
MALONDIALDEHYDE – OXIDATIVE STRESS MARKER

Desislava Arabadzhyska

Department of clinical laboratory, Faculty of Pharmacy, Medical University-Plovdiv,
Bulgaria desiarda@yahoo.com

Dora Terzieva

Department of clinical laboratory, Faculty of Pharmacy, Medical University-Plovdiv,
Bulgaria

Abstract: Oxygen keeps the aerobic life and is essential for energy metabolism and respiration. It takes part in the pathogenesis of a number of diseases and degenerative conditions.

Normal oxidation processes in the human body are reduced, with few exceptions, to the removal of electrons (hydrogen) from various compounds that bind to oxygen or other acceptors. In the process where O₂ undergoes a reduction, several transition forms are formed, such as superoxide (O₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂) and the highly reactive hydroxyl radical (OH·) - combined under the term reactive oxygen species (ROS).

At the molecular level, the main mechanism by which free radicals carry out their toxic action is lipid peroxidation. Typically, it proceeds with branching chains, whereby each new molecule of hydrogen peroxide generates a new radical giving rise to a branch of the main chain. This non-enzymatic lipid oxidation process is called lipid peroxidation because the oxidation of the substrate takes place by the addition of a peroxide group (-O-O-). Lipid peroxidation gives many toxic products - lipid radicals, singlet oxygen, hydroxyl radicals, lipid hydroperoxides, aldehydes, ketones, alcohols, hydrocarbon gases, etc. It damages all the lipid components of the cells, altering their normal biological functions. Most of its molecular and radical products actively interact with other types of biomolecules. One of the most popular by-products of lipid peroxidation in the human body is serum malondialdehyde (MDA). It is an organic, highly reactive compound that can be determined by spectrophotometric, chromatographic and immunoenzymatic methods. Its spectrophotometric concentration is measured by the intensity of the colour product produced by reaction with thiobarbituric acid (TBA). Since this colour product can also be the result of other present compounds, it is more accurate to say that TBA-reactive material (TBARM) is determined. The HPLC method has the high analytical specificity and sensitivity. ELISA methods are based on sandwich technique with two antibodies. They have good analytical reliability characteristics and are used in practice.

MDA is believed to have cytotoxic, mutagenic and carcinogenic properties as well as inhibits enzymes associated with the protection of cells against oxidative stress. The processes that occur contribute to the development of a number of diseases such as diabetes mellitus, metabolic syndrome, polycystic ovary syndrome, atherosclerosis, Alzheimer's disease, cancer and many others.

Keywords: oxidative stress, malondialdehyde, free radicals

МАЛОНДИАЛДЕХИДЪТ – МАРКЕР НА ОКСИДАТИВЕН СТРЕС

Десислава Арабаджийска

Катедра по клинична лаборатория, Факултет по фармация, Медицински Университет-Пловдив,
България desiarda@yahoo.com

Дора Терзиева

Катедра по клинична лаборатория, Факултет по фармация, Медицински Университет-Пловдив,
България

Резюме: Кислородът, който поддържа аеробния живот и е есенциален за енергийния метаболизъм и дишане, участва в патогенезата на редица заболявания и дегенеративни състояния.

Нормалните окислителни процеси в човешкия организъм се свеждат, с малки изключения, до отнемане на електрони (водород) от различни съединения, които се свързват с кислорода или друг акцептор. В процеса, при който O₂ търпи редукция, се формират няколко преходни форми, като супероксид (•O₂⁻), водороден пероксид (H₂O₂) и изключително реактивния хидроксилен радикал (•OH) – обединени под термина реактивни кислородни видове (reactive oxygen species - ROS).

На молекулно ниво, основният механизъм, посредством който свободните радикали осъществяват токсичното си действие е липидната пероксидация. Обикновено тя протича с разклоняващи се вериги, при което от всяка новополучена молекула водороден пероксид се генерира нов радикал, даващ начало на разклонение на основната верига. Този неензимен процес на окисление на липидите е наречен липидна пероксидация поради това, че при него окислението на субстрата протича с присъединяване на пероксидна група (-O-O-). Липидната пероксидация дава много токсични продукти - липидни радикали,

синглетен кислород, хидроксилни радикали, липидни хидропероксиди, алдехиди, кетони, алкохоли, въглеродородни газове и др. Тя уврежда всички липидни компоненти на клетките, променяйки техните нормални биологични функции. Повечето от нейните молекулни и радикални продукти активно взаимодействуват и с други видове биомолекули. Един от най-известните вторични продукти на липидната пероксидация в човешкия организъм е серумният малондиалдехид (MDA). Той е органично, високо реактивно съединение, което може да се определя чрез спектрофотометрични, хроматографски и имуноензимни методи. Спектрофотометрично концентрацията му се измерва по интензитета на цветния продукт, който се получава при реакцията му с тиобарбитуровата киселина (ТВА). Тъй като този цветен продукт може да бъде резултат и от други присъстващи съединения, по-точно е да се казва, че се определя ТВА-реагиращ материал (ТВАМ). HPLC методът има високата аналитична специфичност и чувствителност. ELISA методите се базират на сандвичева техника с две антитела. Те са с добри характеристики на аналитичната надеждност и намират приложение в практиката.

Счита се, че MDA има цитотоксични, мутагенни и канцерогенни свойства, както и инхибира ензимите, свързани със защитата на клетките срещу оксидативен стрес. Процесите, които настъпват, допринасят за развитието на редица заболявания като захарен диабет, метаболитен синдром, поликистозен овариален синдром, атеросклероза, болест на Алцхаймер, рак и много други.

Ключови думи: оксидативен стрес, малондиалдехид, свободни радикали

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Кислородът, който поддържа аеробния живот, от една страна е есенциален за енергийния метаболизъм и дишане, а от друга, участва в патогенезата на редица заболявания и дегенеративни състояния.

2. ИЗЛОЖЕНИЕ

Важна последица от нарушения баланс между прооксидантите и антиоксидантите (в полза на прооксидантите) е оксидативното увреждане на клетките, тъканите и органите на човешкия организъм.

В клетката непрекъснато протичат реакции на окисление и редуция, като окислителните реакции са основните доставчици на енергия за клетъчните жизнени процеси. Главната роля на биологичното окисление е образуването на вода от водород и кислород [1]. Окислението на водорода се извършва посредством верига от междинни реакции (дихателната верига), която протича в митохондриите. Една двуатомна кислородна молекула се нуждае от четири електрона за да се превърне във вода. Дихателната верига, обаче, не винаги успява да достави по четири електрона на всички преминаващи през нея кислородни молекули. В резултат на това се получават междинни продукти на кислорода, снабдени само с два или само с три електрона. При редуцирането на кислорода се образуват частично редуцирани междинни продукти, наречени свободни радикали или реактивни кислородни видове (reactive oxygen species - ROS) [2]. Те са резултат на окислително-редукционно превръщане, водещо до появата на свободна валентна орбитала в донорската молекула на новия електрон или обратно откъсването на един електрон от общата електронна двойка [3]. Обикновено такива реакции с избиване на електрон протичат с участието на метални йони с променлива валентност. Много по-рядко свободните радикали се образуват в резултат на хомолиза (разкъсването на химическите връзки), в резултат на което двете образувани частици имат по един несдвоен електрон.

За първи път през 1954 г. Gershan и сътрудници изказват предположението, че токсичният ефект на кислорода се предизвиква от образуването на активни кислородни радикали [6]. По-късно тази тяхна хипотеза се популяризира след откриването на ензима супероксид дисмутаза и се развива като супероксидна теория на токсичния кислород [7]. Доразвива се и експериментално се потвърждава от проучванията на Фридович [4, 6].

Известни са различни механизми за ендогенно производство на ROS, включващи ензимни реакции и/или автооксидация на някои съединения, като катехоламини и хидрохинон [8]. Различни екзогенни фактори, като йонизиращото лъчение, ултравиолетовите лъчи, тютюневия дим, патогенните инфекции, токсините в околната среда и излагането на токсични/инсектицидни средства, са *in vivo* източници на ROS [2].

Най-важни за човешкия организъм преходни форми, които се образуват при редуция на кислород са супероксидния радикал ($\bullet\text{O}_2^-$) и хидроксилния радикал ($\bullet\text{OH}$) [6, 7]. Без да са радикали, водородният пероксид (H_2O_2), синглетният кислород (1O_2) и други хидроксипероксиди също са ROS с потенциално висока цитотоксичност. Повечето ROS реагират като силни окислителни. Най-мощна окислителна активност притежават $\bullet\text{OH}$ и 1O_2 [4, 9,10].

Супероксидният радикал ($\bullet\text{O}_2^-$) е първият продукт на едноелектронната редуция на кислорода [1, 2]. По химични свойства той е по-скоро редуциращ, отколкото окисляващ радикал. $\bullet\text{O}_2^-$ лесно се протонира до хидропероксилен радикал ($\bullet\text{HO}_2$), който има по-висока реактивност. При отсъствие на метални йони с променлива валентност супероксидните радикали се превръщат в хидроген пероксиди

под действието на ензима супероксиддисмутаза (SOD). Получените пероксиди се превръщат от фагоцитите в хипохлорит – съединение, което разрушава структури от клетъчната мембрана под действие на ензима миелопероксидаза (MPO). Излишното количество от хидроген пероксиди се отстранява под действие на два ензима: глутатионпероксидаза и каталаза. $\bullet\text{O}_2^-$ не може пряко да окислява полиненаситените мастни киселини и по тази причина не може непосредствено да причинява увреждания на липидите в клетъчните мембрани [11]. Уврежда главно белтъчни молекули (ензими, рецептори) и елементи на мускулното влакно [1]. Той е главен фактор, предизвикващ бавното преждевременно стареене на организма.

Хидроксилният радикал ($\bullet\text{OH}$) е изключително активен и уврежда белтъчните молекули, нуклеиновите киселини и липидите на биологичните мембрани. Той е малък, силно подвижен, водноразтворим и химически най-реактивен радикал. Има кратък полуживот, образува се при клетъчния метаболизъм на кислорода, но и при редица стресови условия. Всяка секунда клетката произвежда около 50 $\bullet\text{OH}$ [12]. Има данни, че за едно денонощие се образуват около 4 милиона $\bullet\text{OH}$. $\bullet\text{OH}$ неспецифично атакува биомолекули в непосредствена близост. Установено е неговото участие в невродегенеративни [13,14], сърдечно-съдови [15] и ракови [16,17] заболявания. $\bullet\text{OH}$ засяга клетъчни липидни структури, като се образуват липопероксидни радикали ($\bullet\text{LOO}$).

Хидроген пероксидът (H_2O_2) се образува от директна редукция на кислорода или чрез дисмутацията на $\bullet\text{O}_2^-$ [1]. Той е липидоразтворим и лесно преминава мембранните структури. Въпреки че не е радикал, H_2O_2 има силно окислително действие и уврежда клетките на човешкия организъм като разрушава липидния слой на клетъчната мембрана. Отпадните продукти от разградените мастни киселини (малондиалдехид, пентан и др.) могат да се измерят, давайки представа за тежестта на увреждането. Защитата срещу H_2O_2 се поема от два ензима – каталаза и глутатионова пероксидаза, действаща с помощта на редуцирания глутатион.

На молекулно ниво, основният механизъм, посредством който свободните радикали осъществяват токсичното си действие е липидната пероксидация [2]. Това е обусловено от нейния верижан автокаталитичен характер, от способността ѝ да увеличава броя на инициралите я радикали (така тя се самоускорява и се мултиплицират ефектите на радикалното увреждане), както и от многообразието и токсичността на нейните продукти. Обикновено тя протича с разклоняващи се вериги, при което от всяка новополучена молекула водороден пероксид се генерира нов радикал, даващ начало на разклонение на основната верига. Този неензимен процес на окисление на липидите е наречен липидна пероксидация поради това, че при него окислението на субстрата протича с присъединяване на пероксидна група (-O-O-). При липидната пероксидация се получават много токсични продукти - липидни радикали, синглетен кислород, хидроксилни радикали, липидни хидропероксиди, алдехиди, кетони, алкохоли, въглеродородни газове и др. [18]. Тя уврежда всички липидни компоненти на клетките, променяйки техните нормални биологични функции. Повечето от нейните молекулни и радикални продукти активно взаимодействуват и с други видове биомолекули [19]. Съществено ускоряване на липидната пероксидация се наблюдава в присъствие на неголеми количества от йони на двувалентното желязо [2]. В този случай се извършва разклоняване на окислителните вериги в резултат на взаимодействието на Fe^{2+} с липидните хидроперекиси (LOOH). Образуваните алкоксилни радикали ($\bullet\text{LO}$) иницират нови вериги на липидна пероксидация. Всъщност, окислителните вериги в биологичните мембрани могат да бъдат съставени от десетки и повече звена. В резултат от взаимодействие на свободните радикали с антиоксидантите, с йоните на металите с променлива валентност (например, с Fe^{2+} , Cu^+) или един с друг, окислителната верига се разкъсва.

Един от най-важните вторични продукти на липидната пероксидация в човешкия организъм е серумният малондиалдехид (MDA). Той е продукт на верижното прекисно окисление на липидите (накъсването на полиненаситените мастни киселини до по-къси фрагменти) под действие на ROS [2]. MDA е органично съединение с моларна маса $72.06 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, обикновено съществува в енолна форма. Той е разтворим във вода, метанол и етанол, умерено разтворим в метиленхлорид и неразтворим в диетилов етер [20]. Във воден разтвор MDA съществува в две форми с различен абсорбционен максимум в зависимост от pH: за $\text{pH} < 3$ абсорбционният максимум е при $\lambda_{245} \text{ nm}$, а за $\text{pH} > 7$ той е при 267 nm [21]. Той е важен продукт в синтеза на тромбоксан A_2 , където циклооксигеназа1 или циклооксигеназа2 метаболизира арахидонова киселина до простагландин H_2 [22]. Благодарение на неговите карбонилни групи, MDA е химически реактивен [23]. Той полимеризира лесно и взаимодейства с нуклеофилни центрове на различни биомолекули, включително ДНК и аминокиселинни остатъци в протеини. MDA взаимодейства с аминокиселини на протеиновите молекули, в резултат на което се образуват междумолекулни връзки. Това предизвиква деструкция или полимеризация на протеиновите молекули,

както и включване на продукти на пероксидацията в тяхната структура. Чрез MDA и чрез други продукти липидната пероксидация опосредства свободно-радикалово увреждане на клетъчните протеини (структурни и ензимни) с последваща денатурация, инактивиране на ензимни системи и др [21].

Биохимичните механизми на ДНК увреждането, предизвикано от MDA, са коментирани от много учени през последните три десетилетия. Според проучване на Марнет, MDA има мутагенни и канцерогенни свойства [24]. По-късно Марнет и Нидерхофер съобщават, че мутагенни ефекти са наблюдавани при концентрации на MDA над 6 порядъка от патолофизиологичните нива на MDA в биологичните течности и тъкани [25].

MDA може да се определя чрез спектрофотометрични, хроматографски и имуноензимни методи. Спектрофотометрично концентрацията му се измерва по интензитета на цветния продукт, който се получава при реакцията му с тиобарбитуровата киселина (ТВА) [26]. Тъй като този цветен продукт може да бъде резултат и от други присъстващи съединения, по-точно е да се казва, че се определя ТВА-реагиращ материал (ТВАМ). HPLC методът има високата аналитична специфичност и чувствителност [27, 28]. ELISA методите се базират на сандвичева техника с две антитела. Те са с добри характеристики на аналитичната надеждност и намират приложение в практиката.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

MDA е основен продукт на разграждането на полиненаситените мастни киселини и важен маркер на липидната пероксидация. Определянето му допринася за по-детайлното разбиране на ролята, която играе оксидативния стрес в патогенезата на редица заболявания в човешкия организъм.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Е. Гачев, Медицинска биохимия, 2011
- [2] Н. Цветков, П. Бочев, Свободно – радикални увреждания и перспективи на антиоксидантната профилактика и терапия, 1995
- [3] М. Атанасова, Биологичноактивни вещества - източници на антиоксиданти, 2011
- [4] И. Фридович, Радикалы кислорода, пероксид водорода и токсичность кислорода, Свободные радикалы в биологии, М: Мир. Т.1, 272-314, 1979
- [5] А. Ю. Владимиров, Свободные радикалы и антиоксиданты, Вестн. РАМН, № 7, 43–51, 1998
- [6] Harborne J.B., The Flavonoids. Advances in research since 1986, Chapman and Hall, London, UK, 1994
- [7] V. J., Lushchak, Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria. Biochemistry, 665, 476-489, 2001
- [8] L. Moldovan and N. I. Moldovan, Oxygen free radicals and redox biology of organelles, Histochemistry and Cell Biology, vol.122, no.4, pp.395–412, 2004
- [9] A. B. Fisher, Oxidants and Antioxidants: Transatlantic Airway Conference, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 166, S2-S3, 2002
- [10] P. A. Frei, Coenzymes and Radicals. Science, 294, 2489-2490, 2001
- [11] Aikens J., T. A. Dix, Peroxyl radical ($\bullet\text{HOO}$) initiated lipid peroxidation: The role of fatty acid hydroperoxides, J. Biol. Chem., 266, 15091-15098, 1991
- [12] N. Lane, Oxygen: The Molecule that Made the World, Oxford University Press, 2002
- [13] J. L. Venero, M. Revuelta, L. Atikieta, Evidence for dopamine derived hydroxyl radical formation in the nigrostriatal system in response to axotomy, Free Radical Biology and Medicine, vol. 34, no.1, 111–123, 2003
- [14] R. J. Castellani, K. Honda, X. Zhu et al., Contribution of redox-active iron and copper to oxidative damage in Alzheimer disease, Ageing Research Reviews, vol. 3, no. 3, 319–326, 2004
- [15] B. Lipinski, E. Pretorius, Hydroxyl radical-modified fibrinogen as a marker of thrombosis: the role of iron, Hematology, vol.17, no.4, 241–247, 2012
- [16] M. Dizdaroglu, P. Jaruga, Mechanisms of free radical induced damage to DNA, Free Radical Research, vol.46, no.4, 382–419, 2012
- [17] T. Kanno, K. Nakamura, H. Ikai, K. Kikuchi, K. Sasaki, Y. Niwano, Literature review of the role of hydroxyl radicals in chemically-induced mutagenicity and carcinogenicity for the risk assessment of a disinfection system utilizing photolysis of hydrogen peroxide, Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, vol.51, no.1, 9–14, 2012
- [18] A. Ayala, M. Munoz, S. Arguelles, Lipid Peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, Article ID 360438, 2014

- [19] J. F. Woolley, J. Stanicka, T. G. Cotter, Recent advances in reactive oxygen species measurement in biological systems, *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 36, no.11, 556-565, 2013
- [20] V. Nair, C. L. O'Neil, P. G. Wang, Malondialdehyde. In: *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 2008
- [21] T.W. Kwon, B.M. Watts, Determination of malonaldehyde by ultraviolet spectrophotometry, *J. Food Sci.* 28, 627-630, 1963
- [22] Davey MW, Stals E, Panis B, Keulemans J, Swennen RL, High-throughput determination of malondialdehyde in plant tissues, *Analytical Biochemistry*, 347 (2): 201–207, 2005
- [23]. V. Nair, C. L. O'Neil, P. G. Wang, Malondialdehyde, *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 2008
- [24] L.J. Marnett, Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde, *IARC Sci. Publ.* 150, 17-27, 1999
- [25] L.J. Niedernhofer, J.S. Daniels, C.A. Rouzer, E. Greene, L.J. Marnett, Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells, *J. Biol. Chem.* 278, 31426-31433, 2003
- [26] A. M. Jentsch, H. Bachmann, P. Furst, H. K. Biesalski, Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids, *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 20, No. 2, 251-256, 1996
- [27] Z. Singh, I. P. Karthigesu, P. Singht, R. Kaur, Use of Malondialdehyde as a Biomarker for Assessing Oxidative Stress in Different Disease Pathologies: a Review, *Iranian J Publ Health*, Vol. 43, No.3, 7-16, 2014
- [28] E. Fogarasi, M. Dumitru Croitoru, I. Fülöp, E. Nemes-Nagy, R.Gabriel Tripon, Z. Simon-Szabo, D. Muntean, Malondialdehyde levels can be measured in serum and saliva by using a fast HPLC method with visible detection, *Revista Română de Medicină de Laborator* Vol. 24, Nr. 3, 2016