanoid biomarkers of oxidative damage and inflammation. *PLoS One*. 2019;14(4):e0215853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215853>.
11. Il'Yasova D, Fontana L, Bhapkar M, Pieper CF, Spasojevic I, Redman LM, et al. Effects of 2 years of caloric restriction on oxidative status assessed by urinary F2-isoprostanes: The CALERIE 2 randomized clinical trial. *Aging Cell*. 2018;17(2):e12719. <https://doi.org/10.1111/acer.12719>.
12. Hoover SA-O, Il'Yasova D, Fontaine KR, Spasojevic I, Gower BA, Goss AM. A Pilot Study of Associations Between Visceral Fat, IL-6, and Urinary F(2)-Isoprostanes in Older Adults Exposed to a Diet Intervention. *Curr Dev Nutr*. 2021;5(6):nzab082. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzab082>.