

Jolanta Dorszewska¹, Zofia Adamczewska-Goncerzewicz¹,
Wojciech Kozubski², Jolanta Florczak²

8-Hydroksy-2'-deoksyguanozyna w chorobach neurodegeneracyjnych wieku starczego

8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine in neurodegenerative diseases of aged

¹Zakład Neurochemii Klinicznej Katedry Neurologii Akademii Medycznej w Poznaniu

²Katedra i Klinika Neurologii Akademii Medycznej w Poznaniu

Streszczenie

Celem przeprowadzonych badań było wykazanie zmian strukturalnych towarzyszących chorobie Alzheimera (AD) i chorobie Parkinsona (PD).

Badaniu poddano poziom 8-oksy-2'-deoksyguanozyny (8-oxo2dG) – markera oksydacyjnego uszkodzenia DNA w limfocytach krwi obwodowej u pacjentów z chorobą AD i PD oraz w grupie kontrolnej. 8-oxo2dG oznaczano metodą HPLC/EC/UV (wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją elektrochemiczną oraz z detekcją UV).

Wykazano, że 8-oxo2dG zawarta w limfocytach istotnie wzrasta u pacjentów z AD i PD w stosunku do kontroli równowiekowej, oraz że nie wykazuje ona istotnego wzrostu u osób pomiędzy 24 a 64 rokiem życia.

Summary

The aim of the study was to reveal the systematic structural changes in Alzheimer disease (AD) and Parkinson's disease (PD).

8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxo2dG) a marker of oxidative stress in DNA was measured in lymphocytes of AD and PD patients, and healthy controls using HPLC/EC/UV (high-pressure liquid chromatography with electrochemical and UV detections).

The content of 8-oxo2dG in lymphocytes of AD and PD patients was significantly higher than in age-matched controls. The increase of 8-oxo2dG content in the group aged 24–64 years was statistically insignificant.

Słowa kluczowe: choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, HPLC, 8-oxo2dG

Key words: Alzheimer disease, Parkinson's disease, HPLC, 8-oxo2dG

Wstęp

Dzięki znacznemu postępowi medycyny i techniki w drugiej połowie XX wieku nastąpiło wydłużenie średniej długości życia. Temu zjawisku towarzyszyło pojawienie się większej liczby zachorowań na schorzenia typowe dla wieku starczego, a więc na chorobę Alzheimera (AD) i chorobę Parkinsona (PD).

Częstość występowania choroby Alzheimera w dużym stopniu zależy od wieku pacjenta. Z badań statystycznych wynika, że u populacji pomiędzy 65–74 rokiem życia częstość zachorowań na tę chorobę wynosi zaledwie 2,5 % i 10-krotnie wzrasta między 85 a 93 rokiem życia (4). Natomiast choroba Parkinsona pojawia się około 50 roku życia i dotyczy około 1% populacji.

Wspólną cechą AD i PD jest degeneracja komórek nerwowych na drodze apoptozy w określonych strukturach mózgu (5).

Apoptoza jest wywoływana przez różnorodne czynniki fizyczne, chemiczne i biologiczne. Do tych czynników zaliczamy: promieniowanie jonizujące, aktywne kaspazy, jony wapniowe, ceramid oraz reaktywne formy tlenu (RFT) (6).

Reaktywne formy tlenu OH^\bullet , O_2 , H_2O_2 powstają w układach biologicznych jako produkty metabolizmu komórkowego i są unieczynniane przez określone systemy antyoksydacyjne komórki (1).

W procesie starzenia się (12) oraz w niektórych schorzeniach neurologicznych, w tym również w chorobach neurodegeneracyjnych obserwuje się wzrost poziomu wolnych rodników. Mechanizm generowania RFT w chorobach neurodegeneracyjnych nie jest w pełni wyjaśniony. Uważa się, że w PD przyczyną wzrostu stężenia wolnych rodników jest zmniejszenie aktywności kompleksu I łańcucha oddechowego. Natomiast w AD przyczyną narastania RFT upatruje się w złogach β amyloidu, odkładanego w neuronach istoty szarej i ścianach naczyń.

Najbardziej aktywną formą wolnych rodników jest rodnik hydroksylowy, odpowiedzialny za uszkodzenie związków biologicznie czynnych takich jak: białka, lipidy i kwasy nukleinowe.

Wolne rodniki w cząsteczce DNA najczęściej powodują mutagenezę guaniny i prowadzą do powstawania 8-oksy-2'-deoksyguanozyny (8-oxo2dG) nazywanej również 8-hydrokso-2'-deoksyguazyną (8-OHdG) (3, 13). Istnieje wiele przesłanek, że związek ten może być biomarkerem oksydacyjnego uszkodzenia DNA.

8-oxo2dG posiada zdolności tworzenia par zasad z cytozyną oraz z adeniną. Utworzone pary zasad są przyczyną znacznego wzrostu częstości spontanicznych mutacji wbudowywanych do DNA. Do usuwania 8-oxo2dG z DNA komórka wykorzystuje specyficzną glikozylazę DNA.

Obecność 8-oxo2dG w DNA jest wynikiem zarówno upośledzenia układu antyoksydacyjnego organizmu, zależnego zarówno od stopnia zaawansowania choroby, jak i nieprecyzyjnej naprawy uszkodzonego kwasu nukleinowego (3).

Obecnie do oznaczania 8-oxo2dG w materiale biologicznym stosuje się metodę HPLC/UV/EC (wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją UV oraz z detekcją elektrochemiczną) ze względu na wyraźny sygnał elektrochemiczny tego związku przy wartości potencjału około 400 mV (w odróżnieniu od innych nukleozydów) (7). Monitorowanie 8-oxo2dG u pacjentów z AD i PD może przyczynić się do wczesnego wykrycia choroby oraz może być pomocne przy diagnozowaniu chorób neurodegeneracyjnych.

Wczesne wykrycie chorób neurodegeneracyjnych oraz jednoznaczne ich zdiagnozowanie może przyczynić się do większej skuteczności leczenia pacjentów, uważanych obecnie za nieuleczalnie chorych.

Material i metody

Badaniu poddano 2 grupy kontrolne oraz chorych z rozpozną (na podstawie badañ klinicznych) chorobą Alzheimera i chorobą Parkinsona.

Pierwszà grupę kontrolną stanowiło 8 osób (7 kobiet i 1 mężczyzna) w wieku 24 do 46 lat (średnia wieku wynosiła $32,2 \pm 9,7$ lat) (tabela 1).

Tabela 1. Poziom 8-oxo2dG wyrażony jako stosunek 8-oxo2dG/dGx10⁻⁴ w grupie kontrolnej

Lp.	Wiek (lata)	Płeć	8-oxo2dG/dGx10 ⁻⁴
1	43	K	20,1
2	24	K	3,4
3	24	K	19,3
4	32	K	18,2
5	23	K	9,5
6	46	K	7,0
7	41	K	4,9
8	25	M	3,9

K – kobieta; M – mężczyzna; średnia wieku: $32,2 \pm 9,7$

Drugą grupę kontrolną, czyli kontrolę równowiekową (w stosunku do grup badanych) stanowiło 13 osób (10 kobiet i 3 mężczyzn) w wieku 49 do 64 lata (średnia wieku wynosiła $55,9 \pm 5,5$ lat) (tabela 2).

Tabela 2. Poziom 8-oxo2dG wyrażony jako stosunek 8-oxo2dG/dGx10⁻⁴ w grupie kontrolnej równowiekowej

Lp.	Wiek (lata)	Płeć	8-oxo2dG/dGx10 ⁻⁴
1	63	K	11,7
2	64	K	15,2
3	55	K	5,9
4	57	K	7,5
5	63	M	8,8
6	60	K	2,5
7	49	K	3,4
8	52	K	8,9
9	60	M	2,5
10	52	K	2,6
11	50	K	6,9
12	50	K	4,2
13	52	M	14,3

K – kobieta; M – mężczyzna; średnia wieku: $55,9 \pm 5,5$

Pierwszą grupę badaną stanowiło 6 osób z rozpoznaną chorobą Alzheimera (4 kobiety i 2 mężczyzn w wieku 50 do 77 lat, średnia wieku wynosiła $63,5 \pm 11,9$ lat) (tabela 3), natomiast drugą grupę badaną stanowiło 8 osób z rozpoznaną chorobą Parkinsona (mężczyźni w wieku 34 do 74 lata, średnia wieku wynosiła $60,8 \pm 12,5$ lat) (tabela 4).

Tabela 3. Poziom 8-oxo2dG wyrażony jako stosunek 8-oxo2dG/dG $\times 10^{-4}$ w grupie pacjentów z rozpoznaną chorobą Alzheimera

Lp.	Wiek (lata)	Płeć	8-oxo2dG/dG $\times 10^{-4}$
1	64	K	22,8
2	62	M	60,8
3	51	K	32,2
4	50	K	34,4
5	77	M	62,2
6	77	K	6,9

K – kobieta; M – mężczyzna; średnia wieku: $63,5 \pm 11,9$

Tabela 4. Poziom 8-oxo2dG wyrażony jako stosunek 8-oxo2dG/dG $\times 10^{-4}$ w grupie pacjentów z rozpoznaną chorobą Parkinsona

Lp.	Wiek (lata)	Płeć	8-oxo2dG/dG $\times 10^{-4}$
1	64	M	17,5
2	34	M	16,5
3	59	M	6,0
4	53	M	19,0
5	68	M	15,9
6	66	M	53,2
7	68	M	2,3
8	74	M	23,4

M – mężczyzna; średnia wieku: $60,8 \pm 12,5$

U osób z obydwu grup kontrolnych i z obydwu grup badanych wykonano pomiar 8-oksyo-2'-deoksyguanozyny (8-oxo2dG) i deoksyguanozyny (dG) we krwi obwodowej metodą HPLC/UV/EC (wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją UV i detekcją elektrochemiczną).

W celu wyodrębnienia 8-oxo2dG i dG z materiału biologicznego, izolowano DNA z limfocytów krwi metodą wysolenia (8, 9). Wyizolowane DNA poddawano następnie hydrolizie do nukleozydów za pomocą nukleazy P_1 oraz alkalicznej fosfatazy (10). W celu oznaczenia poziomu dG mieszaninę nukleozydów podawano do układu HPLC/UV typ P580A/PG firmy Gynkotek (Niemcy), połączonego z detektorem elektrochemicznym CoulArray 5600, ESA (USA), używanym do

oznaczania 8-oxo2dG. Do analizy obu związków zastosowano kolumnę Termo-Hypersil BDS C18 (250×4,6×5 μ) (Niemcy).

Analizę prowadzono w warunkach izokratycznych, używając jako fazy ruchomej (przepływ 0,6 ml/min.) 10 mM buforu fosforanowego o pH = 5,0 z dodatkiem 2–5% metanolu. Do detekcji elektrochemicznej 8-oxo2dG użyto 3 potencjałów: 150, 260, 400 mV. Natomiast do detekcji dG metodą HPLC/UV użyto analitycznej długości fali 256 nm. Do sterowania układem, zbierania i obróbki danych użyto oprogramowania Chromeleon (Gynkotek, Niemcy). Dane wyrażono jako stosunek utlenionych nukleozydów w postaci 8-oxo2dG do niezmodyfikowanej dG (8-oxo2dG/dG) (11).

Analiza statystyczna wyników

Uzyskane wyniki badań w grupach kontrolnych i w grupach badanych porównywano nieparametrycznym testem Manna-Whitney'a dla zmiennych niepowiązanych.

Wyniki

Analizowano poziom 8-oxo-2'-deoksyguanozyny (8-oxo2dG) zawartej w DNA, wyizolowanym z limfocytów krwi obwodowej.

Zawartość 8-oxo2dG, wyrażoną stosunkiem 8-oxo2dG/dG (deoksyguanozyna) oznaczono w dwóch grupach kontrolnych: w kontroli do 46 roku życia (tabela 1) oraz w kontroli równowiekowej w stosunku do wieku badanych pacjentów (średnia wieku 55,9 ± 5,5 lat) (tabela 2).

Jak wynika z tabeli 5, pomiędzy grupami kontrolnymi nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w teście Manna-Whitney'a.

Uzyskane wyniki badań w obydwu grupach kontrolnych porównywano z wynikami uzyskanymi u pacjentów z rozpoznaną chorobą Alzheimera (AD) (tabela 3) oraz z rozpoznaną chorobą Parkinsona (PD) (tabela 4). Stwierdzono statystycznie istotne różnice przy poziomie istotności $p < 0,05$ (test Manna-Whitney'a) pomiędzy kontrolą do 46 roku życia a grupą pacjentów z AD, oraz pomiędzy kontrolą równowiekową a grupą pacjentów z PD (tabela 5). Ponadto 8-oxo2dG oznaczona w kontroli równowiekowej wykazywała statystycznie istotne różnice przy poziomie $p < 0,01$ w porównaniu z poziomami oznaczonymi u chorych na AD (tabela 5).

Tabela 5. Poziom 8-oxo2dG/dG×10⁻⁴ w grupach kontrolnych oraz w grupach chorych z rozpoznaną chorobą Alzheimera oraz z rozpoznaną chorobą Parkinsona

Analizowany związek	Kontrola	Kontrola równowiekowa	Choroba Alzheimera	Choroba Parkinsona
8-oxo2dG/dG×10 ⁻⁴	10,8 ± 7,2	7,3 ± 4,4	36,6 ± 21,6 ^(**)	19,2 ± 15,4 ^(*)

Wyniki z 6–13 oznaczeń ± SD

Użyto nieparametrycznego testu Manna-Whitney'a dla zmiennych niepowiązanych

Statystycznie istotne różnice przy poziomie * $p < 0,05$ (w porównaniu z kontrolą)

Statystycznie istotne różnice przy poziomie ^(*) $p < 0,05$ (w porównaniu z kontrolą równowiekową)

Statystycznie istotne różnice przy poziomie ^(**) $p < 0,01$ (w porównaniu z kontrolą równowiekową)

Analizie statystycznej poddano również wyniki uzyskane w obydwu schorzeniach neurodegeneracyjnych ale nie uzyskano statystycznie istotnych różnic poziomu 8-oxo2dG w teście Manna-Whitney'a pomiędzy poszczególnymi grupami chorych (tabela 5), pomimo dwukrotnego wzrostu stężenia 8-oxo2dG w AD.

Zarówno wśród chorych na chorobę Alzheimera (1 przypadek, tabela 3), jak i wśród chorych na chorobę Parkinsona (2 przypadki, tabela 4) pojawiły się przypadki z nieuszkodzonym DNA.

Dyskusja

Choroby neurodegeneracyjne, uznawane obecnie za nieuleczalne stanowią poważny problem społeczny i ekonomiczny dla gospodarki wielu krajów.

Obecnie w wielu ośrodkach na świecie prowadzi się intensywne badania nad wprowadzeniem skutecznych metod wczesnego rozpoznania oraz jednoznacznego diagnozowania chorób neurodegeneracyjnych.

W drugiej połowie lat 90. ubiegłego stulecia rozpoczęto badania nad opracowaniem metody oznaczania 8-oksy-2'-deoksyguanozyny (8-oxo2dG) – produktu oksydacyjnego uszkodzenia DNA metodą HPLC-EC (wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją elektrochemiczną) w USA (7), a w kilka lat później w Europie Zachodniej (11).

Obecnie nasza placówka dołączyła do światowych ośrodków zajmujących się badaniem poziomu 8-oxo2dG w różnych schorzeniach, w tym również w chorobach neurodegeneracyjnych. Analiza 8-oxo2dG w chorobie Alzheimera (AD) i w chorobie Parkinsona (PD) jest pierwszą pracą wykonaną w naszym ośrodku nad oksydacyjnym uszkodzeniem DNA.

AD i PD należą do chorób neurodegeneracyjnych o nie w pełni poznanym patomechanizmie uszkodzeń określonych struktur mózgu. Obecnie przyczyn uszkodzeń neuronów w tych schorzeniach dopatruje się również w oksydacyjnym uszkodzeniu DNA. Wiadomo, że oksydacyjnemu uszkodzeniu DNA w komórkach nerwowych towarzyszy uszkodzenie DNA w komórkach obwodowych. Z doniesień piśmiennictwa (10) i z badań własnych wynika, że DNA zawarte w limfocytach krwi obwodowej ulega (poza nielicznymi przypadkami) oksydacyjnemu uszkodzeniu zarówno w AD, jak i w PD. W niniejszej pracy wykazano również, że intensywność tych zmian zależy od rodzaju choroby neurodegeneracyjnej i przebiega z prawie dwukrotnie wyższym nasileniem w AD niż w PD. Wydaje się, że przyczyna tego zjawiska tkwi w zróżnicowanym patomechanizmie generowania reaktywnych form tlenu (RFT), czynników bezpośrednio odpowiedzialnych za uszkodzenie DNA w obydwu schorzeniach (2).

Z doniesień piśmiennictwa (12) wynika również, że poziom RFT wzrasta także w procesie starzenia się, na skutek osłabienia układu antyoksydacyjnego organizmu. W badaniach własnych wykazano, że fizjologicznie proces starzenia rozpoczyna się po 64 roku życia. Świadczy o tym brak istotnego przyrostu uszkodzonego DNA pomiędzy 24 a 64 rokiem życia.

Uszkodzenia DNA w grupie osób pomiędzy 24 a 64 rokiem życia (w niewielkim stopniu zależą od wieku) przybierają najbardziej zbliżone wartości w przedziale wiekowym $55,9 \pm 5,5$ lat (kontrola równowiekowa). Ten przedział wiekowy odpowiada również wiekowi chorych na AD i PD i może być wykorzystany do wyznaczenia wartości referencyjnych przy oznaczaniu oksydacyjnego uszkodzenia DNA u tych chorych.

Rozszerzenie badań poziomu oksydacyjnego uszkodzenia DNA na inne schorzenia neurodegeneracyjne oraz na proces starzenia się mózgu, nierozłącznie związany z patogenezą schorzeń wieku starczego pozwoli na dokładniejsze poznanie patomechanizmu tych chorób i być może przyczyni się do pełniejszego różnicowania chorób o tej samej etiologii.

Wnioski

1. Poziom 8-oxo2dG wzrasta zarówno w chorobie Alzheimera jak i w chorobie Parkinsona.
2. Wskaźnik oksydacyjnego uszkodzenia DNA przyjmuje wartości prawie dwukrotnie wyższe w chorobie Alzheimera niż w chorobie Parkinsona.
3. Wartości referencyjne przy oznaczaniu poziomu 8-oxo2dG u pacjentów z AD i PD należy wyznaczyć w oparciu o kontrolę równowiekową.
4. Pomędzy 24 a 64 rokiem życia nie następuje istotne oksydacyjne uszkodzenie DNA.

Piśmiennictwo

1. Ames B.N., Gold L.S., Willett W.C. The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92, 5258–5265.
2. Barcikowska M., Kwieciński H. Choroba Alzheimera: Od bamyloidu do bezradnego człowieka. *Medipress Psychiatria-Neurologia* 1997, 1, 16–21.
3. Barciszewski J., Barciszewska M.Z., Rattan S.I.S., Clark B.E.C. The structure and properties of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine—a novel biomarker in aging and carcinogenesis studies. *Polish J. Chem.* 1995, 69, 841–851.
4. Bilikiewicz A. Pierwotne zespoły otępienne. *Medipress Psychiatria-Neurologia* 1998, 2, 2–9.
5. Cotman C.W., Anderson A.J. A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol* 1995, 10, 19–45.
6. Dorszewska J., Adamczewska-Goncerczewicz Z. Różne drogi apoptozy w guzach mózgu. *Neuroskop*, 2000 2, 209–214.
7. Helbock H.J., Beckman K.B., Shigenaga M.K., Walter P.B., Woodall A.A., Yeo C.H., Ames B.N. DNA oxidation matters: The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 288–293.
8. Leadon S.A., Cerutti P.A. A rapid and mild procedure for the isolation of DNA from mammalian cells. *Anal. Biochem.* 1982, 120, 282–288.
9. Longmire J.L., Albright K.L., Lewis A.K., Meincke L.J., Hildebrand C.E. A rapid and simple method for the isolation of high molecular weight cellular and chromosome-specific DNA in solution without the use of organic solvents. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 859.

10. Mecocci P., Polidori M.C., Ingegni T., Cherubini A., Chionne F., Ceconetti R., Senin U. Oxidative damage to DNA in lymphocytes from AD patients. *Neurology* 1998, 51, 1014–1017.
11. Olsen A., Siboska G.E., Clark B.F.C., Rattan S.I.S. N⁶-Furfuryladenine, kinetin, protects against Fenton reaction-mediated oxidative damage to DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 265, 499–502.
12. Stadtman E.R. Protein oxidation and aging. *Science* 1992, 257, 1220–1224.
13. Zastawny T.H. DNA oxidative damage-free radical modification of bases and sugar moieties. *Postepy Biochem.* 1997, 43, 238–250.