

Received: 2015.05.15
Accepted: 2016.01.20
Published: 2016.05.16

Karbamyłacja białek – mechanizm, przyczyny i skutki

Carbamylation of proteins – mechanism, causes and consequences

Anna Pieniążek¹, Krzysztof Gwoździński²

¹Katedra Biofizyki Medycznej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

²Katedra Biofizyki Molekularnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie

Karbamyłacja jest potranslacyjną modyfikacją białek wynikającą z nieenzymatycznego wiązania się kwasu izocyjanowego do ich wolnych grup funkcyjnych, zwłaszcza do wolnych grup aminowych. Reakcja ma duży wpływ na właściwości strukturalne i funkcjonalne białek. W ten sposób proces karbamyłacji przyczynia się do przyspieszenia procesu starzenia się białek.

Obecny w organizmie mocznik może być przekształcany w cyjanian, a ten w bardziej reaktywną postać, jaką jest kwas izocyjanowy. Wysokie stężenia mocznika w organizmie wiążą się z różnymi chorobami, a zwłaszcza z niewydolnością nerek. W organizmie cyjanian występuje z mocznikiem w stałej równowadze. Jednak okazało się, że stężenie izocyjanianu w osoczu jest mniejsze, aniżeli wynikałoby to z kinetycznych parametrów rozkładu mocznika, co wiąże się z jego dużą reaktywnością z grupami funkcyjnymi białek, aminokwasów i krótkim jego okresem półtrwania.

W pracy omówiono mechanizm powstawania izocyjanianu oraz jego reakcje z grupami funkcyjnymi białek i wolnych aminokwasów. Przedstawiono również informacje na temat karbamyłacji hemoglobiny, lipoprotein osocza, albuminy, białek błonowych i erytropoetyny u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek.

Karbamyłacja białek wpływa negatywnie na ich aktywność biologiczną, a tym samym może się przyczyniać do pogorszenia stanu pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek.

Słowa kluczowe:

karbamyłacja białek • przewlekła niewydolność nerek • kwas izocyjanowy

Summary

Carbamylation (carbamylation) is a post-translational modification resulting from the non-enzymatic reaction between isocyanic acid and free functional groups of proteins, in particular with the free amino groups. This reaction alters structural and functional properties of proteins and results in faster aging of proteins.

Urea present in the body can be transformed into cyanate and its more reactive form, isocyanic acid. High concentration of urea is associated with some diseases, especially with chronic renal failure and atherosclerosis. In human tissues, urea and cyanate are in equilibrium in aqueous solutions. Surprisingly, concentration of isocyanate in the body is much lower than it would appear from the kinetic parameters of urea decomposition. The low concentration of isocyanic acid results from its high reactivity and short half-life.

Keywords:	In this review we describe the biochemical mechanism of carbamylation of proteins and free amino acids. We summarize the literature data for carbamylation of hemoglobin, lipoproteins, albumin, membrane proteins and erythropoietin in chronic renal failure. In summary, the carbamylation of proteins may have a negative impact on their biological activity and may contribute to the deterioration of patients with chronic renal failure. protein carbamylation • chronic renal failure • isocyanic acid
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1202189
Word count:	2877
Tables:	–
Figures:	5
References:	50

Adres autorki: dr Anna Pieniążek, Katedra Biofizyki Medycznej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź; e-mail: annap@biol.uni.lodz.pl

WSTĘP

W warunkach fizjologicznych, białka organizmów żywych są poddane wielu modyfikacjom potranslacyjnym. Dochodzi do nich przez enzymatyczne i w mniejszym stopniu nieenzymatyczne wiązanie różnych cząsteczek o małej masie cząsteczkowej do ich wolnych grup funkcyjnych (aminowych, karboksylowych, tiolowych, hydroksylowych). Reakcje te przede wszystkim są niezbędne do syntezy fizjologicznie aktywnych białek. Bardzo dobrze poznanym procesem potranslacyjnej modyfikacji białek jest ich nieenzymatyczna glikacja. Reakcje glikacji dotyczą wielu prawidłowo funkcjonujących białek. Jednak w różnych stanach patologicznych może dochodzić do zaburzenia tego procesu, doprowadzając do nadmiernego wiązania się cukrów do białek. Wzrost stężenia glikowanych białek obserwuje się m.in. w cukrzycy oraz przy występowaniu późnych powikłań związanych z tą chorobą [28,43]. Glikowane białka mogą ulegać dalszym modyfikacjom i spowodować powstawanie zaawansowanych końcowych produktów glikacji białek (advance glycation end products; AGEs). Wzrost stężenia AGEs obserwuje się również u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek poddawanych regularnym hemodializom [42].

Inną potranslacyjną modyfikacją białek jest ich karbamyłacja powstająca w wyniku nieenzymatycznego, kowalencyjnego wiązania kwasu izocyjanowego przede wszystkim do wolnych grup aminowych białek. Modyfikacja ta, podobnie jak glikacja, utlenianie, czy karbonylacja, może zmieniać strukturę i funkcję białka. Wszystkie wymienione potranslacyjne modyfikacje białek przebiegają bez udziału enzymów i polegają na kowalencyjnym wiązaniu różnych adduktów do struktur białkowych.

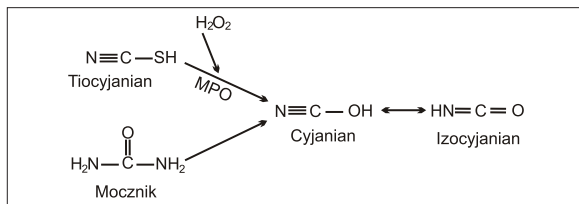
Większość produktów nieenzymatycznych, potranslacyjnych modyfikacji białek jest gromadzonych w organizmie w procesie starzenia oraz w wyniku zmian metabolicznych wywołanych różnymi chorobami, takimi jak cukrzyca, miażdżyca, przewlekła niewydolność nerek oraz choroby neurodegeneracyjne [17,19]. Uważa się, że tak modyfikowane białka mogą być dobrymi markerami w rozpoznawaniu wielu chorób [10,17,28,49]. Jednak w praktyce medycznej, jako standardowy marker oceny stężenia cukru w organizmie w przypadku cukrzycy jest wykorzystywany jedynie poziom glikowanej hemoglobiny (HbA1c).

Celem pracy jest przedstawienie stanu wiedzy na temat karbamyłacji białek u osób z przewlekłą niewydolnością nerek.

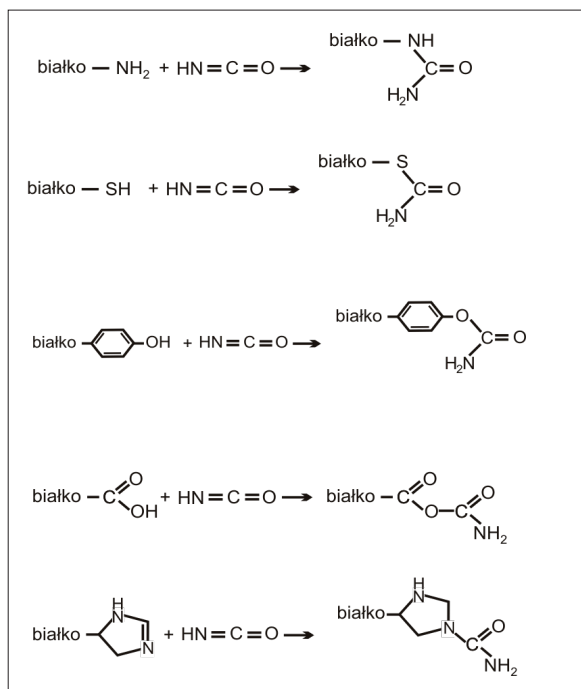
MECHANIZM KARBAMYŁACJI BIAŁEK

Karbamyłacja jest terminem odnoszącym się do przyłączonych grup „karbamoilowych” ($-CONH_2$) do wolnych grup funkcyjnych białek lub aminokwasów.

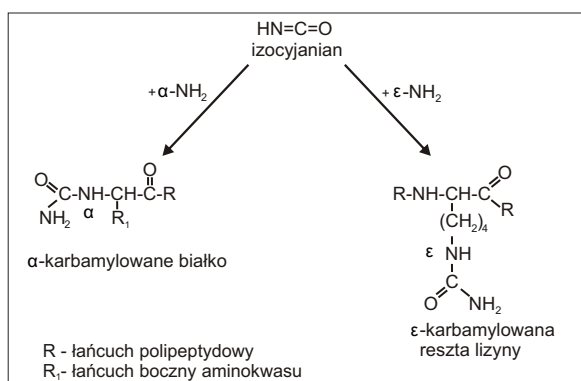
Kwas izocyjanowy, który jest głównym czynnikiem wywołującym karbamyłację cząsteczek i makrocząsteczek, powstaje z cyjanianu. Cyjanian natomiast powstaje z mocznika, a stosunek obu tych substancji w stanie równowagi chemicznej wynosi 99:1 [19,50]. Innym sposobem powstawania kwasu izocyjanowego w organizmie jest metabolizm tiocjanianu [8]. Proces zachodzi z udziałem mieloperoksydazy (EC 1.11.1.7) (MPO), która w obecności nadtlenu wodoru może katalizować reakcje utleniania tiocjanianu do kwasu podchlorowego (HClO). Następne przemiany kwasu podchlorowego tworzą cyjanian, a dalej kwas izocyjanowy (ryc. 1) [4,8,44,49].



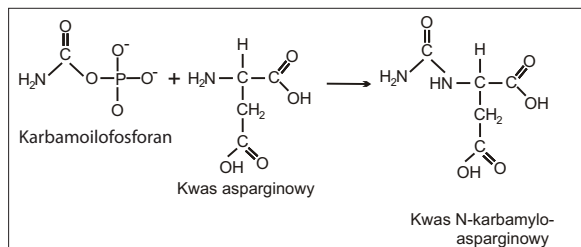
Ryc. 1. Drogi powstawania kwasu izocyjanowego w warunkach fizjologicznych



Ryc. 2. Schemat karbamylicacji grup aminowych, tiolowych, hydroksylowych, fenolowych, karboksylowych i imidazolowych białek



Ryc. 3. Schemat karbamylicacji grup α- i ε-aminowych białek



Ryc. 4. Schemat wytworzenia grupy karbamoilowej w cząsteczce kwasu asparaginowego z udziałem karbamoilofosforanu

Powstający z mocznika kwas izocyjanowy *in vitro*, może reagować z grupami aminowymi, tiolowymi, karboksylowymi, hydroksylowymi lub fenolami doprowadzając do przyłączenia grup karbamoilowych (ryc. 2) [19,25,37].

Największą reaktywność kwas izocyjanowy wykazuje w stosunku do grup tiolowych i fenolowych, jednak są to reakcje odwracalne. Trwałe produkty reakcji powstają w wyniku oddziaływania kwasu izocyjanowego z grupami aminowymi. Grupy α-aminowe aminokwasów reagują z kwasem izocyjanowym 100 razy szybciej aniżeli grupy ε-aminowe lizyny (ryc. 3) [19,39].

Karbamylowana lizyna (homocytrulina) występuje w osoczu krwi w postaci wolnej lub związanej z białkami. Lizyna jest aminokwasem, który bardzo często występuje na powierzchni białka. Obecność grupy ε-aminowej w łańcuchu bocznym lizyny sprzyja jej karbamylicacji, co może spowodować zmiany właściwości fizykochemicznych białka. Stężenie homocytruliny w osoczu zmienia się w zależności od kondycji organizmu. Wykazano, że stężenie tego aminokwasu może być dobrym biomarkrem w różnych chorobach związanych z zaburzeniami cyklu mocznikowego [1].

Kwas izocyjanowy nie jest jedynym związkiem zdolnym do tworzenia grup karbamoilowych w białkach. Wykazano również, że w reakcji karbamylicacji może mieć udział karbamoilofosforan (ryc. 4) [12,38].

Stanem patologicznym sprzyjającym powstawaniu dużej ilości kwasu izocyjanowego, a w konsekwencji karbamylicacji białek jest m.in. przewlekła niewydolność nerek (chronic renal failure; CRF). Upośledzenie funkcji nerek powoduje zatrzymanie w organizmie zbędnych produktów przemiany materii, w tym mocznika. Jego stężenie u osób z CRF może być 6-7-krotnie wyższe w porównaniu do osób zdrowych. U osób zdrowych w krwiobiegu prawidłowe stężenie mocznika waha się w granicach 2,5-7,0 mmol/L krwi, natomiast u osób z przewlekłą niewydolnością nerek to stężenie może osiągać wartość 35 mmol/L i więcej [28,42,46,50]. Duże stężenie mocznika we krwi pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek wskazywałoby, że stężenie kwasu izocyjanowego będzie rzędu od kilkudziesięciu do kilkuset mmol/L. Przeprowadzone badania wykazały jednak, że stężenie kwasu izocyjanowego u osób zdrowych wynosi około 50 nmol/L, natomiast u pacjentów z CRF przed hemodializą około 150 nmol/L, a po hemodializie około 80 nmol/L [32]. Z kinetycznych parametrów rozkładu mocznika wynika, że niewielkie stężenia kwasu izocyjanowego są około 1000 razy mniejsze niż oczekiwano. Najprawdopodobniej wynika to z jego krótkiego okresu półtrwania (3-4 min) i dużej reaktywności z białkami [19,32].

Reakcja kwasu izocyjanowego z białkami powoduje blokowanie N-końcowych grup aminowych białek oraz grup aminowych w łańcuchach bocznych lizyny, co może spowodować zaburzenia w sprzęganiu z innymi cząsteczkami. Tego typu modyfikacje białek mogą negatywnie

wpływać przy wykorzystaniu ich jako nośników różnych substancji. Ponadto karbamyłacja białek może spowodować niecałkowite trawienie białek przez enzymy proteolityczne [45].

Teoretycznie wszystkie białka mogą ulegać karbamyłacji jednak stopień ich modyfikacji *in vivo* zależy m.in. od dostępności i nukleofilowości wolnych grup aminowych, od polarności rozpuszczalnika oraz od długości życia danego białka [22].

Jak wynika z dostępnej literatury, karbamyłacja zmienia właściwości strukturalnych i funkcjonalnych białek [31]. Widocznym skutkiem reakcji izocyjanianu z białkami jest eliminacja dodatniego ładunku, co wpływa na oddziaływania jonowe białko-woda, a tym samym zaburza oddziaływania na powierzchni białka w stosunku do innych cząsteczek [22]. Karbamyłacja powoduje zmiany w strukturze drugo- i trzeciorzędowej białek, co wpływa na rozkład wszystkich atomów w cząsteczce, a tym samym na dostępność centrum aktywnego białka. Proces powoduje również zaburzenia w oddziaływaniach typu białko-białko. Na przykład karbamyłacja kolagenu typu I wywołuje zaburzenia w strukturze potrójnej helisy, a to zmniejsza zdolność polimeryzacji prawidłowych włókien [18]. Wykazano również, że zmiany te mogą być związane z niezdolnością karbamyłowanego kolagenu do stymulowania utleniającej funkcji neutrofilii. Inne badania wykazały, że karbamyłacja kolagenu znacząco wpływa na zdolność migracyjną komórek włókniaka (linia HT1080) oraz dezorganizację cytoszkieletu aktynowego w tych komórkach [40].

KARBAMYŁACJA HEMOGLOBINY

Prawdopodobnie to, iż hemoglobina jest łatwo dostępnym białkiem do badań spowodował, że jej karbamyłacja jest bardzo dobrze poznana. Duże stężenie mocznika we krwi osób z przewlekłą chorobą nerek sprzyja powstawaniu dużej ilości izocyjanianu, a tym samym karbamyłacji hemoglobiny. Kwas izocyjanowy reaguje z terminalnymi grupami α -aminowymi waliny zarówno łańcucha α - jak i β -globiny [50]. Białka te mimo odmiennej struktury pierwszorzędowej oraz różnej ilości aminokwasów w łańcuchach (łańcuch α 141 aminokwasów, łańcuch β 146 aminokwasów) mają na N-końcu walinę. To właśnie ten aminokwas w łańcuchach globiny najszybciej ulega karbamyłacji. Najlepszą metodą detekcji karbamyłacji hemoglobiny jest oznaczenie stężenia walino-hydantoiny.

Badania Hamouda i wsp. wskazują, że u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek (niecukrzycowych) stężenie walino-hydantoiny w hemoglobinie wzrasta o około 10% w porównaniu do jej stężenia u pacjentów zdrowych [13]. U pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek cierpiących również na cukrzycę stężenie walino-hydantoiny było 1,95 razy wyższe niż w grupie kontrolnej i 1,77 razy wyższe niż w grupie pacjentów z mocznicą (niecukrzycowych). Autorzy sugerują, że jest to dowodem na wzajemną interferencję glikacji

i karbamyłacji hemoglobiny [13]. Badania przeprowadzone przez Hamouda i wsp. wykazały wzrastające stężenie karbamyłowanej waliny w łańcuchach globiny po inkubacji hemoglobiny z mocznikiem [13]. Wzrost stężenia karbamyłowanej waliny (walino-hydantoiny) był proporcjonalny do zastosowanego stężenia mocznika. Ponadto, autorzy ci wykazali dominującą rolę nieenzymatycznej glikacji waliny w stosunku do jej karbamyłacji. W hemoglobinie walina nie jest jedynym aminokwasem ulegającym karbamyłacji. Mogą jej również ulegać grupy ϵ -aminowe w łańcuchu bocznym lizyny [9].

U chorych z przewlekłą niewydolnością nerek wykazano wprost proporcjonalną zależność stopnia karbamyłacji hemoglobiny i stężenia mocznika we krwi osób zdrowych jak i chorych z przewlekłą niewydolnością nerek (przed i po dializie) [21]. Stężenie karbamyłowanej hemoglobiny był około 3-krotnie wyższy u osób z przewlekłą niewydolnością nerek poddawanych zarówno hemodializom jak i dializowanym otrzewnowo [21]. Określenie stężenia karbamyłacji hemoglobiny jest dość trudne ze względu na podobieństwo reakcji nieenzymatycznej glikacji oraz reakcji karbamyłacji grup aminowych białek [27].

KARBAMYŁACJA LIPOPROTEIN

Proces karbamyłacji białek dotyczy również obecnych w organizmie lipoprotein i może mieć znaczący wpływ na ich strukturę i funkcję. Białkowym komponentem lipoprotein niskiej gęstości (LDL) jest apoB-100. Białko to zawiera w swojej budowie 4563 aminokwasów, a wśród nich znajduje się 356 reszt lizyny [41]. Ze względu na to, że łańcuchy boczne lizyny z dużą łatwością reagują z kwasem izocyjanowym, karbamyłacja tego białka prowadzi do jego zmian strukturalnych i funkcjonalnych [1,2,44]. Podobnie jak w innych białkach, do karbamyłacji apoB-100 dochodzi jednak najszybciej na N-końcowym aminokwasie tego białka. Wykazano, że karbamyłowane lipoproteiny LDL mają mniejsze powinowactwo do receptorów znajdujących się na powierzchni fibroblastów niż niemodyfikowane LDL [9]. Karbamyłowane lipoproteiny znacznie dłużej pozostają w krwiobiegu aniżeli niezmienione LDL [15]. Ponadto, dłuższy czas ich pozostawania w krwiobiegu powoduje, że mogą być poddawane dodatkowej modyfikacji przez utlenianie.

Karbamyłacja lipoprotein może się odbywać w różnym stopniu. Przeprowadzone badania *in vitro* wykazały, że maksymalna karbamyłacja LDL występuje po ich inkubacji w stężeniu 0,6 mg/ml z cyjanianem w stężeniu 20 mmol/l [9]. Karbamyłowane lipoproteiny LDL są rozpoznawane przez receptory zmiataaczy makrofagów, przypuszczalnie SR-A1, a to powoduje ich wychwyt i indukcję nieswoistych szlaków sygnalizacyjnych [19,51]. Karbamyłowane LDL mogą wykazywać działanie promiażdżycowe przez udział w tworzeniu komórek piankowatych, indukcję apoptozy komórek śródbłonna oraz proliferację komórek mięśni gładkich [19,44,49]. U pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek wystę-

puje zwiększone ryzyko miażdżycy, które oprócz innych czynników, aniżeli podwyższone stężenia mocznika w osoczu, przyczynia się do zintensyfikowania procesu karbamyłacji białek lipoprotein [3].

Dużo słabiej poznanym procesem jest karbamyłacja lipoprotein wysokiej gęstości (HDL) [44]. Głównym białkiem HDL jest apoA-I zawierająca 243 aminokwasów w tym 21 reszt lizynowych [6]. Karbamyłacja białek, w tym lizyny apoA-I, skutkuje wzrostem elektrojemności tego białka. Wykazano, że receptor SR-BI jest bardziej wrażliwy na wiązanie białek ujemnie naładowanych, a przez to ma większe powinowactwo do karbamyłowanych cząsteczek HDL [14]. Ponadto stwierdzono, że reakcja kwasu izocjanowego z jedną tylko grupą aminową w łańcuchu bocznym lizyny w apoA-I może modulować interakcję HDL z SR-BI makrofagów przyczyniając się do tworzenia kropli lipidowych w tych ostatnich [14]. Ci sami autorzy sugerują ponadto, że karbamyłacja HDL może destabilizować równowagę wychwytu cholesterolu i przyczyniać się do rozwoju miażdżycy tętnic [44].

KARBAMYŁACJA BIAŁEK OSOCZA (ALBUMINA)

Albumina jest białkiem, którego stężenie w osoczu wynosi 35-42 g/l, co stanowi około 50% wszystkich białek [23,26]. Z tego powodu białko to szczególnie jest narażone na karbamyłację. Albumina zawiera 585 reszt aminokwasowych, w tym 58 reszt lizyny i 24 argininy. Karbamyłacji mogą ulegać zarówno łańcuchy boczne tych dwóch aminokwasów, jak i aminokwas N-końcowy. W badaniach wykazano, że u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek stężenie karbamyłowanej albuminy jest dwukrotnie wyższe aniżeli u osób zdrowych [5]. Badania tych autorów wykazały również, że lizyna w pozycji 549 jest najbardziej podatna na karbamyłację. Aminokwas ten jest również najbardziej podatny na proces glikacji. 6-godzinna inkubacja albuminy *in vitro* z cyjanianem o stężeniu 0,1 M powodowała spadek ilości niezmodyfikowanych reszt lizyny o około 20% w stosunku do próby kontrolnej [16]. Spadek reszt lizyny powoduje wzrost stężenia homocytruliny w osoczu. Wykazano także, że karbamyłowana albumina hamuje wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego przez neutrofile [16]. Wyniki te mogłyby częściowo wyjaśniać występowanie powikłań zapalnych i zakaźnych u pacjentów z CRF, odpowiedzialnych za ich wyższą zachorowalność i śmiertelność [16]. Również inne badania stanu konformacyjnego albuminy pochodzącej od osób z przewlekłą niewydolnością nerek wykazały zmiany w porównaniu do osób zdrowych [35].

Przeprowadzona karbamyłacja albuminy, *in vitro*, przez Koka i wsp. wykazała spadek jej stężenia w próbach [23]. Badania wykonano trzema metodami: z fioletem bromkrezolowym (BCP), zielenią bromkrezolową (BCG) oraz techniką immunonefelometryczną. Mimo zastosowania różnych metod, wszystkie wykazały spadek stężenia albuminy w próbach. Autorzy sugerują, że spadek może wynikać z karbamyłacji lizyny w łańcuchu biał-

kowym, a tym samym ze zmienionej specyfiki wiązania znaczników. Autorzy przeprowadzili również badanie stężenia homocytruliny w osoczu pacjentów poddawanych hemodializom i wykazali jej czterokrotny wzrost w porównaniu do grupy kontrolnej. Określili także liczbę reszt lizynowych, które są modyfikowane w każdej cząsteczce albuminy. Obliczenia wykazały, że jedna na 14 cząsteczek albuminy zawiera homocytrulinę [23].

Na poziom karbamyłacji albuminy bardzo duży wpływ ma stężenie wolnych aminokwasów w osoczu. Wykazano, że spadek stężenia aminokwasów w osoczu chorych z przewlekłą niewydolnością nerek powodował wzrost stężenia karbamyłowanej albuminy [5]. Ci sami autorzy wykazali *in vitro*, że wolne aminokwasy, takie jak cysteina, histydyna, arginina i lizyna, a także inne związki nukleofilowe, np. tauryna, hamują indukowaną cyjanianem karbamyłację albuminy pełniąc tym samym rolę protekcyjną w stosunku do tego białka.

Ochronną rolę wolnych aminokwasów przed karbamyłacją białek zasugerował również Jin [20]. W badaniach wykazał, że proces karbamyłacji erytropoetyny zostaje ograniczony lub nawet zahamowany, jeżeli w środowisku są obecne aminokwasy (fenyloalanina, walina, tryptofan, treonina lub lizyna) [20]. Ważne może być również to, że obecność jednego białka działa protekcyjnie w stosunku do innego. I tak, wykazano, że obecność albuminy w układzie działała ochronnie w stosunku do ilości powstającej karbamyłowanej erytropoetyny [20].

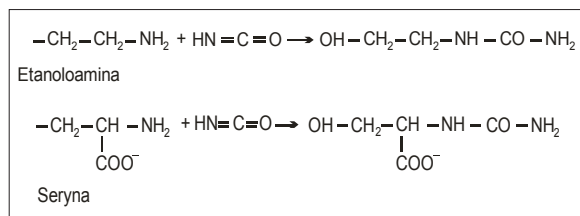
Przeprowadzone badania wolnych aminokwasów występujących w osoczu osób ze schyłkową niewydolnością nerek wykazały, że stężenie tyrozyny, histydyny, metioniny, lizyny, waliny, leucyny oraz izoleucyny były znacząco niższe aniżeli u osób zdrowych [24]. Analiza karbamyłacji wolnych aminokwasów w osoczu u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek udowodniła, że ich stężenie było 0,5-11,4 razy większe aniżeli postaci niekarbamyłowanych. W największym stopniu karbamyłacji ulegały izoleucyna i treonina (11,4 i 9 razy więcej niż niekarbamyłowanej), a najmniej procesowi karbamyłacji poddawały się: fenyloalanina i tyrozyna (0,5 i 1,3 razy więcej, niż niekarbamyłowanej) [24].

KARBAMYŁACJA BIAŁEK BŁONOWYCH

Niewiele jest informacji dotyczących skutków karbamyłacji białek błonowych komórek oraz wpływu tego procesu na funkcjonowanie komórek. W błonach erytrocytów głównymi białkami integralnymi są białko pasma trzeciego oraz glikoforyna. Do wewnętrznej błony komórkowej zasocjowanych jest wiele białek powierzchniowych tworzących cytoszkielet. Przeprowadzone badania Trepaniera i wsp. na wyizolowanych błonach erytrocytów wykazały, że cyjanian bardzo szybko wiąże się z białkami obecnymi w błonach [46]. Autorzy ci wykazali również, że proces karbamyłacji białek jest proporcjonalny do czasu ich ekspozycji na cyjanian [46]. Ponadto udowodnili, że karbamyłacji ulegały w największym stopniu spektryna α i β oraz

ankiryna. Badania Trepaniera i wsp. wykazały również, że niewiele cyjanianu wiązało się z białkiem pasma trzeciego aniżeli wynikałoby to z jego masy molowej. Autorzy badań tłumaczą to tym, że spektryna i ankiryna są białkami peryferyjnymi umiejscowionymi na powierzchni błony, przez co ich grupy aminowe są łatwo dostępne dla cyjanianu. Białko pasma trzeciego należy do białek integralnych, co powoduje, że jego aminokwasy domen transbłonowych są mniej narażone na działanie cyjanianu [46]. Również inne badania dowiodły istnienia zmian w białkach błonowych erytrocytów poddanych karbamyłacji *in vitro*. Wykazano znaczące statystycznie zmiany konformacyjne białek błonowych erytrocytów poddanych działaniu cyjanianu przez 24 godziny, a następnie mierzonych za pomocą znaczników spinowych w technice elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) [34]. Ponadto dowiedziono, że karbamyłacja białek błonowych może się przyczyniać do zmian w mikrolepkości błony [36]. Prowadzone badania *in vitro*, wykazały również, że erytrocyty poddane działaniu cyjanianu są bardziej podatne na hemolizę, co może w znaczący sposób wpływać na niedokrwistość pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek [30,36]. Również erytrocyty pacjentów z CRF poddawanych hemodializom wykazywały większą wrażliwość osmotyczną w porównaniu do osób zdrowych oraz większą czułość na stres oksydacyjny [7]. W przypadku osób poddawanych hemodializom na zwiększoną hemolizę erytrocytów oprócz karbamyłacji białek mogą wpływać również inne czynniki, takie jak mechaniczne uszkodzenia komórek przez pompy podczas hemodializy oraz stan stresu oksydacyjnego. Następstwem karbamyłacji białek błonowych erytrocytów może być ich szybsze trawienie, co może doprowadzić do skrócenia czasu życia erytrocytów w krwiobieg [46]. U chorych z przewlekłą niewydolnością nerek poddawanych hemodializom obserwowano również znaczne skrócenie czasu życia erytrocytów oraz obecność w krwiobieg dużej liczby erytrocytów młodych [7,48]. Skrócenie czasu przeżycia erytrocytów może również wynikać z ich deformacji spowodowanej m.in. modyfikacjami białek i lipidów błonowych oraz ich wzajemnych oddziaływań.

Trepanier i Thibert wykazali *in vitro*, że może również dochodzić do karbamyłacji grup aminowych fosfolipidów błonowych [47]. Ze względu na asymetrię błony komórkowej fosfatydyloseryna i fosfatydyloetanolamina są umiejscowione w cytoplazmatycznej monowarstwie lipidowej błony komórkowej. Oba fosfolipidy



Ryc. 5. Schemat karbamyłacji etanolaminy i seryny wchodzących w skład fosfolipidów błonowych

zawierają w polarnej części wolną grupę aminową, która może się wiązać z kwasem izocyjanowym (ryc. 5).

Jak wynika z przeprowadzonych badań, karbamyłacja może się przyczyniać do zmian w oddziaływaniach białkowo-lipidowych w błonach w wyniku modyfikacji białek lub lipidów [47]. Ponadto Trepanier i Thibert sugerują, że karbamyłacja komponentów błony komórkowej erytrocytów może spowodować eksternalizację zarówno fosfatydyloseryny, jak karbamyłowanej fosfatydyloseryny do zewnętrznej monowarstwy dając w ten sposób sygnał komórkom fagocytującym do ich eliminacji w krwiobieg [47]. Może to potwierdzać obecność w krwiobieg osób z przewlekłą niewydolnością nerek przeważającej liczby erytrocytów młodych.

KARBAMYŁACJA ERYTROPOETYNY

Proces karbamyłacji dotyczy również enzymów; modyfikacje potranslacyjne enzymów mogą mieć duży wpływ na ich aktywność biologiczną, a tym samym na kondycję całego organizmu. U chorych z przewlekłą niewydolnością nerek obserwuje się bardzo często niedokrwistość. Jej przyczyny są bardzo złożone: utrata krwi podczas hemodializ, przyspieszone procesy starzenia erytrocytów, czy opóźdzona erythropoeza. Za proces tworzenia erytrocytów jest odpowiedzialna m.in. erytropoetyna (EPO). Enzym ten w 80% jest syntetyzowany w nerkach, a w 20% w wątrobie [11]. Przeprowadzone badania *in vitro* wykazały spadek wolnych grup aminowych w erytropoetynie po jej inkubacji z cyjanianem w zależności od czasu inkubacji, jak i jego stężenia [20,31,33]. Mimo że mocznik i kwas izocyjanowy mogą hamować działanie erytropoetyny, a tym samym proces erythropoezy, to nadal jeszcze mechanizm ten nie jest w pełni wyjaśniony [20].

PODSUMOWANIE

Omówiona karbamyłacja białek jest procesem fizjologicznym, jednak w pewnych stanach patologicznych dochodzi do jego nasilenia. W przewlekłej niewydolności nerek nagromadzenie w organizmie różnych toksyn mocznicowych, w tym mocznika, sprzyja wzmożonej karbamyłacji białek. Nieenzymatyczne wiązanie się cyjanianu do białek zmienia ich strukturę i funkcję, przez co negatywnie wpływa na kondycję osób z przewlekłą niewydolnością nerek. Przy omawianiu patofizjologii przewlekłej niewydolności nerek szczególną uwagę zwraca się na zatrucia organizmu toksynami mocznicowymi oraz towarzyszącemu hemodializom stresowi oksydacyjnemu, natomiast niewiele uwagi poświęca się skutkom karbamyłacji białek.

Mimo wielu doniesień dotyczących karbamyłacji białek temat jest jednak bardzo często pomijany przy omawianiu skutków niewydolności nerek oraz w diagnostyce i terapii osób chorych. Biorąc pod uwagę specyfikę tego procesu konieczne są dalsze badania, które w pełni wyjaśniłyby następstwa wynikające z modyfikacji ważnych życiowo cząsteczek i makrocząsteczek.

PISMIENICTWO

- [1] Albert C., Mertens P.R., Bartsch P.: Urea and atherosclerosis - evidence for a direct link involving apolipoprotein B protein modifications. *Int. Urol. Nephrol.*, 2011; 43: 933-936
- [2] Apostolov E.O., Basnakian A.G., Ok E., Shah S.V.: Carbamylated low-density lipoprotein: nontraditional risk factor for cardiovascular events in patients with chronic kidney disease. *J. Ren. Nutr.*, 2012; 22: 134-138
- [3] Apostolov E.O., Ray D., Savenka A.V., Shah S.V., Basnakian A.G.: Chronic uremia stimulates LDL carbamylation and atherosclerosis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2010; 21: 1852-1857
- [4] Arlandson M., Decker T., Roongta V.A., Bonilla L., Mayo K.H., MacPherson J.C., Hazen S.L., Slungaard A.: Eosinophil peroxidase oxidation of thiocyanate. Characterization of major reaction products and a potential sulfhydryl-targeted cytotoxicity system. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 215-224
- [5] Berg A.H., Drechsler C., Wenger J., Buccafusca R., Hod T., Kalim S., Ramma W., Parikh S.M., Steen H., Friedman D.J., Danziger J., Wanner C., Thadhani R., Karumanchi S.A.: Carbamylation of serum albumin as a risk factor for mortality in patients with kidney failure. *Sci. Transl. Med.*, 2013; 5: 175ra29
- [6] Brouillette C.G., Anantharamaiah G.M., Engler J.A., Borhani D.W.: Structural models of human apolipoprotein A-I: a critical analysis and review. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001; 1531: 4-46
- [7] Brzeszczyńska J., Luciak M., Gwozdziński K.: Alterations of erythrocyte structure and cellular susceptibility in patients with chronic renal failure: effect of haemodialysis and oxidative stress. *Free Radic. Res.*, 2008; 42: 40-48
- [8] Davies M.J.: Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 2011; 48: 8-19
- [9] Ghaffari M.A., Shanaki M.: Evaluation of *in vitro* effect of flavonoids on human low-density lipoprotein carbamylation. *Iran. J. Pharm. Res.*, 2010; 9: 67-74
- [10] Gillery P.: Nonenzymatic post-translational modification derived products: new biomarkers of protein aging. *J. Med. Biochem.*, 2011; 30: 201-206
- [11] Gołbiewska-Staroszczyk S., Matysiak M., Adamowicz-Salach A., Albrecht-Stanisławska K., Sobocińska-Mirska A.: Erythropoetyna - alternatywne leczenie niedokrwistości u niemowląt. *Hematologia*, 2011; 2: 71-82
- [12] Gonzalez P., Grisolia S.: Carbamylation of glutamate dehydrogenase and other mitochondrial proteins by biosynthetic carbamyl phosphate. *Physiol. Chem. Phys.*, 1975; 7: 271-275
- [13] Hamouda A.R., Nabih E.S., Khalek S.A.: Novel equation for correction of glycated hemoglobin and calculation of carbamylated hemoglobin in diabetic uremic patients. *Res. J. Chem. Sci.*, 2013; 3: 6-11
- [14] Holzer M., Gauster M., Pfeifer T., Wadsack C., Fauler G., Stiegler P., Koefeler H., Beubler E., Schuligoi R., Heinemann A., Marsche G.: Protein carbamylation renders high-density lipoprotein dysfunctional. *Antioxid. Redox Signal.*, 2011; 14: 2337-2346
- [15] Hökkö S., Huttunen K., Kervinen K., Kesäniemi Y.A.: Decreased clearance of uraemic and mildly carbamylated low-density lipoprotein. *Eur. J. Clin. Invest.*, 1994; 24: 105-113
- [16] Jaisson S., Delevallée-Forte C., Touré F., Rieu P., Garnotel R., Gillery P.: Carbamylated albumin is a potent inhibitor of polymorphonuclear neutrophil respiratory burst. *FEBS Lett.*, 2007; 581: 1509-1513
- [17] Jaisson S., Gillery P.: Evaluation of nonenzymatic posttranslational modification-derived products as biomarkers of molecular aging of proteins. *Clin. Chem.*, 2010; 56: 1401-1412
- [18] Jaisson S., Lorimier S., Ricard-Blum S., Sockalingum G.D., Delevallée-Forte C., Kegelaer G., Manfait M., Garnotel R., Gillery P.: Impact of carbamylation on type I collagen conformational structure and its ability to activate human polymorphonuclear neutrophils. *Chem. Biol.*, 2006; 13: 149-159
- [19] Jaisson S., Pietremont C., Gillery P.: Carbamylation-derived products: bioactive compounds and potential biomarkers in chronic renal failure and atherosclerosis. *Clin. Chem.*, 2011; 57: 1499-1505
- [20] Jin K.: Effects of amino acids and albumin on erythropoietin carbamylation. *Clin. Exp. Nephrol.*, 2013; 17: 575-581
- [21] Kairaitis L.K., Yuill E., Harris D.C.: Determinants of haemoglobin carbamylation in haemodialysis and peritoneal dialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2000; 15: 1431-1437
- [22] Kalim S., Karumanchi S.A., Thadhani R.I., Berg A.H.: Protein carbamylation in kidney disease: pathogenesis and clinical implications. *Am. J. Kidney Dis.*, 2014; 64: 793-803
- [23] Kok M.B., Tegelaers F.P., van Dam B., van Rijn J.L., van Pelt J.: Carbamylation of albumin is a cause for discrepancies between albumin assays. *Clin. Chim. Acta*, 2014; 434: 6-10
- [24] Kraus L.M., Jones M.R., Kraus A.P. Jr.: Essential carbamoyl-amino acids formed *in vivo* in patients with end-stage renal disease managed by continuous ambulatory peritoneal dialysis: isolation, identification, and quantitation. *J. Lab. Clin. Med.*, 1998; 131: 425-431
- [25] Kraus L.M., Kraus A.P. Jr.: Carbamylation of amino acids and proteins in uremia. *Kidney Int. Suppl.*, 2001; 78: S102-S107
- [26] Leggio C., Galantini L., Pavel N.V.: About the albumin structure in solution: cigar Expanded form versus heart Normal shape. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2008; 10: 6741-6750
- [27] Li Q., Ju Y., Jin T., Pang B., Deng J., Du T., Wang H.: Haemoglobin A_{1c} measurement in patients with chronic kidney disease. *Clin. Biochem.*, 2014; 47: 481-484
- [28] Malyszko J., Malyszko J.S., Pawlak K., Mysliwiec M.: Hepcidin, iron status, and renal function in chronic renal failure, kidney transplantation, and hemodialysis. *Am. J. Hematol.*, 2006; 81: 832-837
- [29] Meerwaldt R., Links T., Zeebregts C., Tio R., Hillebrands J.L., Smit A.: The clinical relevance of assessing advanced glycation endproducts accumulation in diabetes. *Cardiovasc. Diabetol.*, 2008; 7: 29
- [30] Mun K.C., Golper T.A.: Impaired biological activity of erythropoietin by cyanate carbamylation. *Blood Purif.*, 2000; 18: 13-17
- [31] Mun K.C., Kim H.C., Kwak C.S.: Cyanate as a hemolytic factor. *Ren. Fail.*, 2000; 22: 809-814
- [32] Nilsson L., Lundquist P., Kagedal B., Larsson R.: Plasma cyanate concentrations in chronic renal failure. *Clin. Chem.*, 1996; 42: 482-483
- [33] Park K.D., Mun K.C., Chang E.J., Park S.B., Kim H.C.: Inhibition of erythropoietin activity by cyanate. *Scand. J. Urol. Nephrol.*, 2004; 38: 69-72
- [34] Pieniżek A., Brzeszczyńska J., Gwoździński K.: Comparison carbamylation and oxidative damage in membrane proteins in human red blood cells. *Proceedings of XI Meeting of the Society for Free Radical Research International*. Manduzzi Editore -MEDIMOND, 2002; 685-688
- [35] Pieniżek A., Brzeszczyńska J., Kruszyńska I., Gwoździński K.: Investigation of albumin properties in patients with chronic renal failure. *Free Radic. Res.*, 2009; 43: 1008-1018
- [36] Pieniżek A., Gwoździński K.: Carbamylation of proteins leads to alterations in the membrane structure of erythrocytes. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2003; 8: 127-131
- [37] Praschberger M., Hermann M., Laggner C., Jirovetz L., Exner M., Kapiotis S., Gmeiner B.M., Laggner H.: Carbamylation abrogates the antioxidant potential of hydrogen sulfide. *Biochimie.*, 2013; 95: 2069-2075

- [38] Ramponi G., Leaver J.L., Grisolia S.: Homocitrulline formation following carbamylation of histones with carbamyl phosphate. *FEBS Lett.*, 1971; 16: 311-314
- [39] Roxborough H.E., Young I.S.: Carbamylation of proteins and atherogenesis in renal failure. *Med. Hypotheses*, 1995; 45: 125-128
- [40] Said G., Guilbert M., Millerot-Serruot E., Van Gulick L., Terryn C., Garnotel R., Jeannesson P.: Impact of carbamylation and glycation of collagen type I on migration of HT1080 human fibrosarcoma cells. *Int. J. Oncol.*, 2012; 40: 1797-1804
- [41] Segrest J.P., Jones M.K., De Loof H., Dashti N.: Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J. Lipid Res.*, 2001; 42: 1346-1367
- [42] Selvaraj N., Bobby Z., Das A.K., Ramesh R., Koner B.C.: An evaluation of level of oxidative stress and protein glycation in nondiabetic undialyzed chronic renal failure patients. *Clin. Chim. Acta*, 2002; 324: 45-50
- [43] Siewiera K., Labieniec-Watala M.: Ambiguous effect of dendrimer PAMAM G3 on rat heart respiration in a model of an experimental diabetes - Objective causes of laboratory misfortune or unpredictable G3 activity? *Int. J. Pharm.*, 2012; 430: 258-265
- [44] Sirpal S.: Myeloperoxidase-mediated lipoprotein carbamylation as a mechanistic pathway for atherosclerotic vascular disease. *Clin. Sci.*, 2009; 116: 681-695
- [45] Sun S., Zhou J.Y., Yang W., Zhang H.: Inhibition of protein carbamylation in urea solution using ammonium-containing buffers. *Anal. Biochem.*, 2014; 446: 76-81
- [46] Trepanier D.J., Thibert R.J.: Carbamylation of erythrocyte membrane aminophospholipids: an *in vitro* and *in vivo* study. *Clin. Biochem.*, 1996; 29: 333-345
- [47] Trepanier D.J., Thibert R.J., Draisey T.F., Caines P.S.: Carbamylation of erythrocyte membrane proteins: an *in vitro* and *in vivo* study. *Clin. Biochem.*, 1996; 29: 347-355
- [48] Vos F.E., Schollum J.B., Coulter C.V., Doyle T.C., Duffull S.B., Walker R.J.: Red blood cell survival in long-term dialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.*, 2011; 58: 591-598
- [49] Wang Z., Nicholls S.J., Rodriguez E.R., Kummu O., Hörkkö S., Barnard J., Reynolds W.F., Topol E.J., DiDonato J.A., Hazen S.L.: Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherosclerosis. *Nat. Med.*, 2007; 13: 1176-1184
- [50] Wynckel A., Randoux C., Millart H., Desroches C., Gillery P., Canivet E., Chanard J.: Kinetics of carbamylated haemoglobin in acute renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2000; 15: 1183-1188

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.