

**METODY *IN – VIVO* BADANIA WŁAŚCIWOŚCI  
ANTYOKSYDACYJNYCH ZWIĄZKÓW  
KOMPLEKSOWYCH**

*IN – VIVO* METHODS FOR TESTING OF THE  
ANTIOXIDANT PROPERTIES OF COMPLEX  
COMPOUNDS

**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-vivo* oznaczania aktywności przeciwutleniającej związków kompleksowych
  - 1.1. Metoda zredukowanego glutationu
  - 1.2. Test peroksydazy glutationowej
  - 1.3. Test S – transferazy glutationowej
  - 1.4. Metoda dysmutazy ponadtlenkowej
  - 1.5. Oznaczanie aktywności katalazy
  - 1.6. Test aktywności transpeptydazy  $\gamma$ -glutamylowej
  - 1.7. Test reduktazy glutationowej
  - 1.8. Metoda peroksydacji lipidów
  - 1.9. Test LPIC

Uwagi końcowe


Podziękowanie

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 37 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**

This article describes the *in-vivo* methods of studying the antioxidant properties of complex compounds. The reduced glutathione (GSH) method, which uses the reactivity of the reduced form of GSH with free radicals, is among the described methods. Further the *in-vivo* methods are based on the use of antioxidant enzymes such as glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, superoxide dismutase, catalase. These types of enzymes occur naturally in the human body and they are responsible for the inactivation of free radicals, *e. g.* superoxide dismutase catalyzes the reaction of disproportionation of superoxide anion radical to water and oxygen. The next *in-vivo* methods described in this article use  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase and glutathione reductase, which are components of the antioxidant mechanism occurring in an organism. The last method described in this work relates to the lipid peroxidation, which is determined by the concentration of dimalonlic aldehyde.

Keywords: antioxidant properties, radicals, *in – vivo* methods

Słowa kluczowe: właściwości przeciwutleniające, rodniki, metody *in – vivo*

---

**WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW**

CAT	– katalaza
CuZnSOD (SOD1)	– cytoplazmatyczna dysmutaza ponadtlenkowa zawierająca miedź oraz cynk
DTNB	– kwas 5,5-ditio-bis- 2-nitrobenzoesowy
EC	– SOD – zewnątrzkomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa
Gr	– reduktaza glutationowa
Grx	– glutaredoksyna
GSH	– forma utleniona glutationu
GSSH	– forma zredukowana glutationu
GST	– S – transferaza glutationowa
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	– nadtlenek wodoru
hem	– grupa hemowa
LDL	– lipoproteina o niskiej gęstości
LH	– kwas tłuszczowy
LO <sup>•</sup>	– rodnik alkoksylowy kwasu tłuszczowego
LOO <sup>•</sup>	– rodnik nadtlenkowy kwasu tłuszczowego
LOOH	– nadtlenek kwasu tłuszczowego
LPIC	– metoda oznaczania inhibicji utlenienia frakcji LDL
MAPEG	– białka błonowe
MDA	– aldehyd dimalonowy
MnSOD (SOD2)	– mitochondrialna dysmutaza ponadtlenkowa zawierająca mangan
NADPH	– fosforan dinukleotydu nikotyno – amidoadeninowego
NADP <sup>+</sup>	– ester fosforanowy dinukleotydu nikotyno – amidoadeninowego
non – Se – GPx	– formy niezależne od selenu peroksydazy glutationowej
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	– anionorodnik ponadtlenkowy
RFT	– reaktywne formy tlenu
RFTN	– reaktywne formy tlenu i azotu
Se – GPx	– formy selenozależne peroksydazy glutationowej
TBA	– kwas tiobarbiturowy
TNB	– kwas 5 – tio – 2 – nitrobenzoesowy
TPTZ	– (2,4,6-tris(2- pirydylo)-1,3,5-triazyna
TRAP	– metoda oznaczenia całkowitego potencjału antyoksydacyjnego

## WPROWADZENIE

Reaktywne formy tlenu i azotu (RFTN) to czynniki ryzyka stresu oksydacyjnego w organizmie ludzkim. Występowanie RFTN w organizmie jest naturalne i powiązane z licznymi szlakami metabolicznymi m. in. łańcuchem oddechowym. W przypadku, gdy stężenie RFTN w organizmie jest wyższe niż stężenie fizjologiczne tych indywidualów to występuje zjawisko nazywane stresem oksydacyjnym. Zjawisko stresu oksydacyjnego w kilku przypadkach ma pozytywne skutki dla organizmu. Stres oksydacyjny jest czynnikiem indukującym relaksację mięśni gładkich. Pełni rolę regulującą ciśnienie krwi oraz normalizującą transformację włókien mięśniowych. Niestety długotrwałe utrzymujące się zjawisko stresu oksydacyjnego może prowadzić do apoptozy komórek i licznych uszkodzeń komórek.

Antyoksydanty to związki chemiczne, które obniżają stężenie RFTN w organizmie. Należą do nich przeciwutleniacze enzymatyczne np. dysmutaza ponadtlenkowa, nieenzymatyczne takie jak np. witaminy A, E, C, karotenoidy oraz antyoksydanty syntetyczne.

Z uwagi na zagrożenia wynikające z długotrwałe utrzymującego się stresu oksydacyjnego ważne jest poznanie wielu metod *in-vivo* oznaczania aktywności przeciwutleniającej. Metody te mają na celu pomiar poziomu stężenia poszczególnych RFTN, a także pomiar wpływu RFTN na dany układ pomiarowy.

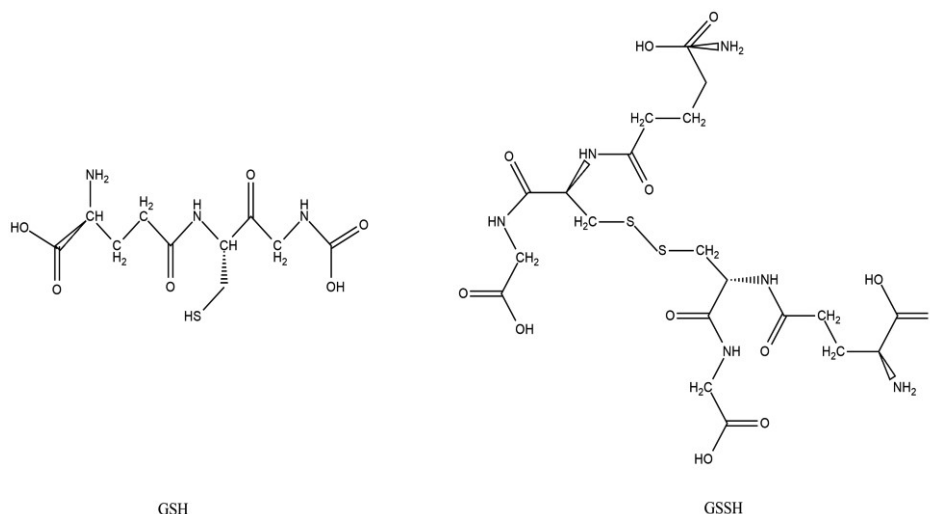
### 1. METODY *IN-VIVO* OZNACZANIA AKTYWNOŚCI PRZECIWUTLENIAJĄCEJ ZWIĄZKÓW KOMPLEKSOWYCH

Metody *in – vivo* stosowane są do określenia właściwości antyoksydacyjnych w warunkach, które są ich odwzorowaniem w organizmie człowieka. Do takich systemów należą liposomy i mikrosomy ze względu na podobieństwo do błony komórkowej. Do metod *in – vivo* zalicza się między innymi metodę LDL (lipoproteina o niskiej gęstości), oznaczanie utleniania fragmentacji DNA czy też inhibicję utleniania indukującego apoptozę żywych komórek ludzkich [1]. Pomimo, że istnieje wiele metod *in – vivo*, nie podlegają one żadnej standaryzacji wyników, co niewątpliwie jest dużą ich wadą. Otrzymane wyniki badań nie mogą zostać porównane z innymi, ponieważ często przeprowadzane są w innych warunkach. Nie można ocenić, która z metod charakteryzuje się największą czułością i precyzją oraz wybrać taką, która jest optymalna dla naszych badań i obarczona najmniejszym błędem [2].

#### 1.1. METODA ZREDUKOWANEGO GLUTATIONU

Glutation jest to trójpeptyd  $\gamma$  – glutamylcysteinyloglicyna, który występuje w dwóch formach, zredukowanej (GSH) oraz utlenionej (GSSG) (Rys.1). Związek

ten w komórkach biologicznych występuje w postaci zredukowanej w ilości około 99 %, natomiast pozostały procent to forma utleniona oraz koniugaty [3, 4]. Synteza zredukowanego glutationu przebiega w cytozolu, gdzie większość tego związku się znajduje oraz, w bardzo małym stopniu, poza komórkami [5].



Rysunek 1. Wzory uproszczone glutationu: formy zredukowanej (GSH) oraz utlenionej (GSSH)  
Figure 1. Simplified formulas of glutathione forms: reduced (GSH) and oxidized (GSSH)

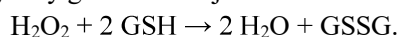
Grupa tiolowa -SH, występująca w GSH, a dokładnie w jednostce cysteiny powoduje jego naturalną zdolność antyutleniającą do redukcji mostków disiarczkowych oraz eliminacji związków utleniających [6]. Możliwe jest to dzięki temu, że w komórkach stężenie formy zredukowanej trójpeptydu jest bardzo wysokie oraz wartość standardowego potencjału redoks jest bardzo mała i wynosi około 240 mV [7].

GSH reaguje bezpośrednio z wolnymi rodnikami  $\cdot\text{NO}$ ,  $\cdot\text{OH}$  czy też  $\text{H}_2\text{O}_2$  w reakcjach nieenzymatycznych [8-11]. Forma zredukowana  $\gamma$  – glutamylcysteinylglycyny dzięki odwracalnemu przyłączeniu do grup tiolowych w białkach utrzymuje protekcję przed nieodwracalnym ich utlenieniem w warunkach stresu oksydacyjnego, równocześnie monitorując aktywność wyżej opisanego procesu [12]. GSH jest donorem elektronu dla enzymów glutaredoksyny (Grx) oraz peroksydazy glutationowej, które biorą udział w redukcji nadtlenu wodoru oraz organicznych nadtlenków (ROOH), gdzie R stanowi łańcuch węglowy (najczęściej rozgałęziony) [13].

## 1.2. TEST PEROKSYDAZY GLUTATIONOWEJ

Peroksydaza glutationowa (Rys. 2) należy do enzymów wykazujących właściwości antyoksydacyjne. Enzym ten ma masę cząsteczkową około 86 kDa, jest tetramerem, gdzie każda domena zbudowana jest z 203 reszt aminokwasowych. Jest ona kodowana przez gen GPX1, który znajduje się na krótkim ramieniu chromosomu 3. Enzym ten odpowiedzialny jest za redukcję  $H_2O_2$  do  $H_2O$ . Mechanizm tej reakcji opiera się na przeniesieniu elektronów z GSH na nadtlenek wodoru. Enzym ten może powrócić do formy zredukowanej dzięki działaniu reduktazy. Proces ten polega na przeniesieniu wodoru pochodzącego od fosforanu dinukleotydu nikotyno – amidoadeninowego (NADPH).

Reakcja utleniania peroksydazy glutationowej:



Reakcja redukcji GSSG:



Obniżona aktywność enzymu może wynikać ze zbyt małego stężenia pierwiastka śladowego jakim jest selen w organizmie, który odpowiedzialny jest za prawidłową pracę tego enzymu [14-17].

Wyróżnia się 6 izoform peroksydazy glutationowej, w zależności od jej występowania. 5 z 6 izoform tego enzymu jest zależne od selenu, natomiast jedna jest niezależna od tego pierwiastka (GPx – 5). Oznacza to, że w organizmie człowieka występuje 5 form, gdzie centrum aktywne enzymu stanowi selenocysteina. Nazywa się je formami selenozależnymi peroksydazy glutationowej (Se – GPx) [18]. Różnica pomiędzy izoformami zależnymi a niezależnymi od selenu jest taka, że Se – GPx wykazują zdolność katalizowania reakcji redukcji nadtlenuków organicznych i nieorganicznych natomiast non – Se – GPx wykazują właściwości do katalizowania wyłącznie nadtlenuków o charakterze organicznym, powstających w mechanizmie peroksydacji lipidów [19, 20]. Aktywność peroksydaz glutationowych non - Se - GPx wykazują białka błonowe MAPEG. Zbudowane są z trzech podjednostek (trimery) i uczestniczą w metabolizmie kwasu arachidonowego [21].



Rysunek 2. Przykładowa struktura przestrzenna ludzkiej peroksydazy glutationowej żołądkowo – jelitowej [22]

Figure 2. The exemplary spatial structure of human gastrointestinal glutathione peroxidase [22]

### 1.3. TEST S – TRANSFERAZY GLUTATIONOWEJ

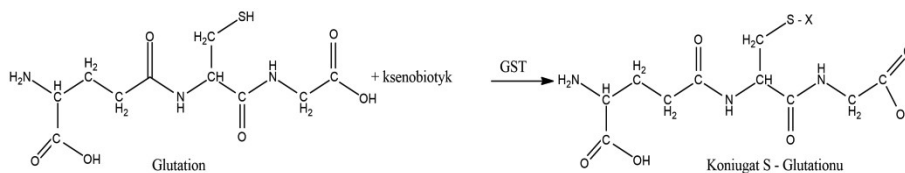
S – transferaza glutationowa występuje w postaci trzech form: cytozolowej, mikrosomalnej oraz mitochondrialnej. Pierwsze dwie występują naturalnie w organizmie człowieka. Do grupy cytozolowych enzymów GST należą następujące klasy: alfa (GSTA1, GSTA2) (Rys. 3), mi (GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM4 oraz GSTM5), omega (GSTO1), pi (GSTP1), sigma (GSTS1), teta (GSTT1, GSTT2) oraz zeta (GSTZ1) [23].



Rysunek 3. Struktura cytozolowej S-transferazy glutationowej GSTA1 w kompleksie z glutationem  
Figure 3. The structure of cytosolic glutathione S-transferase GSTA1 in the complex with glutathione

Formy cytozolowe GST odpowiedzialne są za metabolizm ksenobiotyków, natomiast mikrosomalne odpowiadają za metabolizm substancji endogennych. Klasa A enzymów GSTA wykazuje właściwości antyoksydacyjne, a niektóre z nich chronią mitochondria przed niebezpiecznymi produktami powstającymi w procesie peroksydacji lipidów.

S – transferazy glutationowe katalizują również reakcję sprzęgania między GST a związkami elektrofilowymi. Na rysunku 4 zamieszczono przykład reakcji pomiędzy glutationem a ksenobiotykiem, która zachodzi pod wpływem S – transferazy glutationowej.



Rysunek 4. Struktura przestrzenna dimeru CuZnSOD [26, 27]  
Figure 4. The spatial structure of the CuZnSOD dimer [26, 27]

GST katalizuje też detoksykację produktów wysoce reaktywnych, które powstają podczas występowania stresu oksydacyjnego. Uczestniczy również w usuwaniu kancerogenów, pestycydów i herbicydów [24, 25].

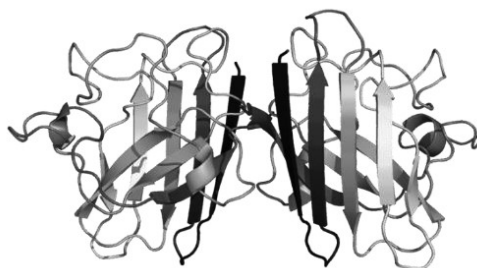


#### 1.4. METODA DYSMUTAZY PONADTLENKOWEJ

Pierwszym metaloenzymem jaki został odkryty była dysmutaza ponadtlenkowa. Wyróżniono trzy rodzaje izoform tego enzymu. Pierwszym z nich jest dysmutaza ponadtlenkowa miedziowo – cynkowa CuZnSOD (SOD1) (Rys. 5). Występuje ona głównie w cytozolu i jądrze komórkowym. Kontroluje ona wydzielanie tlenu azotu(II), głównie w naczyniach krwionośnych.

Druga z izoform w centrum aktywnym posiada jon manganu(III) i nazywana jest dysmutazą ponadtlenkową manganową, a jej skrót to MnSOD (SOD2). SOD2 występuje w macierzy mitochondrialnej i jest odpowiedzialna za rozkład RFT.

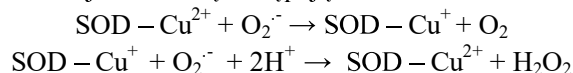
Ostatnią formą SOD jest zewnątrzkomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa (EC – SOD). Jest to główny enzym płynu stawowego, osocza oraz chłonki. Podobnie jak SOD1 posiada w swoim składzie jon miedzi(II) oraz jon cynku(II). Jej głównym zadaniem jest umożliwienie przeniknięcia tlenu azotu(II) przez ścianę naczyń. SOD2 uważana jest za najważniejszą izoformę zwalczającą powstające w organizmie reaktywne formy tlenu.



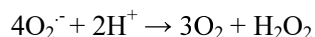
Rysunek 5. Struktura przestrzenna dimeru CuZnSOD [26, 27]  
Figure 5. The spatial structure of the CuZnSOD dimer [26, 27]

SOD katalizują reakcję dysmutacji rodnika  $O_2^{\cdot-}$  do  $H_2O_2$  oraz tlenu cząsteczkowego. Poniżej przedstawiono schematy tej reakcji dla każdej izoformy tego enzymu. W pierwszym etapie zachodzi redukcja jonów miedzi(II) do jonów miedzi(I) w centrum katalitycznym. W drugim etapie zachodzi jednoelektronowy proces utlenienia jonów miedzi(I) wraz z wytworzeniem nadtlenu wodoru.

W przypadku SOD1 reakcje zachodzą następująco:



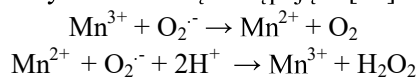
Po zbilansowaniu reakcji półkowych równanie reakcji przedstawia się następująco [28]:



Dysmutacja rodnika ponadtlenkowego za pomocą SOD2 przebiega podobnie jak w przypadku SOD1. Pierwszy etap to redukcja jonów manganu(III)

do jonów manganu(II) znajdujących się w centrum katalitycznym. Drugi etap to proces utlenienia Mn(II) do Mn(III) wraz z wytworzeniem nadtlenu wodoru.

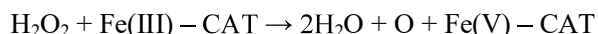
Reakcje z zastosowaniem enzymu SOD2 są następujące [29]:



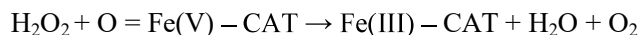
### 1.5. OZNACZANIA AKTYWNOŚCI KATALAZY

Katalaza to enzym posiadający w swojej budowie grupę hemową, która zawiera centralnie położony jon żelaza(III). W wyniku reakcji z nadtlentem wodoru powstaje kompleks Fe(V), który związany jest pięcioma wiązaniami koordynacyjnymi, gdzie cztery wiązania to połączenie z azotem z grupy hem a piąte wiązanie koordynacyjne Fe(V) tworzy z tyrozyną, która zajmuje 358 miejsce w łańcuchu polipeptydowym białka. Odpowiada on za rozkład nadtlenu wodoru do wody. Mechanizm ten przebiega dwuetapowo [30].

Etap I :



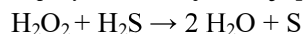
Etap II :



CAT - katalaza

Pierwszy etap mechanizmu polega na reakcji nadtlenu wodoru z Fe(III) – CAT dzięki czemu następuje redukcja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do wody oraz powstanie nowego kompleksu żelaza(V) – CAT [31-34]. W drugim etapie związek O = Fe(V) – CAT utlenia nadtlenek wodoru z utworzeniem wody i tlenu cząsteczkowego. Kompleks żelaza(V) powraca do stanu początkowego, gdzie żelazo w strukturze hemowej przyjmuje stopień utlenienia równy III [33, 35].

Katalaza jest enzymem, który w sposób skuteczny chroni organizm przed toksycznym działaniem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w środowisku, gdzie stężenie nadtlenu wodoru jest wyższe niż fizjologiczne, tworząc wodę i tlen. W przypadku, gdy stężenie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jest niskie (10<sup>-9</sup> – 10<sup>-7</sup> M), katalaza przyjmuje funkcję aktywności peroksydazowej. Wymaga to obecności odpowiednich donorów wodoru, pochodzących np. od metanolu. Następuje wtedy usunięcie toksycznego nadtlenu wodoru i jednoczesne utlenienie. Poniżej zamieszczono przykład takiej reakcji [36].



### 1.6. TEST AKTYWNOŚCI TRANSPEPTYDAZY $\gamma$ -GLUTAMYLOWEJ

Transpeptydaza  $\gamma$ -glutamylowa jest enzymem, który w sposób pośredni katalizuje reakcję utlenienia zredukowanej formy glutationu. Enzym ten bierze udział w metabolizmie ksenobiotyków oraz leukotrienu C<sub>4</sub> oraz utrzymuje

homeostazę cysteiny i glutationu. Zatem bierze on udział w antyoksydacji organizmu, leczeniu stanów zapalnych i detoksykacji.

Transpeptydaza  $\gamma$ -glutamylowa należy do glikoprotein znajdujących się we wszystkich komórkach ludzkich oprócz miocytów, który przenosi grupę  $\gamma$ -glutamylową.

Jedną z metod oznaczania aktywności przeciwutleniającej tego enzymu jest wykorzystanie odczynnika komercyjnego Gamma-glutamyl-transferazy (*Pointe Scientific*). Oznaczanie to polega na ocenieniu zdolności katalizowania reakcji przeniesienia grupy glutamylowej z L- $\gamma$ -glutamyl-3-karboksy-4-nitroanilidu na glicyloglicynę w wyniku czego powstaje anion 5-amino-2-nitrobenzoosanowy. W czasie trwania reakcji monitorowana absorbancja przyjmuje coraz wyższe wartości. Pomiar rejestruje się spektrofotometrycznie przy długości fali  $\lambda = 415$  nm, spisując wartości absorpcji w określonym, stałym odstępie czasu. Za pomocą prawa Lamberta – Beera oblicza się ilość moli powstałego fluorochromu w czasie 1 min 1 mg próbki [37].

$$A = \frac{\Delta Abs / \min \cdot V_c}{\varepsilon \cdot V_p \cdot L}$$

$\Delta Abs / \min$  [ $\text{min}^{-1}$ ] – zmiana absorbancji badanej próbki w czasie

$V_c$  [ml] – objętość całkowita mieszaniny reakcyjnej

$V_p$  [ml] – objętość próbki

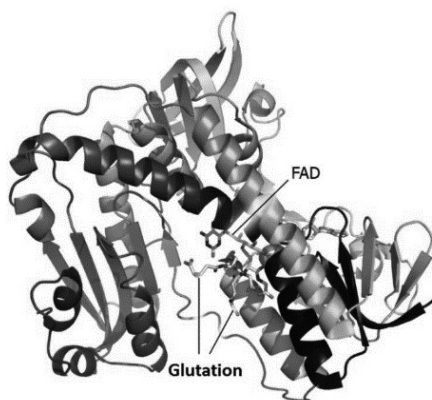
$\varepsilon$  [ $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ] – współczynnik absorbancji danego fluorochromu dla danej długości fali i drogi optycznej równej 1 cm

$L$  [cm] – długość drogi optycznej w danych warunkach

### 1.7. TEST REDUKTAZY GLUTATIONOWEJ

Reduktaza glutationowa (Gr) to enzym należący do oksydoreduktaz. Struktura przestrzenna reduktazy glutationowej została przedstawiona na rysunku 6. Występuje on w mitochondriach oraz cytozolu. Enzym ten ma za zadanie utrzymać odpowiednie stężenie glutationu w komórkach. Spełnia to zadanie dzięki swoim zdolnościom do przekształcania formy utlenionej glutationu w formę zredukowaną [13].

Gr działa wspólnie z GPx dostarczając jej GSH w wyniku utleniania NADPH do  $\text{NADP}^+$  [38].



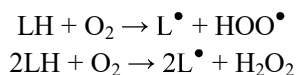
Rysunek 6. Struktura przestrzenna reduktazy glutationowej [39]  
 Figure 6. The spatial structure of glutathione reductase [39]

Aktywność antyoksydacyjną reduktazy glutationowej oznacza się za pomocą testu *Glutathione Reductase Assay Kit* firmy ABCAM. Metoda ta polega na redukcji GSSH do GSH, który reagując z kwasem 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoesowym (DTNB – odczynnik Elmanna) daje fluorescencyjny produkt TNB (kwas tionitrobenzoesowy). Przyrost absorbancji monitoruje się spektrofotometrycznie przy długości fali 415 nm. Aktywność GR oznacza się jako ilość moli powstałego TNB w czasie 1 minuty przypadającą na 1g badanej próbki [40].

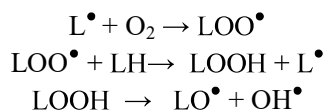
### 1.8. METODA PEROKSYDACJI LIPIDÓW

Peroksydacja lipidów jest to utlenienie wielonienasyconych reszt kwasów tłuszczowych zawartych w fosfolipidach. Proces ten zachodzi zgodnie z mechanizmem wolnorodnikowym z utworzeniem nadtlenków. Jest to mechanizm trój etapowy [41].

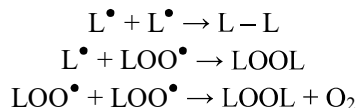
I etap – inicjacja



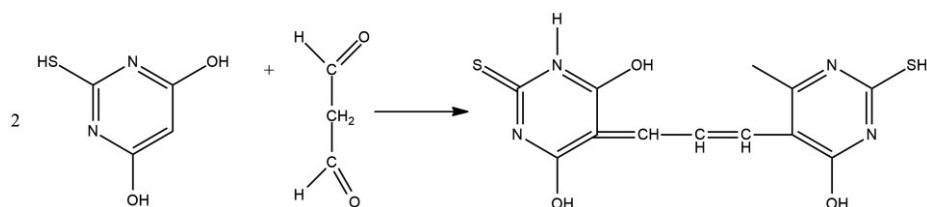
II etap - prolongacja



## III etap – terminacja



Stężenie peroksydacji lipidów określa się za pomocą stężenia aldehydu dimalonowego (MDA), który jest produktem reakcji rozkładu hydroperoksykwasów tłuszczowych. Oznaczenie polega na reakcji MDA z TBA (kwas tiobarbiturowy), w wyniku której powstaje barwny produkt, który oznacza się ilościowo metodą spektrofotometryczną (Rys. 7). W metodzie tej pomiary przeprowadzane są przy długości fali równej 532 nm [42].



Rysunek 7. Reakcja kwasu dimalonowego z kwasem tiobarbiturowym [43]

Figure 7. The reaction of dimalononic acid with thiobarbituric acid [43]

## 1.9. TEST LPIC

Test LPIC pozwala określić zdolność inhibicji lipidów. Z jego pomocą można oznaczyć możliwości antyutleniające produktów, które powstają podczas peroksydacji lipidów frakcji LDL –zawierającej cholesterol oraz kwas linolowy, dzięki antyutleniaczom zawartym w próbce. Najczęściej stosowaną metodą do kontrolowania reakcji utlenienia jest spektrofotometria. Reakcja monitorowana jest przy  $\lambda = 234$  nm. Podczas zmian wartości absorpcji wyróżnia się trzy etapy zachodzącej reakcji: inicjacji, prolongacji oraz terminacji. W pierwszym etapie badanej reakcji przeciwutleniacze zapobiegają utlenieniu kwasu linolowego lub wielonienasyconych kwasów tłuszczowych frakcji LDL. Trwa to do czasu całkowitego przereagowania antyoksydantów. Następnie reakcja przechodzi do fazy propagacji. Innymi metodami monitorowania jest chromatografia cieczowa bądź gazowa [44].

## UWAGI KOŃCOWE

W niniejszym artykule opisano wiele metod *in-vivo* badania właściwości antyoksydacyjnych. Do badania właściwości przeciwutleniających stosują metody *in-vivo* w układach naśladujących warunki panujące w organizmie stosuje się mikrosomy oraz liposomy. Jest to możliwe dzięki podobieństwu tych struktur do błon biologicznych. Często w metodach *in-vivo* stosuje się pomiar zahamowania utleniania LDL poddając analizie krew zwierząt laboratoryjnych. Tego typu metoda jest też stosowana w badaniach prowadzonych na organizmie ludzkim po doustnym podaniu polifenoli.

Wśród metod *in-vivo* badania aktywności przeciwutleniającej często zdarza się tak, że dana metoda jest stosowana w wielu wariantach pomiarowych. Różne warunki pomiarowe sprawiają, że nie można porównać wyników badań przeprowadzonych tą samą metodą. Nie można też wyszczególnić jednej metody *in-vivo* badania właściwości antyoksydacyjnych jako najlepszej o jak najmniejszym błędzie pomiarowym.

W dalszym ciągu wiele metod pomiarowych *in-vivo* wymaga dopracowania pod kątem uwzględnienia licznych czynników wpływających na wynik pomiaru. Z tego względu uzasadnione jest prowadzenie dalszych badań nad udoskonaleniem metod *in-vivo* badania potencjału przeciwutleniającego.

## PODZIĘKOWANIA

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

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] R.L. Prior, H. Hoang, L. Gu, X. Wu, M. Bacchiocca, L. Howard, M. Hampsch-Woodill, D. Huang, B. Ou, R. Jacob, Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples, *J. Sci. Food Agr.*, 2003, **51**, 3273.
- [2] A. Moure, J.M. Cruz, D. Franco, J. M. Dominguez, J. Siniero, M.J. Nunez, J.C. Parajo, Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.*, 2001, **72**, 45.
- [3] E. Niki, Antioxidant activity: Are we measuring it correctly? *Nutrition*, 2002, **18**, 524.
- [4] A. Meister, On the discovery of glutathione. *Trends Biochem. Sci.*, 1988, **13**, 185.
- [5] A. Slivka, M.B. Spina, G. Cohen, Reduced and oxidized glutathione in human and monkey brain, *Neurosci. Lett.*, 1987, **74**, 112.
- [6] A.J. Cooper, B.S. Kristal, Multiple roles of glutathione in the central nervous system, *Biol. Chem.*, 1997, **378**, 793.
- [7] C.L. Hammond, T.K. Lee, N. Ballatori, Novel roles for glutathione in gene expression, cell death, and membrane transport of organic solutes. *J. Hepatol.*, 2001, **34**, 946.

- [8] F.Q. Schafer, G.R. Buettner, Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple, *Free Radic. Biol. Med.*, 2001, **30**, 1191.
- [9] J.S. Bains, C.A. Shaw, Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death, *Brain Res.*, 1997, **25**, 335.
- [10] R.M. Clancy, D. Levartovsky, J. Leszczynska-Piziak, J.A. Yegudin, Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediary, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994, **91**, 3680.
- [11] T. Koppal, J. Drake, S. Yatin, B. Jordan, S. Varadarajan, L. Bettenhausen, D. A. Butterfield, Peroxynitrite-induced alterations in synaptosomal membrane proteins: insight into oxidative stress in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, 1999, **72**, 310.
- [12] C.C. Winterbourn, D. Metodiewa, The reaction of superoxide with reduced glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1994, **314**, 284.
- [13] P. Klatt, S. Lamas, Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress, *Eur. J. Biochem.*, 2000, **267**, 4928.
- [14] M. Deponce, Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, **1830**, 3217.
- [15] V. Ducros, A. Favier, Selenium metabolism. *EMC Endocrinol, Nutr.*, 2004, **1**, 19.
- [16] Y. Mehdi, J. L. Hornick., L. Istasse, I. Dufrasne, Selenium in the environment. metabolism and involvement in body functions. *Molecules*, 2013, **18**, 3292.
- [17] T. Wielkoszczyński, M. Zawadzki, A. Lebek-Ordon, J. Olek, I. Korzonek-Szlacheta, Enzymatyczne układy antyoksydacyjne – właściwości, występowanie i rola biologiczna. *Diag. Lab.*, 2007, **43**, 283.
- [18] B. Lloyd, E. Robson, I. Smith, B.E. Clayton, Blood selenium concentrations and glutathione peroxidase activity. *Arch. Dis. Childh.*, 1989, **64**, 352.
- [19] S. Herbette, P. Roeckel-Drevet, J. R. Drevet, Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *FEBS J.*, 2007, **274**, 2163.
- [20] M. Almar, L. Otero, C. Santos, J. Gallego González, Liver glutathione content and glutathione-dependent enzymes of two species of freshwater fish as bioindicators of chemical pollution. *J. Environ. Sci. Health.*, 1998, **33**, 769.
- [21] D. Armstrong, *Free Radicals in Diagnostic Medicine: A Systems Approach to Laboratory Technology, Clinical Correlations, and Antioxidant Therapy*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [22] M. Mari, A. Morales, A. Colell, C. García-Ruiz, J.C. Fernández-Checa, Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid. Redox Signal.*, 2009, **11**, 2685.
- [23] <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2F8A> (dostępny w internecie 05.11.2018).
- [24] A.J. Oakley, Glutathione transferases: new functions, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2005, **15**, 716.
- [25] V. Krajka-Kuźniak, Indukcja enzymów II fazy jako strategia chemioprewencji nowotworów i innych schorzeń degeneracyjnych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007, **61**, 627.
- [26] E.P. Gallagher, J.L. Gardner, D.S. Barber, Several glutathione S-transferase isozymes that protect against injury are expressed in human liver mitochondria. *Biochem. Pharmacol.*, 2006., **71**, 1619.
- [27] F. M. Faraci, S. P. Didion, Vascular protection superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, 2004, **24**, 1367.
- [28] M. Woźniak, M. Czyż, Mimetyki dysmutazy ponadtlenkowej – potencjalne zastosowania kliniczne. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2008, **62**, 613.
- [29] B.H.J. Bielski, D.E. Cabelli, R.L. Arudi, A.B. Ross, Reactivity of HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub><sup>-</sup> radicals in aqueous solution, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 1985, **14**, 1041.

- [30] D.W. Christianson, Structural chemistry and biology of manganese metalloenzymes, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 1997, **67**, 217.
- [31] D. Ścibior, H. Czeczot, Katalaza – budowa, właściwości, funkcje. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2006, **60**, 170–180.
- [32] E.M. Boon, A. Downs, D. Marcey, Catalase: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidoreductase, *Reviews on structure and function of catalases*, In: *Biomolecules at Kenyon*, 1997.
- [33] B. Chance, H. Sies, A. Boveris, Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, 1979, **59**, 527.
- [34] S.G. Kalko, J.L. Gelpi, I. Fita, M. Orozco, Theoretical study of the mechanisms of substrate recognition by catalase. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 9665.
- [35] M.E. Percy, Catalase: an old enzyme with a new role? *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, 1984, **62**, 1006.
- [36] P. Chelikani, X. Carpena, I. Fita, P. C. Loewen, An electrical potential in the access channel of catalases enhances catalysis. *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 31290.
- [37] M. Sokołowska, L. Włodek, Dobre i złe strony tlenu azotu. *Folia Cardiol.*, 2001, **8**, 467.
- [38] H. Zhang, H.J. Forman, J. Choi,  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase in glutathione Biosynthesis. *Meth. Enzymol.*, 2005, **401**, 468.
- [39] M. Czarna, M. Jarmuszkiewicz, Rola mitochondriów w wytwarzaniu i usuwaniu reaktywnych form tlenu; związek z przesyłaniem sygnałów i programowaną śmiercią komórki. *Post Biochem.*, 2006, **52**, 145.
- [40] [https://commons.wikimedia.org/wiki/Molecular\\_and\\_Cellular\\_Biology#/media/File:Glutathione\\_reductase.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/Molecular_and_Cellular_Biology#/media/File:Glutathione_reductase.png). [dostępny w internecie: 05.11.2018]
- [41] [https://www.abcam.com/ps/products/83/ab83461/documents/ab83461%20Glutathione%20Reductase%20GR%20Assay%20Kit%20Protocol%20v5%20\(website\).pdf](https://www.abcam.com/ps/products/83/ab83461/documents/ab83461%20Glutathione%20Reductase%20GR%20Assay%20Kit%20Protocol%20v5%20(website).pdf) [dostępny w internecie: 05.11.2018]
- [42] J.M. Gutteridge, B. Halliwell, The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems, *Trends Biochem. Sci.*, 1990, **15**, 129.
- [43] G. Bartosz, *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2013.
- [44] W. Grajek, *Przeciwutleniacze w żywności*, Warszawa, 2007.

Praca wpłynęła do Redakcji 29 marca 2019 r.