

**OZNACZANIE AKTYWNOŚCI
PRZECIWUTLENIAJĄCEJ METODAMI *IN – VITRO***

**DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY
WITH *IN - VITRO* METHODS**

**Jacek Malinowski, Joanna Drzeżdżon*,
Lech Chmurzyński, Dagmara Jacewicz**

*Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii,
ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk
e-mail: joanna.drzezdzon@ug.edu.pl

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Metody *in-vitro* oznaczania aktywności przeciwutleniającej związków kompleksowych
 - 1.1. Test DPPH
 - 1.2. Test wychwytu H₂O₂
 - 1.3. Test wychwytu •NO
 - 1.4. Test wychwytu ONOO•
 - 1.5. Test wychwytu •OH
 - 1.6. Metoda ABTS
 - 1.7. Metoda TRAP (oznaczanie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego)
 - 1.8. Metoda FRAP
 - 1.9. Metoda HORAC
 - 1.10. Metoda ORAC (ang. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*)
 - 1.11. Metoda oksydazy ksantynowej


Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane


Mgr Jacek Malinowski rozpoczął stacjonarne studia doktoranckie Chemii i Biochemii na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Ukończył studia I stopnia na kierunku Chemia – Analityka i Diagnostyka w 2012, następnie ukończył studia II stopnia na kierunku Chemia – Analityka i Diagnostyka. Jego zainteresowania naukowe dotyczą: badanie szybkości reakcji związków polikarboksyłanowych cynku(II) metodą zatrzymanego przepływu, synteza nowych związków koordynacyjnych Cr(III) oraz wanadu(IV) oraz charakterystyka ich właściwości fizykochemicznych oraz biologicznych.



 <https://orcid.org/0000-0003-2230-4008>

Dr Joanna Drzeżdżon jest pracownikiem Katedry Chemii Ogólnej i Nieorganicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Ukończyła studia na kierunku Chemia na Wydziale Chemii UG w 2012 roku, tam również otrzymała w 2017 r. stopień doktora. Jej zainteresowania naukowe dotyczą badań fizykochemicznych polikarboksyłanowych związków koordynacyjnych jonów metali przejściowych oraz zastosowania związków kompleksowych chromu(III) oraz wanadu(IV) jako katalizatorów polimeryzacji olefin. Jest współautorką 39 publikacji naukowych w czasopismach z listy filadelfijskiej, 2 zgłoszeń patentowych, 18 rozdziałów w książkach oraz 74 komunikatów naukowych na konferencjach krajowych i międzynarodowych.



 <https://orcid.org/0000-0002-9964-3027>

Dr hab. Dagmara Elżbieta Jacewicz, prof. UG urodziła się 30 września 1976 roku w Bolesławcu. Po ukończeniu szkoły podstawowej kontynuowała tamże edukację w I Liceum Ogólnokształcącym im. Władysława Broniewskiego. Studiowała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, gdzie w 2001 roku obroniła pracę magisterską. W tym samym roku rozpoczęła studia doktoranckie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego (UG). Pracę doktorską obroniła w 2005 roku, za którą otrzymała nagrodę Oddziału Gdańskiego Polskiego Towarzystwa Chemicznego. W lipcu 2015 roku uzyskała stopień naukowy doktora habilitowanego na Wydziale Chemii UG. Od 2004 roku pracuje na Wydziale Chemii jako asystent, adiunkt i profesor nadzwyczajny (od 2016). Jej zainteresowania badawcze koncentrują się na chemii związków kompleksowych, kinetyce reakcji oraz na biosensorach molekularnych, a w szczególności na ich zastosowaniach do oznaczania tlenu azotu(IV) i tlenu węgla(IV) w materiale biologicznym. Jej dorobek naukowy obejmuje 92 prace naukowe, z czego 77 to publikacje wydane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Jest współautorką ponad 100 komunikatów naukowych na konferencjach krajowych i międzynarodowych.



 <https://orcid.org/0000-0002-6266-5193>

Prof. dr hab. inż. Lech Chmurzyński ukończył studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej uzyskując tytuł zawodowy magistra inżyniera chemika (1978). Stopień doktora nauk chemicznych otrzymał na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Gdańskiego (1986), a doktora habilitowanego nauk chemicznych na Wydziale Chemii UG (1994). W roku 2001 uzyskał tytuł profesora nauk chemicznych. Od 1978 roku związany jest z Wydziałem Chemii UG. Od roku 2003 pracuje na stanowisku profesora zwyczajnego, pełniąc funkcję kierownika Katedry Chemii Ogólnej i Nieorganicznej (od 2006). Jego zainteresowania badawcze skupiają się na problematyce chemii środowisk niewodnych, oddziaływań kwasowo-zasadowych, chemii związków kompleksowych oraz chemii bionieorganicznej – w tym biosensorów molekularnych i ich zastosowań do oznaczania reaktywnych form azotu oraz tlenu w materiale biologicznym. Opublikował ponad 300 oryginalnych i przeglądowych prac naukowych. Jest współautorem ponad 300 prezentacji konferencyjnych, w tym wykładów na zaproszenie. Wypromował 13 doktorów, z Jego inspiracji cztery osoby habilitowały się a jedna uzyskała tytuł profesora.



 <https://orcid.org/0000-0003-2707-0255>

ABSTRACT

In - vitro methods of determination of the antioxidant activity of complex compounds are very interesting and not fully investigated areas of knowledge from the borderline of chemistry and biology. Methods used for determination of the activity of antioxidant complex compounds are modified due to the conditions of the experiments in which they should be carried out, *e.g.* reactions at physiological pH.

Civilization diseases, stress related to the fast pace of life and increasing requirements of our lives cause the formation of free radicals in our body, *i.e.* particles characterized by a high reactivity.

The methods of determination of the antioxidant activity of complexes discussed in this work apply tests carried out in laboratory conditions - *in – vitro*.

Keywords: antioxidant activity, *in – vitro* methods

Słowa kluczowe: aktywność przeciwutleniająca, metody *in – vitro*

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ABTS	– kwas - 2,2-azynobis-(3-etylobenzotiazolin-6-sulfonowy)
ABTS ⁺	– kationorodnik kwasu - 2,2-azynobis-(3-etylobenzotiazolin-6-sulfonowego)
AH	– antyutleniacz
APF	– kwas 2 – [6 – (4V – amino) – fenoksy – 3H – ksanten – 3 – on – 9 – yl] benzoesowy
CuFL	– organiczny kompleks miedzi(II) z fluorochromem
DPPH	– 1,1 – difenilo – 2 – pikrylohydrazyl
FRAP	– <i>Ferric ion reducing Antioxidant Parameter</i> – oznaczenie oparte na redukcji kompleksu Fe(III)
H ₂ O ₂	– nadtlenek wodoru
HAT	– przeniesienie atomu wodoru
HPF	– kwas 2 – [6 – (4V – hydroksy)fenoksy – 3H – ksanten – 3 – on – 9 – yl] benzoesowy
K ₂ S ₂ O ₈	– nadsiarczan potasu
Metoda ORAC	– <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> – metoda polegająca na oznaczeniu aktywności przeciwutleniających rodników peroksyłowych
MnO ₂	– tlenek manganu(IV)
·NO	– rodnik tlenu azotu(II)
O ₂ ^{·-}	– anionorodnik ponadtlenkowy
·OH	– rodnik hydroksylowy
ONOO ⁻	– anion nadtlendioazotynowy
ONOOH	– kwas nadtlendioazotawy
R – PE	– R - fikoerytryna
RFT	– reaktywne formy tlenu
RO [·]	– rodnik alkoksyłowy
ROO [·]	– rodnik nadtlenkowy
ROOH	– nadtlenek peroksyłowy
SET	– przeniesienie pojedynczego elektronu
TEAC	– parametr określający zdolności antyutleniające w metodzie ABTS, w jednostkach stężenia troloksu na masę lub objętość próbki
TH	– sonda fluorescencyjna

WPROWADZENIE

Wolne rodniki to atomy, jony lub cząsteczki o bardzo dużej reaktywności. Charakteryzują się obecnością jednego lub więcej niesparowanych elektronów na powłoce walencyjnej. Powstają one ze związków chemicznych, które posiadają w budowie słabe wiązanie kowalencyjne. Do innych czynników powodujących powstawanie rodników należy promieniowanie radiacyjne, ultradźwięki, siły mechaniczne, wyładowania elektryczne czy też związki chemiczne, w tym związki pochodzenia naturalnego, gdzie przykładem są enzymy. Wolne rodniki po raz pierwszy zostały zsyntezowane oraz udokumentowane na przełomie XX i XXI wieku.

Rodniki można otrzymać różnymi metodami, a najważniejsze z nich to metoda pirolityczna (termiczna), elektrochemiczna, fotochemiczna oraz radiacyjna. Wolny rodnik dzięki swoim właściwościom bardzo łatwo utlenia białka, lipidy budujące błony komórkowe i kwasy nukleinowe. Najbardziej znanymi są rodniki tlenowe: $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ oraz H_2O_2 . Nazywane są one często reaktywnymi formami tlenu (z ang. ROS – *reactive oxygen species*).

Rodniki są integralną częścią funkcjonowania organizmów żywych. U człowieka powstają one w wielu reakcjach zachodzących w naszym organizmie. Do takich samoistnych reakcji zachodzących w naszym ciele należy generowanie ich w ośrodku zapalnym przez leukocyty w celu niszczenia drobnoustrojów [1]. Związki te odpowiedzialne są nie tylko za reakcje o negatywnych skutkach dla organizmu człowieka, ale też biorą udział w procesach, które wpływają pozytywnie na funkcjonowanie organizmu człowieka.

Bardzo popularnym współcześnie tematem naukowym jest wpływ rodników na choroby cywilizacyjne. Brak odpowiedniego odżywiania się, zbyt mało snu oraz stres powodują, że nasz organizm i jego układ odpornościowy nie są w stanie poradzić sobie ze skutkami stresu nitro - oksydacyjnego. Stres nitro - oksydacyjny występuje w momencie, gdy zaburzona jest równowaga pomiędzy reaktywnymi formami tlenu a „biologiczną obroną” organizmu, którego rolą jest naturalna detoksykacja. Stres nitro – oksydacyjny ma wielki wpływ na patogenezę chorób cywilizacyjnych, takich jak cukrzyca czy nowotwory złośliwe. Należy podkreślić jednak, że indukcja stresu nitro – oksydacyjnego jest bardzo ważnym narzędziem do walki z nowotworami. Należy nadmienić, że opisane metody w artykule mają potencjał kliniczny. Szczególnie interesującym tematem jest wewnątrzkomórkowa detekcja stresu nitro – oksydacyjnego, rola poszczególnych form tlenu i azotu wykorzystywanych jako bio – markerów w leczeniu chorób nowotworowych, cukrzycy.

W niniejszym artykule opisano wybrane metody, które pozwalają walczyć ze stresem nitro - oksydacyjnym. Proponowane związki kompleksowe znajdują zastosowanie jako potencjalne antyutleniacze wspomagające walkę z różnymi chorobami, jak nowotwory złośliwe czy też cukrzyca. Charakterystyka odpowiednich metabolitów wymaga odpowiedniej analizy ich właściwości. Metody *in – vitro* są często

stosowane, ponieważ nie są drogie, są stosunkowo szybkie do przeprowadzenia oraz co ważne, pozwalają uniknąć wielu błędów pomiarowych [2].

1. METODY *IN-VITRO* OZNACZANIA AKTYWNOŚCI PRZECIWUTLENIAJACEJ ZWIĄZKÓW KOMPLEKSOWYCH

Procesy zachodzące poza organizmami żywymi wykorzystywane są do badania właściwości antyoksydantów w celu unieczynnienia wolnych rodników. Reakcje badane metodami *in – vitro* mogą zachodzić zgodnie z dwoma mechanizmami:

- HAT (ang. *hydrogen atom transfer*) – przeniesienie atomu wodoru
- SET (ang. *single electron transfer*) – przeniesienie pojedynczego elektronu.

Drugi podział metod oznaczania związków antyoksydacyjnych uwzględnia zastosowany system pomiarowy. Można podzielić je na:

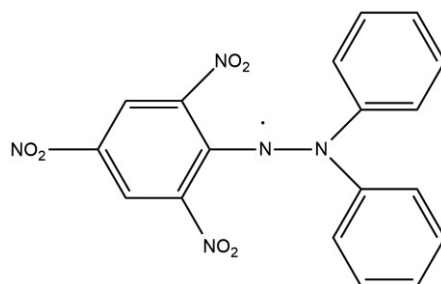
- addycyjne – określa się opóźnienie rozpoczęcia działania oksydantu na antyoksydant wskaźnikowy
- postaddycyjne – określa się aktywność antyoksydacyjną za pomocą zmian stężeń substratu testowego bądź produktu, na skutek reakcji chemicznej bądź rodnikowej utleniacza i antyoksydantów obecnych w próbce [3].

1.1. TEST DPPH

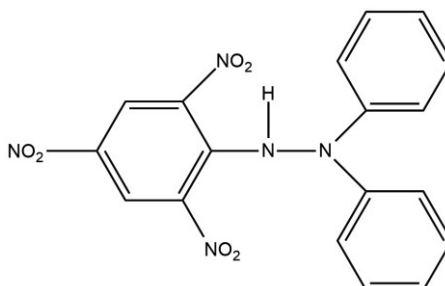
Jedną z najczęściej stosowanych metod *in – vitro* jest metoda z zastosowaniem odczynnika DPPH. 1,1 – difenylo – 2 - pikrylohydrazyl (DPPH) należy do grupy stabilnych rodników, ponieważ jest stabilizowany poprzez struktury rezonansowe. Posiada on w swojej budowie niesparowany elektron na powłoce walencyjnej znajdujący się na jednym z atomów azotu, który może tworzyć mostek azotowy (Rys. 1). Zdelokalizowany elektron w cząsteczce DPPH uniemożliwia tworzenie się dimerów.

W badaniach stosuje się najczęściej alkoholowe roztwory tego rodnika [4]. Mają one barwę fioletową. Maksimum absorpcji rodnika DPPH występuje przy długości fali $\lambda = 517$ nm [5]. Reakcja redukcji rodnika DPPH charakteryzuje się zmianą barwy na kolor żółty. Podczas przeprowadzania tego testu należy ograniczyć do minimum dostęp tlenu oraz światła do próbki, dokładnie dostosować pH roztworu oraz wybrać odpowiedni rozpuszczalnik [6]. DPPH rozpuszcza się tylko w rozpuszczalnikach hydrofobowych, natomiast oznaczenie w rozpuszczalnikach hydrofilowych jest niemożliwe ponieważ jest to związek wykazujący powinowactwo do grup hydrofobowych. Niewłaściwe warunki pomiarów mogą wpłynąć na obniżenie absorpcji roztworu [7].

Zawartość niezredukowanego DPPH wyrażona w procentach jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia substancji utleniającej w badanej próbce. Metoda ta wykorzystywana jest do określenia właściwości antyoksydacyjnych związków fenolowych, antyutleniających związków chemicznych zawartych w owocach, wyciągach roślinnych czy też w żywności. Poniżej na Rysunkach 1 i 2 przedstawiono dwie struktury rezonansowe DPPH [8, 9].



Rysunek 1. Wzór uproszczony wolnego rodnika DPPH
Figure 1. The simplified formula of the free radical DPPH



Rysunek 2. Wzór uproszczony formy zredukowanej DPPH
Figure 2. The simplified formula of the reduced DPPH form

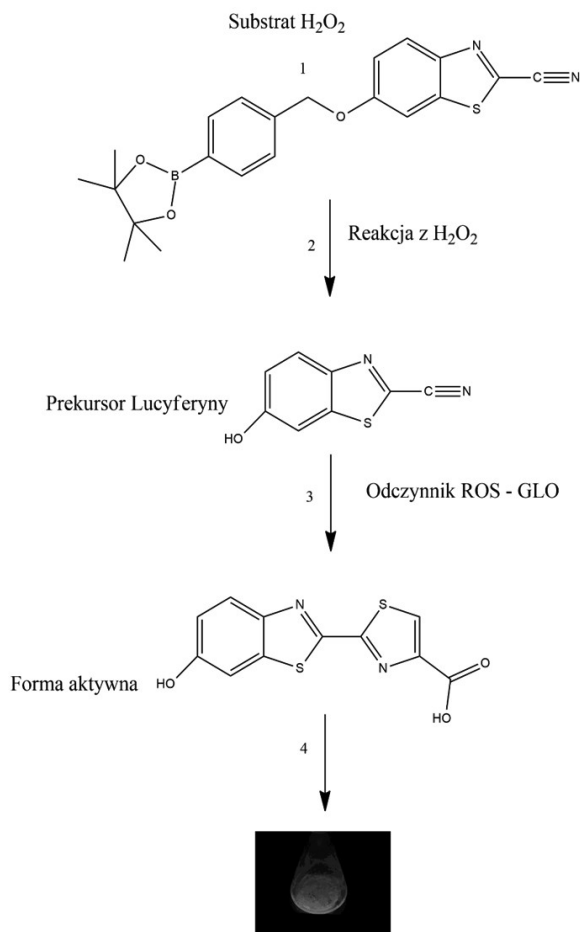
1.2. TEST WYCHWYTU H_2O_2

Nadtlenek wodoru należy do reaktywnych form tlenu. Związek ten wykorzystywany jest jako antyoksydant w komórkach białek enzymatycznych.

Opracowano test ROS – GLO TM, dzięki któremu można bezpośrednio oznaczyć stężenie nadtlenu wodoru lub reaktywnych form tlenu, bezpośrednio w komórkach czy też w określonych reakcjach enzymatycznych za pomocą luminescencji. Wzrost zawartości nadtlenu wodoru może oznaczać ogólny wzrost stężenia wszystkich reaktywnych form tego pierwiastka ponieważ różne RFT występujące w komórkach są przekształcane w nadtlenek wodoru. Przykładem może tu być dysmutaza ponadtlenkowa, która w reakcji dysmutacji dwóch

rodników ponadtlennkowych z udziałem dwóch protonów prowadzi do powstania H_2O_2 oraz tlenu cząsteczkowego. Ponadto nadtlenek wodoru posiada najdłuższy okres półtrwania ze wszystkich RFT występujących w komórkach.

Metoda ta, zaproponowana przez firmę Promega należy do bardzo szybkich - wykonanie takiego testu zajmuje mniej niż dwie godziny. Ten test oparty jest na zjawisku chemiluminescencji. Polega on na wykorzystaniu luminoforu, który w reakcji z H_2O_2 znajdującym się w badanej próbce tworzy prekursor lucyferyny, a ta w połączeniu z odczynnikiem ROS – GLO daje aktywną postać luminescencyjną. Dzięki temu obserwuje się sygnał w postaci światła proporcjonalny do stężenia nadtlenu wodoru. Poniżej, na Rysunku 3 przedstawiono schemat omówionego powyżej testu.



Rysunek 3. Schemat działania testu ROS – GLOTM firmy Promega [10]

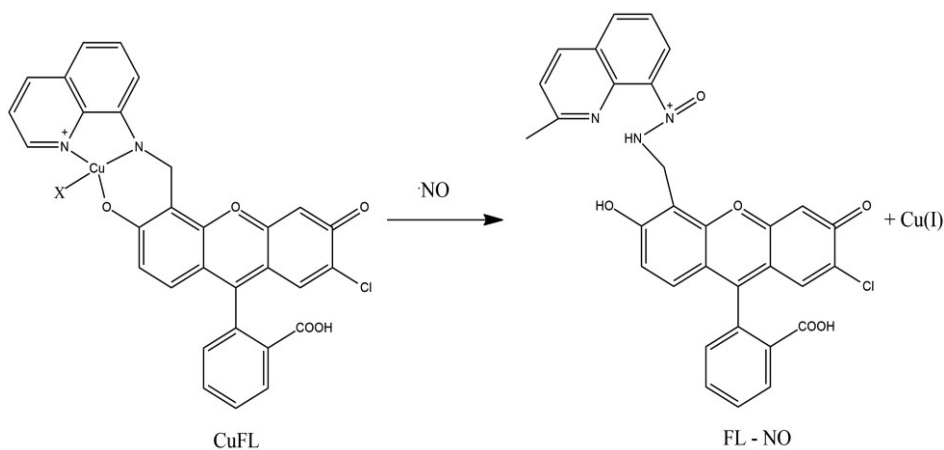
Figure 3. The scheme of the Promega ROS - GLOTM test [10]

1.3. TEST WYCHWYTU $\cdot\text{NO}$

Tlenek azotu(II) odgrywa ważną rolę w organizmie człowieka, odpowiadając za rozszerzanie ścian naczyń krwionośnych, transport sygnałów pomiędzy neuronami w mózgu, regulację krwi oraz ma wpływ na mechanizmy immunologiczne [11, 12].

Jedną z bezpośrednich metod wychwytu $\cdot\text{NO}$ jest metoda z użyciem organicznego kompleksu miedzi(II) CuFL (organiczny kompleks miedzi(II) z fluorochromem), który to należy do fluorochromów. Polega ona na redukcji Cu(II) do Cu(I) oraz na wewnątrzcząsteczkowym nitrozowaniu atomu azotu, który jest drugorzędowy [13]. Kompleks ten przenika przez błonę komórkową bardzo łatwo, dzięki czemu test ten można przeprowadzać w warunkach fizjologicznych.

Przeprowadzane tego typu analizy nie wymagają dostępu tlenu by badana próbka wykazywała możliwość fluorescencji. Metoda ta należy do specyficznych, ponieważ pozwala wykryć $\cdot\text{NO}$ w obecności anionów azotanowych(V), anionów azotanowych(III) czy też RFT takich jak : $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , ONOO^- , które nie reagują z powstającym produktem. Dzięki tej właściwości unika się możliwości zafałszowania wyników fluorescencji. Poniżej, na Rysunku 4 przedstawiono schemat reakcji CuFL z tlenkiem azotu(II) [13, 14].



Rysunek 4. Schemat reakcji CuFL z tlenkiem azotu(II) [13, 14]

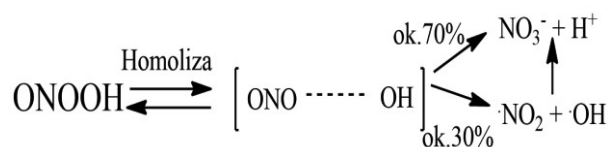
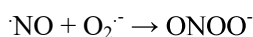
Figure 4. The scheme of CuFL reaction with nitric oxide (II) [13, 14]

1.4. TEST WYCHWYTU ONOO^-

Anion nadtlenoazotynowy powstaje w wyniku reakcji rodnika $\cdot\text{NO}$ oraz $\text{O}_2^{\cdot-}$. Powstające indywiduum jest w równowadze ze swoją sprotonowaną formą, tzn.

kwasem nadtlenoazotowym [15]. Równowaga pomiędzy ONOO^- a ONOOH występuje w $\text{pK} = 6,8$ [16].

Anion ONOO^- należy do silnych utleniaczy a jego reaktywność jest mocno zależna od pH środowiska. Kwas nadtlenoazotowy ONOOH bardzo szybko ulega reakcji izomeryzacji [17]. Wraz z coraz mniejszymi wartościami pH stosunek formy zredukowanej do utlenionej wzrasta na korzyść indywiduum sprotonowanego. Prowadzi to do wzrostu szybkości izomeryzacji kwasu nadtlenoazotowego. ONOOH ulega homolizie, czyli rozpadowi wiązania w miejscu O-O z utworzeniem dwóch rodników $\cdot\text{OH}$ oraz $\text{ONOO}\cdot$, które znajdują się w tzw. „klatce” (klatka jest miejscem gdzie zachodzi proces izomeryzacji) i otoczone są cząsteczkami wody. Para wyżej wymienionych rodników może przenikać na zewnątrz „klatki” bądź ulec bezpośredniemu przegrupowaniu do NO_3^- . Pierwszy przypadek to około 30% prawdopodobieństwa, natomiast drugi wynosi 70% dla tej pary rodnikowej. Poniżej przedstawiono opisane powyżej reakcje [18, 19].



Anion nadtlenoazotynowy uznawany jest za niebezpieczny oraz toksyczny związek dla organizmu człowieka. Do najskuteczniejszych antyoksydantów, które zwalczają rodnik $\cdot\text{ONOO}$ należą metmioglobina, methemoglobina oraz peroksyredoksyny. Ich stężenia lokalne w różnych częściach organizmu człowieka oraz ich duże wartości stałych szybkości reakcji antyoksydacji anionu nadtlenoazotynowego powodują, że są one najbardziej efektywne, oraz co ważne, są to związki występujące naturalnie u człowieka.

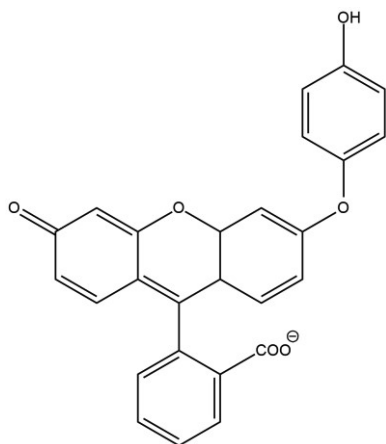
W toku są badania nad związkami syntetycznymi, które mogą pełnić rolę antyoksydantów. Należą do nich związki manganu Mn(II, III) i żelaza Fe(III) w układzie ze związkami kompleksowymi. Porfiryne manganowe, aby były skuteczne w swoim działaniu potrzebują wsparcia dobrego reduktora, jakim jest np. kwas askorbinowy lub glutation, aby zneutralizować toksyczny rodnik w cyklu katalitycznym [20].

1.5. TEST WYCHWYTU $\cdot\text{OH}$

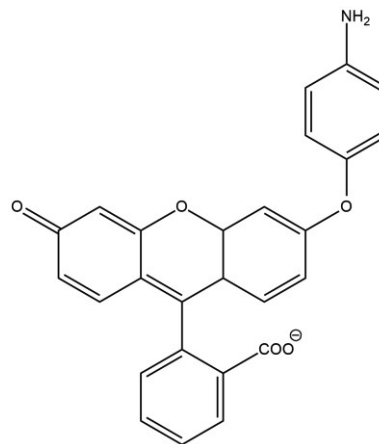
Rodnik $\cdot\text{OH}$ jest najbardziej reaktywną formą RFT. Jego okres półtrwania w organizmie jest bardzo krótki i wynosi około 10^{-9} s. Uważa się, że to indywidualne chemiczne może wchodzić w reakcję ze wszystkimi substancjami w komórce.

Rodnik hydroksylowy powstaje jako produkt uboczny metabolizmu oddychania tlenowego. Do oznaczania tego rodnika stosuje się między innymi komercyjną metodą CAA (*cellular antioxidant activity assay*) z użyciem odpowiedniej sondy fluorescencyjnej w połączeniu z kontrolowanymi, różnymi źródłami RFT.

Do sond, których używa się dzięki ich dużej selektywności względem $\cdot\text{OH}$ należą pochodne fluoresceiny: APF, czyli kwas [2 – [6 – (4V – amino) – fenoksy – 3H – ksanten – 3 – on – 9 – yl] benzoesowy oraz HPF - kwas [2 – [6 – (4V – hydroksy)fenoksy – 3H – ksanten – 3 – on – 9 – yl] benzoesowy. Jeśli w pobliżu sondy znajdują się RFT ulega ona utlenieniu i wykazuje fluorescencję. Poniżej przedstawiono wzory uproszczone tych związków (Rys. 5 - 6).



Rysunek 5. Wzór uproszczony HPF
Figure 5. The simplified formula of HPF

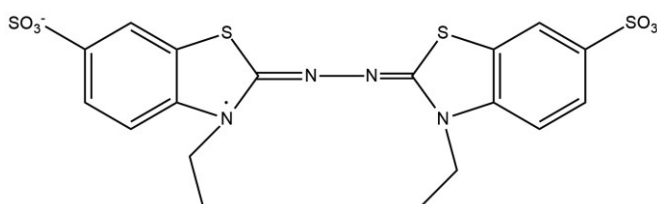


Rysunek 6. Wzór uproszczony APF
Figure 6. The simplified formula of APF

Wykazano, że obie sondy wykazują zdolność do detekcji rodnika hydroksylowego w wyniku reakcji Fentona. Na skutek O-dearylacji tych sond oraz wzbudzenia rodnika $\cdot\text{OH}$ można zaobserwować silną fluorescencję przy $\lambda = 520$ nm dzięki powstającym pochodnym fluoresceiny [21].

1.6. METODA ABTS

Metoda ta oparta jest na przeniesieniu elektronu, czyli SET w połączeniu z detekcją spektrofotometryczną. Polega ona na kontrolowaniu zmian stężeń rodnika 2,2-azynobis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu). Poniżej przedstawiono wzór uproszczony tego kationorodnika [22].



Rysunek 7. Wzór uproszczony kationorodnika ABTS⁺
Figure 7. The simplified formula of cationic radical ABTS⁺

ABTS⁺ ma barwę niebiesko-zieloną oraz posiada w środowisku wodnym cztery maksima absorpcji przy następujących długościach fal: $\lambda = 417, 645, 728$ i 815 nm, natomiast w środowisku alkoholowym, a dokładnie w środowisku etanolowym, wykazuje maksima absorpcji przy następujących długościach fal: $\lambda = 414, 730$ i 873 nm. Pomiar w tej metodzie wykonywane są przy pH= 7,4 [3].

Warunkiem koniecznym do przeprowadzenia tego testu jest zsyntezowanie ABTS⁺. Można dokonać tego poprzez zainicjowanie reakcji enzymatycznych bądź metodami chemicznego utlenienia. Reakcje enzymatyczne wywołuje się dzięki reakcjom z mioglobina, hemoglobina bądź peroksydazą chrzanową [23]. Chemiczne utlenienie można przeprowadzić za pomocą związków chemicznych takich jak MnO₂ lub K₂S₂O₈, jednakże wymaga ono dłuższego czasu na przeprowadzenie reakcji, który wynosi około 16 godzin.

Wpływ na redukcję kationorodnika ma reaktywność i stężenie antyoksydantu oraz czas trwania reakcji. Otrzymane wyniki wyrażane są poprzez ekwiwalent TEAC, czyli ekwiwalent potencjału przeciwutleniającego troloksu w reakcji z kationorodnikiem. Troloks jest to syntetyczna pochodna witaminy E pełniąca funkcję substancji odniesienia. Wadą tej metody jest fakt, że generowany rodnik wykazuje o wiele większą trwałość niż inne rodniki obecne w organizmie człowieka [24].

1.7. METODA TRAP

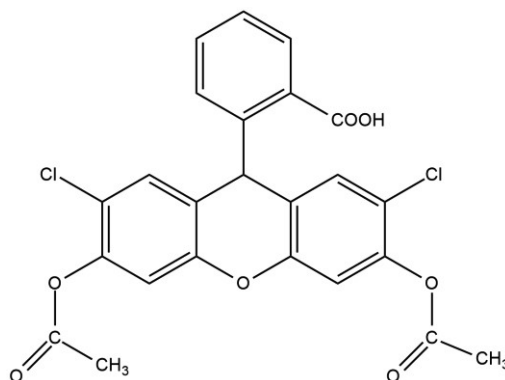
(OZNACZANIE CAŁKOWITEGO POTENCJAŁU ANTYOKSYDACYJNEGO)

Metoda oznaczania całkowitego potencjału antyoksydacyjnego oparta jest na mechanizmie HAT (*hydrogen atom transfer*), czyli przeniesienia atomu wodoru. Na początku, gdy metoda ta została odkryta, polegała ona na pomiarze spadku

fluorescencji białka R – fikoerytryny. Spadek fluorescencji wynika z powstających rodników nadtlenkowych, które tworzą się w termicznym rozpadzie związków azowych.

Ze względu na wady stosowania białka R – Pe, do których zalicza się powolną reakcję rodników z R – fikoerytryną w porównaniu z antyutleniaczami (około 100 razy wolniej) zmodyfikowano metodę poprzez zastosowanie dioctanu 2,7 – dichlorofluoresceiny (Rys. 8), która w wyniku reakcji z rodnikami tworzy pochodną fluoresceiny charakteryzującą się fluoryzacją. Reakcja ta przebiega przy pH = 8,6 w środowisku buforu fosforanowego lub roztworu glicyny.

Otrzymane wyniki opracowuje się za pomocą dwóch metod. Pierwsza z nich, polega na zmierzeniu czasu indukcji próbki i porównaniu z czasem modelowym. Nie zawsze jednak możliwe jest wyznaczenie czasu, więc drugą możliwością jest porównanie pól powierzchni pod krzywą otrzymaną po zużyciu próbki. Krzywa ta przedstawia chemiluminescencje (%) w czasie (s). Wyznaczony parametr pozwala określić zdolność neutralizacji rodników przez związki chemiczne, dla których niemożliwe jest określenie czasu indukcji. Metoda ta wykazuje dobrą odtwarzalność wyników [3, 25].

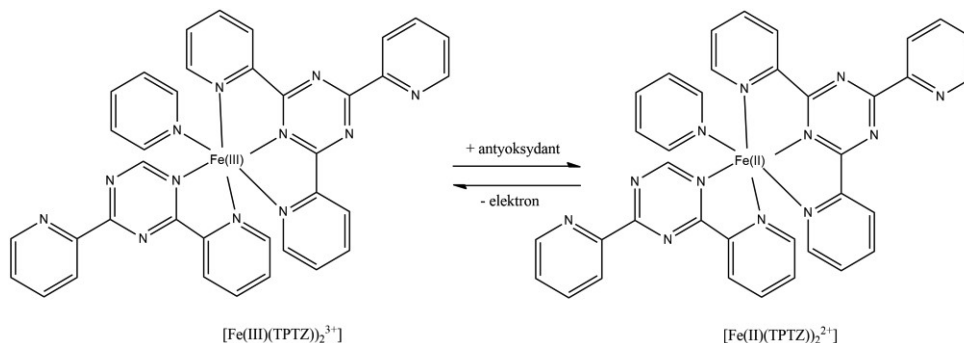


Rysunek 8. Wzór uproszczony dioctanu 2,7 – dichlorofluoresceiny
Figure 8. The simplified formula of 2,7-dichlorofluorescein diacetate

1.8. METODA FRAP

Metoda FRAP (ang. *Ferric ion reducing Antioxidant Parameter*) oparta jest na mechanizmie SET. Należy ona do najbardziej rozpowszechnionych testów wykorzystywanych do oznaczenia całkowitej zdolności antyoksydacyjnej próbek żywności za pomocą metod spektrofotometrycznych. Polega na redukcji jonu Fe(III) w kompleksie z (2,4,6-tris(2-pirydylo)-1,3,5-triazyną (TPTZ) do intensywnie niebieskiego kompleksu z jonami Fe(II), którego maksimum

absorbancji występuje przy długości fali $\lambda = 593$ nm. Schemat tej reakcji przedstawiono na Rysunku 9.



Rysunek 9. Schemat reakcji redukcji kompleksu Fe(III)-TPTZ do Fe(II)-TPTZ

Figure 9. The scheme of the reduction reaction of the Fe (III) -TPTZ complex to Fe (II) -TPTZ

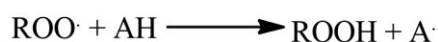
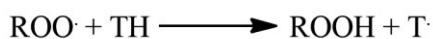
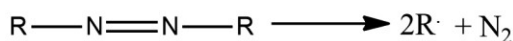
Za pomocą tego testu sprawdzana jest zdolność donorowa utleniacza. Stosując tę metodę można szybko przeprowadzić analizę, natomiast należy podkreślić, że metoda FRAP posiada też wady. Do nich zalicza się fakt, że stosowany kompleks może zostać zredukowany przez każdy związek chemiczny, który charakteryzuje się potencjałem redoks poniżej 0,7 V. Kolejnym ograniczeniem tej metody jest produkcja rodników w obecności Fe(II) i nadtlenu wodoru. Badania prowadzi się w $\text{pH} = 3,6$, ponieważ w takich warunkach kompleks posiada największą trwałość. Wyżej wymienione właściwości skłaniają do stwierdzenia, że metoda ta nie jest efektywna w przypadku badań prowadzonych na próbkach biologicznych, ponieważ warunki w których przeprowadzane byłyby badania nie odzwierciedlają warunków fizjologicznych organizmu.

Z tego powodu trwają poszukiwania innych reduktorów, które będzie można wykorzystać do badań w pH fizjologicznym. Naukowcy wykazują zainteresowanie układami redukującymi Fe(III) z ligandami takimi jak 1,10 – fenantrolina, batofenantrolina oraz żelazocyjankami.

1.9. METODA HORAC

Metoda HORAC przebiega według mechanizmu HAT, czyli przeniesienia atomu wodoru.

Polega na pomiarze aktywności antyoksydacyjnej za pomocą związku kompleksowego, w którego budowie występuje jon metalu, który chelatuje ligandy, w tym przypadku jest to Co(II). Reakcja ta przebiega w warunkach podobnych do reakcji Fentona i ma za zadanie ocenić zdolność antyoksydacyjną przeciw



gdzie: TH – sonda fluoerescencyjna, AH – antyutleniacz [28].

Rysunek 11. Schemat reakcji zachodzących podczas metody ORAC

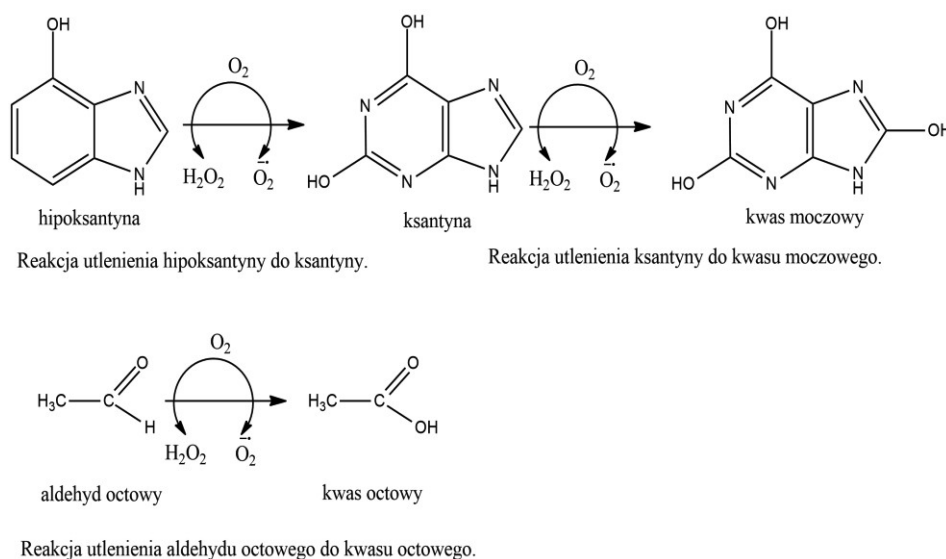
Figure 11. The scheme of reactions taking place during the ORAC method

Test ten polega na reakcji rodników peroksydowych, które powstają ze związków azowych lub hydroksyloowych, generowanych w reakcji Cu^+ z nadtlenkiem wodoru oraz sondą fluoerescencyjną, którą może być fluoresceina, jej pochodne, rozpuszczalny w wodzie kompleks białka z fikoerytrobiliną lub pirogalol [29, 30]. Zanik fluoerescencji sondy spowodowany jest reakcją utlenienia. Substancja antyutleniająca powoduje inhibicję rozkładu znacznika, by nastąpiła potem kolejno neutralizacja wolnych rodników przez antyoksydant. Procesy te powodują wydłużenie czasu indukcji i zmniejszenie wartości stałej szybkości reakcji sondy.

Analiza ilościowa polega na obliczeniu pola pod krzywą zaniku fluoerescencji próbki badanej oraz próbki standaryzowanej [31]. Do substancji wzorcowych stosowanych w tej metodzie zalicza się troloks oraz kwas galusowy. Metodę tę stosuje się zarówno do określenia właściwości antyoksydacyjnych związków lipofilowych jak i hydrofilowych. Metoda ORAC należy do testów o dużej precyzji i czułości. Wykorzystywana jest do badań próbek biologicznych oraz żywności [32].

1.11. METODA OKSYDAZY KSANTYNOWEJ

Oksydaza ksantynowa należy do grupy enzymów, jakimi są oksydoreduktazy. Oksydaza ksantynowa katalizuje reakcję utlenienia ksantyny do kwasu moczowego, puryny do hipoksantyny, hipoksantyny do ksantyny oraz aldehydów do kwasów karboksylowych (Rysunek 12). Oksydaza może redukować O_2 jedno lub dwuelektronowo, gdzie akceptorem jest tlen cząsteczkowy. Sposób redukcji tlenu zależy od pH, stężenia tlenu w roztworze oraz stężenia substratów.



Rysunek 12. Reakcje oksydazy ksantynowej [1]
 Figure 12. Reactions of xanthine oxidase [1]

Oksydazę ksantynową wykorzystuje się w syntezie anionorodnika ponadtlenkowego. Ten redukuje cytochrom c, którego roztwór mocniej absorbuje przy długości fali $\lambda = 550$ nm niż jego forma utleniona. W przeprowadzonym teście należy dodać odpowiednią ilość oksydazy ksantynowej, tak aby katalizowała reakcję w odpowiedni sposób. Redukcja cytochromu c powinna skutkować przyrostem absorpcji światła przez roztwór z szybkością około 6 ns^{-1} [1].

1.12. CYTOMETRIA PRZEPŁYWOWA ORAZ CYTOMETRIA OBRAZOWA

Pomiary fluorescencji możemy zmierzyć za pomocą wielu metod. Napotykamy się jednak na problem utrudniający pomiar, mierząc wartość fluorescencji metodą np. czytnika płytek wielodołkowych – otrzymywany wynik jest sumą wartości fluorescencji tła oraz fluorescencji wewnątrzkomórkowej. Metodą, która rozwiązuje ten problem jest cytometria przepływowa. Metoda ta podaje wartość tylko fluorescencji wewnątrzkomórkowej. W wyniku zastosowania tej techniki otrzymuje się dane ilościowe mówiące o liczbie komórek emitujących fluorescencję, zamiast względnej fluorescencji całej próbki. Do wad tej metody należy fakt, że badane komórki muszą być zawieszony w próbce. Cytometria przepływowa w połączeniu z sondami fluorescencyjnymi pozwala na detekcję reaktywnych form tlenu i azotu. Ponadto, znajduje zastosowanie w badaniach klinicznych. Cytometria obrazowa wykorzystywana jest przede wszystkim w badaniach biologicznych. Pozwala na określenie kształtu, wymiarów oraz struktury badanych narządów, tkanek czy

organelli. Metoda ta pozwala uzyskać wiele szczegółowych informacji jak liczebność badanych komórek czy też pola powierzchni przez nie zajmowanych.

UWAGI KOŃCOWE

Metody *in – vitro* oznaczania aktywności przeciwutleniających związków kompleksowych są tematem przyszłościowych badań, ponieważ powiązane są ze zmianami środowiskowymi, nieprawidłowymi nawykami żywieniowymi oraz stylem życia, które prowadzą do chorób cywilizacyjnych. Cukrzyca, nowotwory złośliwe, miażdżyca oraz otyłość to przykłady najpoważniejszych chorób wywołanych poprzez działania wolnych rodników.

Stres oksydacyjny oraz metody badania zwalczania tego zjawiska nie są jeszcze dokładnie poznane, ponieważ mechanizmy reakcji powodujących jego występowanie są skomplikowane. W XX wieku uważano, że wolne rodniki powstające w wyniku stresu oksydacyjnego są tylko i wyłącznie szkodliwe dla organizmu człowieka. Teraz można stwierdzić, że istnieją przesłanki, które świadczą również o pozytywnej roli tych indywidualności chemicznych. Wspomagają one bowiem gojenie się ran, zrost kości oraz mają właściwości antybakteryjne.

Podsumowując, należy jednoznacznie stwierdzić, iż warto kontynuować badania w zakresie tego tematu, ponieważ badania nad rolą i mechanizmami stresu nitro-oksydacyjnego są ważne w patogenezie i leczeniu wielu chorób. Niezwykle istotna jest również walka z chorobami cywilizacyjnymi, poprzez poszukiwanie nowych związków aktywnie czynnych. Jednak należy brać pod uwagę też aspekt negatywny stresu nitro – oksydacyjnego, na przykład skutki nowotworowe. Stąd, ważne jest zachowanie homeostazy organizmu oraz równowagi pomiędzy stresem nitro-oksydacyjnym, a fizjologicznymi mechanizmami przeciwutleniającymi.

PODZIĘKOWANIA

Praca wspierana finansowo przez Narodowe Centrum Nauki w ramach dotacji 2015/19/N/STS/00276.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] G. Bartosz, Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2013.
- [2] L. Mello, S. Hernandez, G. Marrazza, M. Mascini, L. Tatsuo Kubota Investigations of the antioxidant properties of plant extracts using a DNA-electrochemical biosensor. *Biosens and Bioelectronics*, 2006, **21**, 137.
- [3] W. Grajek, *Przeciwutleniacze w żywności*, Warszawa, 2007.

- [4] K.I. Berker, F.A. Olgun, D. Ozyurt B. Demirata, R. Apak, Modified folin – Ciocalteu antioxidant capacity assay or measuring lipophilic antioxidants, *J. Agr. Food Chem.* 2013, **61**, 4783.
- [5] I. Zych, A. Krzepiłko, Pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej wybranych antyoksydantów i naparów metodą redukcji rodnika DPPH, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, 2010.
- [6] D. Ozyurt, B. Demirata, R. Apak, Determination of total antioxidant capacity by a new spectrophotometric method based on Ce(IV) reducing capacity measurement, *Talanta*, 2006, **71**, 115.
- [7] M.B. Arnao, Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci. Tech.*, 2000, **11**, 419.
- [8] H.J. Bartoń, M. Folta, Z. Zachwieja, Zastosowanie metod FRAP, ABTS, i DPPH w badaniu aktywności antyoksydacyjnej produktów spożywczych, *Nowiny Lek.* 2005, **74**, 510.
- [9] H.J. Bartoń, M. Folta, New approach in the analysis of antioxidant activity of coloured biological samples: a modification of the method of DPPH radical scavenging. W: *Molecular and Physiological Aspects of the Regulatory Processes of the Organism. Proceeding of the XV International Symposium of the Polish Network of Molecular and Cellular Biology UNESCO/PAN. Kraków 2006.*
- [10] G. Vidugiris, S. Duellman, J. Shultz, J. Vidugierene, H. Wang, J. Osterman, W. Zhou, P. Meisenheimer, J.J. Cali, ROS-Glo™ H2O2 Assay - Novel Luminescence-Based Assay for ROS Measurement [online], Promega Biosciences LLC <https://cdn.technologynetworks.com/TN/Resources/PDF/ros-glo-h2o2-assay-a-luminescent-assay-for-detection-of-reactive-oxygen-species-poster.pdf> [dostępny w internecie 06.12.2018].
- [11] <https://cdn.technologynetworks.com/TN/Resources/PDF/ros-glo-h2o2-assay-a-luminescent-assay-for-detection-of-reactive-oxygen-species-poster.pdf> [dostępny w internecie 06.12.2019].
- [12] M. Feelisch, J.S. Stamler: *Methods in nitric oxide research*, John Wiley and Sons, New York. 1996.
- [13] K. Ciszewski, M. Macherzyński, G. Milczarek, Czujniki elektrochemiczne do oznaczania biologicznie aktywnego tlenku azotu, Wydawnictwo PP, Poznań 2003.
- [14] H. Hong, J. Sun, W. Cai: Multimodality imaging of nitric oxide and nitric oxide synthases, *Free Radic Biol. Med.*, 2009, **47**, 684.
- [15] E.W. Miller, C.J. Chang, Fluorescent probes for nitric oxide and hydrogen peroxide in cell signaling, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2007, **11**, 620.
- [16] W.A. Pryor, G.L. Squadrito, The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide, *Am. J. Physiol.*, 1995, **268**, L699.
- [17] R. Kissner, T. Nauser, P. Bugnon, P.G. Lye, W.H. Koppenol, Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique and pulse radiolysis, *Chem. Res. Toxicol.*, 1997, **10**, 1285.
- [18] S. Pfeiffer, A.C.F. Gorren, K. Schmidt, E.R. Werner, B. Hansert, D.S. Bohle, B. Mayer, Metabolic fate of peroxynitrite in aqueous solution, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 3465.
- [19] R. Radi, G. Peluffo, M.N. Alvarez, M. Naviliat, A. Cayota, Unraveling peroxynitrite formation in biological systems, *Free Radic. Biol. Med.*, 2001, **30**, 463.
- [20] O. Augusto, M.G. Bonini, A.M. Amanso, E. Linares, C.C.X. Santos, Men- Zeles de L, Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology, *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, **32**, 841.
- [21] G. Ferrero-Sueta, R. Radi, Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion and radicals, *Chem. Biol.*, 2009, **4**, 161.

- [22] K. Setsukinai., Y. Urano, K. Kakinuma, H.J. Majima, T. Nagano, Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 3170.
- [23] A.M. Osman, K.K.Y. Wong, A. Fernyhough, ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, **346**, 321.
- [24] O. Ereli, A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation, *Clin. Biochem.*, 2004, **37**, 277.
- [25] J.T. Mariken, J. Arts, S. Dallinga, H.P. Voss, G. Haenen, A. Bast, A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay, *Food Chem.*, 2004, **88**, 567.
- [26] A. Ghiselli, M. Serafini, G. Maiani, E. Azzini, A. Ferro-Luzzi, A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability, *Free Radic. Biol. Med.*, 1995, **18**, 29.
- [27] I.F.F. Benzie, J.J. Strain, The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay, *Anal. Biochem.*, 1996, **239**, 70.
- [28] <https://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-346-horac-assay-kit.pdf> [dostępny w internecie: 05.11.22018].
- [29] L.M. Magalhaes, M.A. Segundo, S. Reis, J.L.F.C. Lima, Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **613**, 1.
- [30] E. Alarcón, A.M. Campos, A.M. Edwards, E. Lissi, C. López-Alarcón, Antioxidant capacity of herbal infusions and tea extracts: A comparison of ORAC-fluorescein and ORAC-pyrogallol red methodologies, *Food Chem.*, 2008, **107**, 1114.
- [31] L.C. MacDonald-Wicks, L.G. Wood, M.L. Garg, Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review, *J. Sci. Food Agr.*, 2006, **86**, 2046.
- [32] B. Ou, M. Hampsch-Woodill, R.L. Prior, Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe, *J. Sci. Food Agr.*, 2001, **49**, 4619.

Praca wpłynęła 29 marca 2019 roku.