

**Bronisław K. GŁÓD¹, Paweł PISZCZ¹, Iwona KIERSZTYN¹,
Anna LAMERT¹, Paweł ZARZYCKI²**

¹⁾ Zakład Chemii Analitycznej, Instytut Chemii, Akademia Podlaska
ul. 3 Maja 54, 08-110 Siedlce

e-mail: bkq@onet.eu; URL: <http://dach.ich.ap.siedlce.pl>

²⁾ Zakład Toksykologii i Bioanalitiky, Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska,
Politechnika Koszalińska, ul. Śniadeckich 2, 75-453 Koszalin

ZASTOSOWANIE HPLC DO OZNACZANIA WOLNYCH RODNIKÓW, ANTYOKSYDANTÓW ORAZ CAŁKOWITEGO POTENCJAŁU ANTYOKSYDACYJNEGO

W pracy przedstawiono podstawowe informacje o wolnych rodnikach, ich wytwarzanie, oddziaływanie z podstawowymi składnikami organizmów żywych, udział w wielu stanach chorobowych, a także starzeniu organizmu. Ponadto omówiono metody oznaczania wolnych rodników, antyoksydantów oraz całkowitego potencjału antyoksydacyjnego za pomocą HPLC.

INFORMACJE PODSTAWOWE

Tlen jest pierwiastkiem bardzo rozpowszechnionym na Ziemi. Odpowiada za mniej więcej jedną czwartą jej masy. W dolnych warstwach atmosfery objętościowa zawartość tlenu wynosi 21%. Pierwotna atmosfera ziemska była mieszaniną gazów o właściwościach redukujących. Wolny tlen w postaci cząsteczkowej pojawił się w niej wraz z rozwojem pierwszych organizmów fotosyntezujących, ok. 2 miliardów lat temu. Rozpuszczając się w wodzie był on niezbędnym czynnikiem powstania i rozwoju organizmów wyższych. Znacznie wyższa niż w wodzie jest jego rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych, co wpływa na lokalizację rodników tlenowych w hydrofobowych częściach błon biologicznych. W organizmach aerobowych znaczna część pobieranego tlenu wykorzystywana jest jako akceptor elektronów. Takie enzymy jak dioksygenaza tryptofanowa i oksydaza ksantynowa katalizują reakcje utleniania polegające na przenoszeniu pojedynczych elektronów z substratów na cząsteczkę tlenu. W trakcie redukcji tlenu wytwarzane są tzw. *reaktywne formy tlenu* (ang. ROS - reactive oxygen species). Jest to pojecie szersze, gdyż oprócz wolnych rodników zalicza się do nich m.in. wzbudzony tlen singletowy i nadtlenek wodoru. Wolne rodniki zaś są to atomy, cząsteczki (lub ich fragmenty) bądź też jony posiadające niesparowane elektrony, nadające im własności paramagnetyczne.

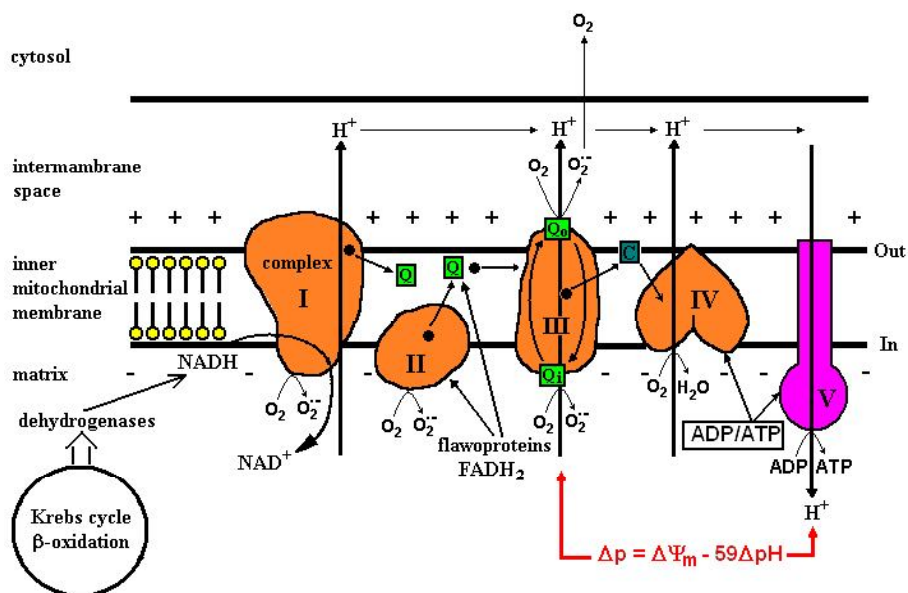
Tlen, chociaż jest konieczny do życia, paradoksalnie ma on jednocześnie działanie toksyczne dla organizmów żywych [1, 2]. Przykładowo, oddychanie czystym tlenem przez dłużej niż 48 godzin prowadzi do śmierci. Olbrzymia jego większość wykorzystywana jest jako akceptor elektronów w komórkowych procesach energetycznych. Tym niemniej, w trakcie redukcji, niewielka część tlenu przekształcana jest w reaktywne formy tlenu, do których zalicza się również rodniki tlenowe. Ocenia się, że do ROS przekształcane jest 1÷4% tlenu zużywanego przez organizm człowieka [3]. Przy dziennym jego zużyciu wynoszącym ok. 10 l oznacza to wytworzenie ok. 4,5÷18 mmoli rodników. Jest to ilość znaczna, zwłaszcza, jeśli uwzględnimy fakt, że wiele uszkodzeń wolnorodnikowych ma tendencję do gromadzenia się w organizmach żywych. W żywym organizmie wolne rodniki są wytwarzane w warunkach zarówno fizjologicznych jak i patologicznych. W warunkach fizjologicznych nie gromadzą się w tkankach gdyż są stale unieczynniane, „zmiatane” przez miejscowe mechanizmy antyoksydacyjne. W patologicznych mogą prowadzić do degeneracji i obumierania komórek [1].

Kolejnym paradoksem tlenowym jest fakt, że chociaż obecnie powszechnie wiadomo, że tlen w nadmiarze jest szkodliwy to jednakże nie ma spójnej teorii tłumaczącej, który z rodników jest za tę toksyczność odpowiedzialny [2]. Wspomniany, paradoks tlenowy na tym się nie kończy. Okazało się, że niektóre wolne rodniki pełnią istotne funkcje fizjologiczne, np. inhibitorów niektórych enzymów [4]. Do tego można dodać dalsze paradoksy. Niejasny jest wpływ rodników na przebieg niektórych zmian patologicznych, jak miażdżyca [5] czy choroby Alzheimera [6]. Często występują nawet kłopoty z odpowiedzią na pytanie czy rodniki są przyczyną czy skutkiem owych zmian. Jeszcze większe problemy sprawia odpowiedź na pytanie czy podawanie antyoksydantów zapobiega tym zmianom [7, 8]. Wynika z tego, że choć jest to tematyka bardzo szeroko ostatnio dyskutowana to jej podstawowe problemy są wciąż nierozwiązane.

WYTWARZANIE RODNIKÓW

Występowanie reaktywnych form tlenu jest charakterystyczne nie tylko dla organizmów żywych. W warstwach przy powierzchniowych naturalnych zbiorników wodnych ich stężenie jest znacznie większe niż we wnętrzu organizmów żywych, gdzie mogą się przedostawać. Najprostszym zaś rodnikiem (dokładnie – birodnikiem w stanie trypletowym) jest tlen atmosferyczny którym oddychamy.

Wolne rodniki mogą być indukowane *in vitro* i *in vivo* przez różne czynniki: promieniowanie jonizujące, ultrafioletowe, widzialne i podczerwone oraz wszelkie reakcje utleniania i redukcji. Do reakcji tych zaliczyć można autooksydację tioli, katecholamin, flawin i hydrochinonów oraz niektóre reakcje enzymatyczne, np. oksydazy ksantynowej, dysmutazy ponadtlenkowej stymulującej mitochondrialny system transportu elektronów, oksydazy cytochromowej P-450 i b-5 systemu mikrosomalnego.

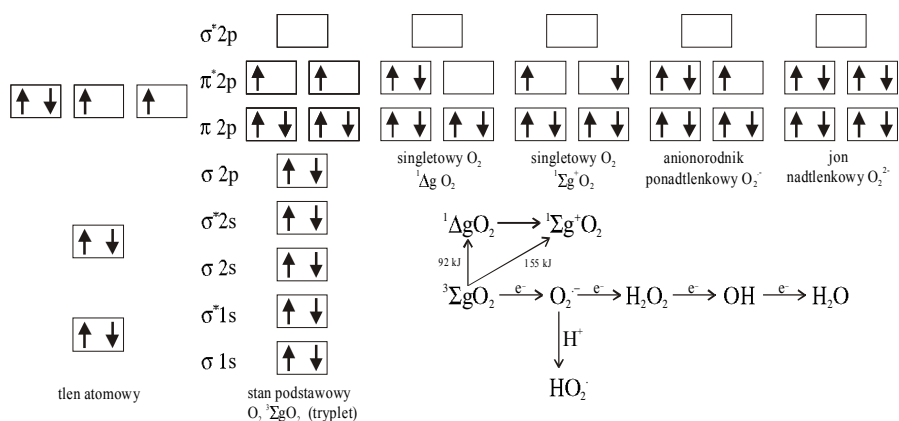


Rys. 1. Schemat transportu elektronów, tworzenia ATP oraz utlenianie zredukowanego koenzymu Q wraz z towarzyszącą mu redukcją cytochromu b

Rodniki mogą również generować pobudzone komórki fagocytujące (makrofagi, monocyty i granulocyty) podczas tzw. wybuchu oddechowego. W tym przypadku odgrywają one pozytywną rolę. Jednakże długotrwałe ich wytwarzanie (np. w przewlekłych stanach zapalnych) ma działanie kancerogenne. W błonach komórkowych tworzą się one głównie w wyniku metabolizmu kwasu arachidonowego przy udziale cyklooksygenazy i lipooksygenazy. Z czynników zewnętrznych wymienić można przykładowo fenacytynę czy też parakwat oraz cały szereg leków (haloperidol, salsolinol, cytostatyki itp.). Najważniejszym generatorem wolnych rodników wydaje się być mitochondrialny łańcuch oddechowy (rys. 1). Należy sobie również zdać sprawę z tego, że w komórkach żywych zwierząt i roślin wolne rodniki są stale obecne jako konieczny etap przejściowy przebiegu szeregu reakcji.

TLEN I PRODUKTY JEGO REDUKCJI

Cząsteczki o spinach połówkowych opisuje statystyka Fermiego-Diraca. Zgodnie z funkcją rozkładu prawdopodobieństwo występowania elektronu (fermionu) wzrasta ze spadkiem energii nie przekraczając 1. To znaczy, że w danym stanie energetycznym określonym energią, pędem oraz spinem może znajdować się tylko jeden elektron. Rozkład elektronów w cząsteczce tlenu i produktach jego redukcji przedstawiono na rys. 2. W stanie podstawowym tlen występuje jako dwurodnik trypletowy, co tłumaczy jego względnie dużą reaktywność ale jednocześnie stosunkowo małą, jak na rodnik.

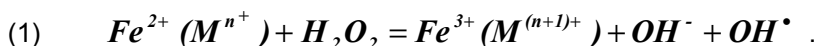


Rys. 2. Rozkład elektronów na orbitalach tlenu i produktach jego redukcji.
 - orbital molekularny, * - orbitale antywiążące, $\uparrow\downarrow$ - spiny elektronowe

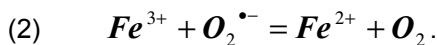
W stanie wzbudzonego tlenu występuje w postaci singletu. Jego stężenie w cytoplazmie jest na poziomie $10^{-15}M$, podczas gdy tlenu trypletowego $10^{-5}M$. Wyróżniamy dwa stany singletowe - delta i sigma. Czas życia tlenu w stanie $^1\Sigma_g^+O_2$ (antyrownoległe spiny na różnych orbitalach) w roztworach wodnych wynosi 10^{-11} s, zaś tlenu delta $^1\Delta_gO_2$ - 10^{-6} s. W gazach czasy te wynoszą odpowiednio 12 s i 45 min.

Pierwszym produktem redukcji tlenu jest anionorodnik nadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$) i jego zprotonowana forma - rodnik nadhydroksylowy (HO_2^{\cdot}). W roku 1954 Gershman, Gilbert i Fridovich wysunęli hipotezę, że za toksyczność tlenu odpowiedzialny jest właśnie anionorodnik nadtlenkowy. Niestety, okazało się, że jest on wprawdzie bardzo reaktywny ale jednocześnie krótko-żyjący oraz mało reaktywny w środowisku aprotycznym i w stosunku do aminokwasów i kwasów tłuszczowych. Rodnik nadhydroksylowy jest znacznie silniejszym utleniaczem niż anionorodnik nadtlenkowy. Sugeruje się nawet [9], że za szkodliwe działanie tlenu i uszkodzenie błon komórkowych odpowiedzialny jest układ rodników $O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}$, a nie rodnik hydroksylowy. HO_2^{\cdot} charakteryzuje się długim czasem życia przez co może dyfundować on do sąsiednich struktur komórkowych. Przy pH fizjologicznym 7,4 ok. 1% anionorodnika występuje w postaci zhydratowanej ($pK_a = 4,88$). W wyniku przebiegu reakcji dysmutacji oba te rodniki wytwarzają nadtlenek wodoru.

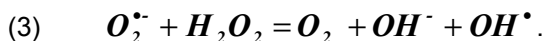
W obecności jonów metali grup przejściowych (żelaza i miedzi) nadtlenek wodoru ulega rozpadowi z wytworzeniem reaktywnego rodnika hydroksylowego, zgodnie z reakcją opisaną po raz pierwszy w roku 1884 przez Fentona:



Utleniony metal może zostać następnie zredukowany, co oznacza, że pełni on rolę katalizatora:



W sumie obie reakcje przedstawia się jako reakcję Habera-Weissa (1934 r.):



Bez katalizatora (jonów metali) reakcja (3) przebiega bardzo wolno. Znacznie przyspiesza ją niewielka nawet obecność żelaza na plus drugim stopniu utlenienia. Żelazo trójwartościowe również może ją katalizować gdyż jest ono łatwo redukowalne w organizmie, np. w obecności kwasu askorbinowego, cysteiny lub glutationu. Przyspieszają ją również niektóre kompleksy (EDTA, cytrynian). Kompleksy te mogą przyspieszać jego utlenianie gdyż eliminują konieczność zmiany jego powłoki hydratacyjnej. W świetle powyższego problematyczne jest podawanie żelaza w postaci kompleksu z askorbinianem i EDTA, stosowane przez niektóre firmy farmaceutyczne.

Powstały w reakcjach (1 - 3) rodnik hydroksylowy jest wyjątkowo reaktywny. Wchodzi on w reakcje z wieloma związkami organicznymi (addycja, substytucja wolnorodnikowa, przenoszenie elektronów). Rodnik ten jest bardzo słabym kwasem, uwalniając alkaliczny jon nadtlenny $O_2^{\bullet-}$. Jego stała dysocjacji porównywalna jest ze stałą nadtlenu wodoru i wynosi 11,85. Nie penetruje on jednak komórki. Reaguje tylko z cząsteczkami obecnymi w bezpośrednim ich sąsiedztwie, np. z jonem węglanowym tworząc rodnik węglanowy będący silnym reduktorem.

Bardzo intensywnie badanym ostatnio rodnikiem jest tlenek azotu. Jest to związek wyjątkowo ciekawy gdyż, z jednej strony, jest on poszukiwanym od dawna śródłonkowym czynnikiem rozluźniającym (ang. EDRF - endothelial derived relaxing factor), neurotransmiterem i zmiataczem wolnych rodników (przez to związkiem antykancerogennym). Z drugiej strony, będąc sam wolnym rodnikiem, jest on również neurotoksyczny, kancerogenny i może wytwarzać inne wolne rodniki.

Tlenek azotu jest zmiataczem anionorodnika ponadtlenkowego, a w szczególności skutecznym (silniejszym niż witamina E) przeciw utleniaczem lipidów. Co ciekawe, po przejściu do nadtlenuazotynu z przeciwutleniacza staje się on silnym utleniaczem. Nadtlenuazotyn utlenia grupy tiolowe reszt tryptofanowych i metionylowych w białkach (powoduje to ich fragmentację), indukuje powstawanie grup karbonylowych, nitruje reszty tyrozylowe, utlenia kwasy nukleinowe i lipidy. Te oddziaływania z biologicznie czynnymi związkami mają aspekt pozytywny, mianowicie – antykancerogenny, chociaż mechanizm jego działania jest nieznan. Związany jest on m.in. z blokadą reduktazy rybonukleinowej, co uniemożliwia wytwarzanie DNA i podział komórek nowotworowych. Z drugiej strony nitrozuje on aminy drugorzędowe do toksycznych, rakotwórczych N-nitrozoamin. Tlenek azotu oddziałuje również z centrami Fe-S różnych białek tworząc klastery nitrozylowe. Jest on inhibitorem enzymów mitochondrialnych, akonitazy i kompleksu I (NADPH - oksydorektaza ubichinowa).

Rozpuszczalność tlenu azotu w wodzie wynosi $1,8 \cdot 10^{-3}$ M, a stężenie w komórce jest rzędu $3 \cdot 10^{-6}$ M, okres półtrwania w wodzie od 4 min do 3 godzin, we krwi 0,1 sek., a w tkankach 3 - 30 sek. W komórce wytwarzany jest podczas utleniania (w obecności NADPH jako donora elektronów) przez syntazę tlenu azotu (NOS), zależną od cytochromu P-450, argininy do cytruliny i NO. Jest on następnie szybko degradowany z powodu reakcji z tlenem, dwutlenkiem azotu i anionorodnikiem ponadtlenkowym. Zmiatając anionorodnik wytwarza anion peroksyazotawy, będący silnym utleniaczem i rozpadającym się na dwa rodniki, hydroksylowy i dwutlenek azotu. Wytwarzają one z małą szybkością azotany i azotyny.

Cytotoksyczność tlenu azotu wywołują anion peroksyazotawy i powstający z jego rozpadu rodnik hydroksylowy. Oddziałują one m.in. z lipidami, DNA i wpływają na mitochondrialne kanały wapniowe (oddziaływanie na kompleksy żelaza w błonie mitochondrialnej). Uszkodzenia DNA aktywują poli(ADP-rybozo)polimerazę, PARP. Enzym ten odpowiedzialny jest za energetyczną śmierć komórki poprzez zużywanie ATP podczas naprawy uszkodzonego DNA. Jego nadprodukcja jest przyczyną śmierci neuronów podczas zawałów naczyniowych, w chorobie Huntingtona i Alzheimera.

NO jest też neurotransmiterem w obwodowym układzie nerwowym (sercowo-naczyniowym, płciowo-moczowym, oddechowym i trawiennym). Przykładowo, kontroluje on rozkurcz mięśni jelit podczas ruchów perystaltycznych i rozkurcz mięśni ciał jamistych ułatwiających napływ krwi do prącia podczas erekcji oraz rozkurcz mięśni naczyń krwionośnych. To ostatnie powoduje spadek ciśnienia krwi. Dlatego chorym na serce podawana jest nitrogliceryna, metabolizowana w organizmie do NO. eNOS z komórek śródbłonna aktywowany jest przez kompleks Ca^{2+} -kalmodulina, tworzący się po wnikięciu jonów wapnia do wnętrza komórki. Otwarcie kanałów jonowych następuje po związaniu przez receptory powierzchniowe np. acetylocholinę. NO dyfunduje do wnętrza naczynia krwionośnego i jako czynnik EDRF do komórek mięśni gładkich. Uaktywnia cyklazę guanylową, cGMP, fosforylację protein transportujących jony wapnia (spadek ich stężenia) przez kinazę białkową, co prowadzi do rozkurczu. Podobny efekt dają S-nitrozo, $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]^{2-}$, $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{NO})_7]^-$, organiczne azotyny i azotany, np. nitrogliceryna.

WPŁYW WOLNYCH RODNIKÓW NA PODSTAWOWE SKŁADNIKI KOMÓREK

Wolne rodniki reagują w zasadzie ze wszystkimi składnikami komórek. Największe uszkodzenia powodują w lipidach, białkach i DNA. Z organelli komórkowych najbardziej narażone na atak wolnych rodników są mitochondria. Ich uszkodzenie prowadzić może nawet do śmierci komórek.

Należy w tym miejscu zaznaczyć, że mimo ich negatywnego wpływu na organizmy żywe, wolne rodniki są koniecznymi etapami przejściowymi przebiegu szeregu reakcji biochemicznych, jak też mają szereg działań pozytywnych. Przykładowo wspomnieć tu można o tym, że szereg enzymów

reperujących DNA (polimerazy) aktywowanych jest wolnymi rodnikami, często indukowanych światłem. Rodniki umożliwiają również spełnianie funkcji biologicznych cyklicznie guanylnowej (receptor NO aktywujący cGMP, PKG i fosforylujący NOS), oksydazie glukozy, S-transferazie glutationu. Wolne rodniki są również stosowane w terapii nowotworów – tlenek azotu oraz wytwarzane przez promieniowanie rodniki hydroksylowe. Duże ilości wolnych rodników wytwarzają również pobudzone komórki fagocytujące (granulocyty, monocyty i makrofagi) w trakcie tzw. – *wybuchu oddechowego*.

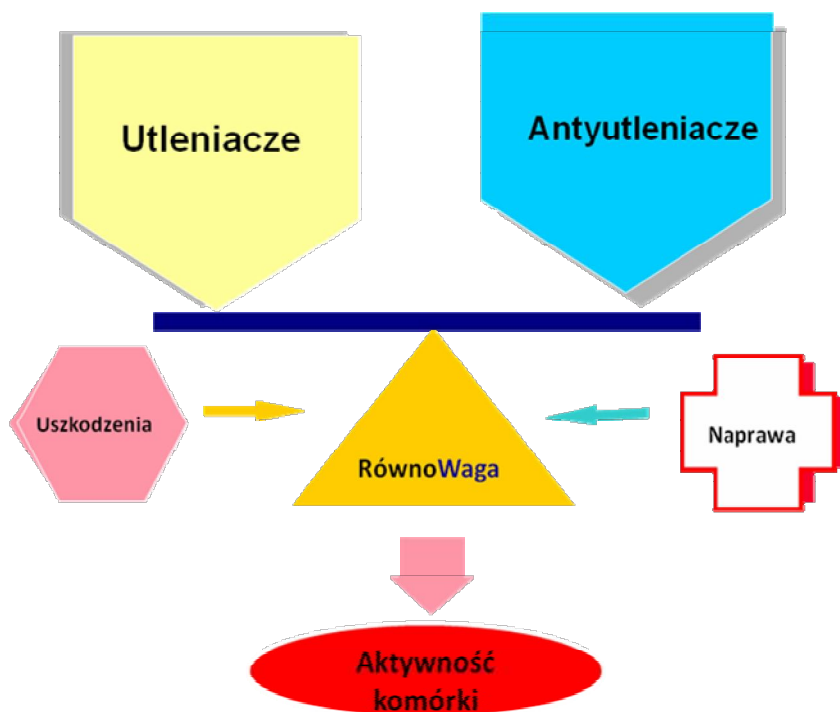
Wyjątkowo aktywnym organem, zużywającym ponad 20% dostarczanego organizmowi tlenu, jest mózg. Jest on również szczególnie narażony na uszkodzenia wolnorodnikowe gdyż w dużym stężeniu występują w nim wielonienasycone kwasy (PUFA) i żelazo, a w małym - antyutleniacze. Ma on ponadto małe możliwości wiązania metali i nie posiada możliwości regeneracji neuronów. Ich nadmierne stężenie wpływa na starzenie się mózgu, jest przejawem choroby Alzheimer'a i syndromu Downa.

Wolne rodniki odgrywają też ważną rolę w wielu teoriach procesu starzenia. Sam proces starzenia nie jest obecnie dokładnie poznany. Prawdopodobnie starzenie się związane jest w jakiś sposób ze zmianami genetycznymi. Nawet nieśmiertelne organizmy musiały umierać z przyczyn losowych. Dlatego nie przekazywały one swojemu potomstwu cech umożliwiających zwalczanie chorób starczych. 2 000 lat temu przewidywana długość życia człowieka wynosiła 19 lat. Oznacza to, że geny które byłyby korzystne w wieku 50 lat nie były wówczas przekazywane. Chociaż więc starzenie nie jest korzystne z punktu widzenia poszczególnej jednostki to nie było ewolucyjnego nacisku jeżeli tylko nieliczne jednostki dożywały wieku sędziwego. Jak wiadomo wolne rodniki oddziałują z DNA. Trudno jest jednakże jednoznacznie stwierdzić ich wpływ na rozwój ewolucyjny. Wraz z rozwojem, „program” genetyczny coraz to bardziej komplikował się, a przez to był bardziej narażony na uszkodzenia. Tym można wytłumaczyć dlaczego znane są nieśmiertelne organizmy jednokomórkowe, a nie np. ludzie. W latach pięćdziesiątych L. Hayflick i P. Moorhead wysunęli koncepcję o ograniczonej liczbie podziałów komórki diploidalnej i występowaniu tzw. *limitu Hayflicka*. Zauważono w tym przypadku ścisłą korelację między oczekiwaną długością życia różnych organizmów, a ich limitem Hayflicka. Tę teorię jest wyjątkowo trudno połączyć z wolno-rodnikową teorią starzenia. Ostatnio sugeruje się jednakże, że limit Hayflicka zależy również od środowiska w którym przebywa komórka. Mogłoby to oznaczać udział wolnych rodników w starzeniu, tym bardziej, że zaobserwowano, że komórki pochodzące od organizmów dług żyjących są bardziej odporne na ich ataki. Faktycznie udało się wydłużyć długość życia nicieni poprzez zamianę jednego z genów zwiększającą jego funkcje anty-oksydacyjne.

ZMIATACZE WOLNYCH RODNIKÓW I ANTYUTLENIACZE

Organizmy żywe w trakcie ewolucji wytworzyły szereg mechanizmów zapobiegających lub naprawiających uszkodzenia powstałe wskutek działa-

nia wolnych rodników. Dlatego nie gromadzą się one w tkankach gdyż są stale unieczynniane, „zmiatane” przez miejscowe mechanizmy antyoksydacyjne. Bardzo często stanowią one niedostateczną ochronę i co więcej, ich efektywność maleje z wiekiem. Generalnie można je podzielić na systemy naprawcze białek, lipidów i DNA oraz antyutleniacze enzymatyczne lub nieenzymatyczne, jak to zostało zestawione poniżej.



Rys. 3. Równowaga oksydacyjna

1. Systemy naprawcze
 - 1.1. Naprawa białek - proteiny (odcinają utlenione białka), proteazy (tną produkty aktywności proteinaz), peptazy (tną produkty aktywności proteaz na aminokwasy).
 - 1.2. Naprawa lipidów - fosfolipazy (usuwiają utleniane fragmenty lipidów z błon), acetylotransferazy (wymieniają kwasy tłuszczowe oddzielone od lipidów), peroksydaza glutationowa i transferaza (wspomagają naprawę utlenionych kwasów tłuszczowych).
 - 1.3. Naprawa DNA - egzo- i endonukleazy (usuwiają zniszczone fragmenty DNA), glikozylazy i polimerazy (wypełniają ubytki powstałe po działaniu nukleaz), ligazy (łączą naprawione fragmenty).
2. Antyutleniacze (zmiatacze wolnych rodników)
 - 2.1. Enzymatyczne

- 2.1.1. Dismutaza ponadtlenkowa (SOD) – składa się ona z dwóch dimerów o $M = 32000$, każdy zawiera Cu(II) i Zn(II) , przy czym miedź znajduje się w centrum katalicznym, a cynk pełni rolę strukturalną. Występuje w cytozolu i mitochondriach (magnezo-zależna). Katalizuje dysmutację anionorodnika ponadtlenkowego w nadtlenek wodoru, powodując obniżenie jego stężenia do poziomu poniżej 10^{-11}M . Wstrzyknięta do chorej tkanki z przewlekłym stanem zapalnym powoduje szybkie jej wyleczenie. Daje to lepsze wyniki leczenia reumatyzmu niż dotychczasowa terapia polegająca na naświetlaniu, powodująca wzrost stężenia rodników i tylko przejściową ulgę.
 - 2.1.2. Katalaza ($M = 240\ 000$) - składa się z 4 podjednostek, każda zawiera grupę hemową z wysokospinowym żelazem Fe(III) . Jest reaktywna w peroksyzomach, obniża stężenie nadtlenu wodoru. Osłabienie funkcji SOD i katalazy jest przyczyną szybkiego starzenia się. Przy ich prawidłowym rozwoju człowiek mógłby, prawdopodobnie, żyć znacznie dłużej.
 - 2.1.3. Peroksydaza glutationowa ($M = 90\ 000$) zawiera atom selenu, stąd niektórzy mylnie zaliczają selen do antyutleniaczy. Występuje w mitochondriach i cytozolu, redukuje hydronadtenki organiczne i nadtlenek wodoru do wody i tlenu cząsteczkowego.
 - 2.1.4. Ceruloplazmina - niebieska miedzioproteina występująca w surowicy krwi ($M = 132000$; $7,8$ jonów Cu(II)). Katalizuje ona utlenianie jonów żelaza, przez co zapobiega tworzeniu się rodników hydroksylowych, likwiduje anionorodnik ponadtlenkowy. Mniej reaktywna od SOD, nie wytwarza nadtlenu wodoru. W przeciwieństwie do SOD jest zewnątrzkomórkowa w układzie krążenia.
- 2.2. Nieenzymatyczne
- 2.2.1. Witamina E i beta-karoten – reagując z wolnymi rodnikami wytwarzają trwałe rodniki oddziałujące następnie z witaminą C. Jako rozpuszczalne w tłuszczach chronią głównie błony plazmatyczne. Usuwają NO_2^- chroniąc płuca przed dymem tytoniowym.
 - 2.2.2. Witamina C – reduktor zaangażowany w reakcje hydroksylacji (tworzenie hydroksyproliny w kolagenie). Chelatuje metale, w tym żelazo. Chroni witaminy A i E przed utlenianiem. Reaguje z wolnymi rodnikami w cytoplaźmie. Działa antyutleniająco wspólnie z witaminą E.
 - 2.2.3. Kwas moczowy – likwiduje rodniki w cytoplaźmie. Jest on końcowym produktem metabolizmu puryny u człowieka i naczelnych. Jego duże stężenie ($> 0,5\ \text{mM}$) u naczelnych tłuma czy ich dużą żywotność.
 - 2.2.4. Chelatory metali (transferyna, laktoferyna, w tym białkowe: hemoglobina, mioglobina, ferrodyksyna) – zapobiegają katalizowaniu reakcji utleniania przez żelazo i miedź. Zaliczyć moż

- na do nich również poliaminy biogenne (spermina) – produkty metabolizmu (podobnie do NO) argininy.
- 2.2.5. Związki zawierające grupy sulfhydrylowe -SH (cysteina, cysteamina, glutation).
 - 2.2.6. Kwas liponowy (tioktanowy) – lek podawany diabetykom (normalizuje poziom cukru we krwi). Usuwa z organizmu metale ciężkie (Fe, Cu) i toksyczne (Cd, Pb, Hg). Ostatnio okazało się, że regeneruje on system nerwowy i wątrobę oraz spowalnia rozwój wirusa HIV, choroby Parkinsona i Alzheimerera. Wiąże się to z jego silnym działaniem antyutleniającym (zarówno w wodzie jak i w tłuszczach) oraz z ochroną przed rozkładem witamin C i E.
 - 2.2.7. Melatonina – hormon wytwarzany w szyszynce. Ponieważ zanika ona z wiekiem stąd wysunięto koncepcję, że podawanie melatoniny może zapobiec, a nawet odwrócić procesy starzenia. Faktycznie, w roku 1994r. Pierpaoli i Regalson przedłużyli maksymalną długość życia myszy (z 23 do 28 miesięcy) poprzez podawanie im melatoniny w pożywieniu lub przeszczep szyszynki. Działanie melatoniny nie jest dokładnie poznane. Wiadomo, że jest ona 15 razy silniejszym antyutleniaczem niż witamina E. Jest stężenie (10^{-9} M) jest jednakże za małe, aby mogła ona skutecznie usuwać wolne rodniki. Problematyczna wydaje się również możliwość „bezkarnej” kuracji hormonalnej. Wiąże się to z wysuniętą jeszcze w latach dwudziestych, przez Steinacha, koncepcją, według której główną przyczyną starzenia jest niedobór hormonów. Spektakularne wyniki okazały się bardzo niekorzystne w dłuższym okresie czasu.
 - 2.2.8. Koenzym Q₁₀ (ubichinon) – występuje w komórkowym układzie oddychania, na wewnętrznej membranie mitochondriów oraz w cytoplaźmie w połączeniu z lipoproteinami. Chroni przed utlenianiem lipidów.
 - 2.2.9. Fito-związki – zmiatacze rodników pochodzenia roślinnego (polifenole, flawonoidy, antocyjany, proantocyjanidy, fitoestrogeny).

CAŁKOWITY POTENCJAŁ ANTYOKSYDACYJNY

W literaturze można znaleźć opisy wielu metod oznaczania zarówno poszczególnych wolnych rodników [32-54] jak też antyoksydantów [32, 54-57]. Wolne rodniki wytwarzane są w trakcie przebiegu całego łańcucha przemian. W rezultacie dochodzi do wytworzenia wielu rodników o różnej trwałości i reaktywności. Istnieje, więc potrzeba oznaczania sumarycznej ilości wolnych rodników lub stresu oksydacyjnego spowodowanego przez nie [41, 42, 51-53]. Z drugiej strony w trakcie przebiegu zmian patologicznych zmieniają się stężenia różnych antyoksydantów. Spowodowane jest to

z jednej strony ich zużywaniem się w czasie reakcji z wolnymi rodnikami, z drugiej zaś akcją obronną organizmu. Okazało się, że oznaczanie sumarycznego stężenia wszystkich antyoksydantów często lepiej pozwala ocenić poziom mocy antyoksydacyjnej badanego układu biologicznego niż oznaczanie stężenia poszczególnych antyoksydantów osobno [58-67]. Obie te wielkości, tzn. stres oksydacyjny i całkowity potencjał antyoksydacyjny, są ze sobą ściśle powiązane, a nawet czasami, utożsamiane [67]. M.in. zmiana stężenia antyoksydantów w surowicy krwi pozwala badać wpływ wolnych rodników na przebieg szeregu stanów patologicznych [68-70]. Okazało się, że współdziałanie między różnymi antyoksydantami daje większą protekcję niż związki te osobno. Przykładowo, wymienić tu można synergizm glutatio-
nu regenerującego askorbinian [71], czy askorbinianu regenerującego α -tokoferol [27, 72]. Te zdolności zmiatania rodników w literaturze definiowane i nazywane są bardzo różnorodnie (ang. TAC – *total antioxidant capacity*, FRAP – *ferric reducing ability of plasma*, TRAP – *total peroxy radical trapping antioxidant parameter*, TRAP – *total redox antioxidant potential*, ORAC – *oxygen radical absorbance capacity*, TEAC – *Trolox-equivalent antioxidant capacity* czy TAR – *total antioxidant reactivity*) [59, 64, 73]. W opracowaniu stosujemy skrót CPA pochodzący od terminu - *całkowity potencjał antyoksydacyjny*.

Za przybliżoną miarą stresu oksydacyjnego jest stężenie najbardziej reaktywnych rodników - hydroksylowych. Ponieważ są one wyjątkowo nietrwałe dlatego do ich oznaczania stosuje się metodę pułapki spinowej. Metoda ta polega na wprowadzeniu do materiału biologicznego względnie nietoksycznych związków aromatycznych i oznaczaniu produktów ich reakcji (substytucja wolnorodnikowa lub nukleofilowa) z rodnikiem hydroksylowym. Jako pułapkę spinową wykorzystuje się naturalnie występującą fenyloalaninę, kwas tereftalowy [74] lub egzogenne pochodne aspiryny. Produkty ich reakcji z rodnikiem hydroksylowym oznaczane są chromatograficznie.

Chromatografia może być również zastosowana do pomiaru CPA. Wówczas układ pomiarowy zawiera badany związek lub próbkę biologiczną oraz będący pułapką spinową „detektor” (np. kwas *p*-hydroksybenzoesowy) [75]. Rodniki hydroksylowe wygenerowane zostają w reakcji analogicznej do Fentona, w układzie żelazo (II), nadtlenu wodoru i ADP [76, 77]. Rodniki te są zmiatane zarówno przez detektor jak i badaną próbkę. Jeśli próbka charakteryzuje się większą reaktywnością z rodnikami wówczas spowoduje to zmniejszenie wysokości piku chromatograficznego produktu reakcji detektora z rodnikiem. Umożliwia to porównanie mocy zmiatania rodników hydroksylowych przez różne próbki.

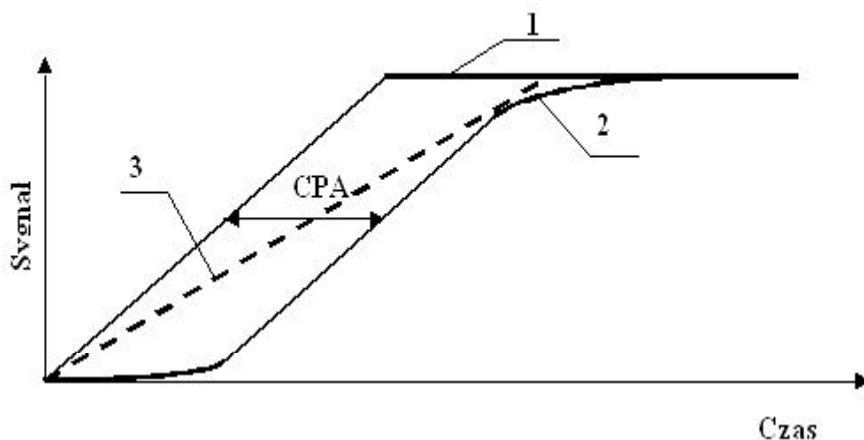
Rodniki są wytwarzane m.in. pod wpływem działania promieniowania elektromagnetycznego na niektóre związki. Podczas reakcji odwrotnej, np. rekombinacji rodników lipidowych dochodzi do wydzielenia kwantu promieniowania elektromagnetycznego (chemiluminescencji). Dzięki temu metodą chemiluminescencji można badać niestabilne rodniki lipidowe, niemożliwe do bezpośredniej ich analizy, nawet w żywym materiale biologicznym [78]. Inna metoda polega na dodaniu do badanego układu związku tworzącego

trwały rodnik, możliwy do oznaczenia fotometrycznego [62, 64] lub za pomocą elektronowego rezonansu paramagnetycznego [79, 80]. Olbrzymia większość rodników mających istotne znaczenie biologiczne jest utleniaczami. Dlatego też sumaryczne stężenie rodników niskocząsteczkowych można oznaczać metodami elektrochemicznymi [81, 82].

Oddzielną grupę technik oznaczania stresu oksydacyjnego jest analiza niektórych związków naturalnie występujących w układach biologicznych. Zaliczyć do tego można oznaczanie sumarycznego stężenia tioli [99, 100], stosunku stężeń glutationu do jego utlenionej postaci [101, 102] czy kwasu askorbinowego do dehydroaskorbinowego [103]. Wolne rodniki reagują praktycznie z wszystkimi związkami biologicznie aktywnymi. Najbardziej istotne są ich oddziaływania z DNA, białkami i lipidami. Produkty tych reakcji służą do wyznaczenia stopnia uszkodzenia tych związków [104]. Uszkodzenie wolnorodnikowe białek mierzone jest stopniem przereagowania tyrozyny w bityrozynę lub stężeniem grup karbonylowych [105]. Znanych jest ponad 20 wolnorodnikowych uszkodzeń zasad purynowych i pirymidynowych. Wśród istotnych wskaźników uszkodzenia kwasów nukleinowych wyróżnić należy 8-okyguaninę i 8-oksyadeninę i 8-hydroksy-2-deoksyguanozynę [106]. Inne podejście polega na określeniu aktywności enzymu reperującego nici DNA, Poli-ADP-rybozy [107]. Najwięcej prac poświęconych jest jednak określeniu stopnia peroksydacji lipidów [60, 108]. W tym przypadku oznacza się dialdehyd malonowy (MDA) [108, 109], 4-hydroksy-2-nonenal [110], oksysterole [111], hydroksynadtlenki [112] czy też sprzężone dieny [113]. Ostatnio stwierdzono, że izomery prostaglandyny F_2 są również wskaźnikami generacji wolnych rodników i peroksydacji lipidów. F_2 -izoprostany (w szczególności 8-*epi*PGF_{2α}) powstają przede wszystkim w procesie peroksydacji kwasu arachidonowego i eikozanoidów (prostoglandyny, leukotrieny i tromboksany) [114-117].

Jednym z pierwszych oznaczeń *aktywności antyoksydacyjnej* była wprowadzona w Instytucie Fizyki Chemicznej byłego ZSRR w Moskwie metoda polegająca na ocenie wpływu ekstraktów tkanek otrzymanych w wyniku działania rozpuszczalników organicznych na utlenianie nienasyconego kwasu tłuszczowego w standardowych warunkach (przedmuchiwanie tlenem, stała temperatura 37°C). Jeśli w ekstrakcie znajdowały się antyoksydanty, utlenianie kwasu tłuszczowego (monitorowane przez jodometryczny pomiar zawartości nadtlenczków) rozpoczynało się z opóźnieniem, po czasie *indukcji*, który był zależny od sumarycznego stężenia antyoksydantów. Metoda ta pozwalała na oznaczenie zawartości antyoksydantów hydrofobowych i zdolnych do oddziaływania z hydrofobowym kwasem tłuszczowym. Wraz z rozwojem nauki powstały coraz to nowocześniejsze i bardziej czułe metody oznaczania CPA. Większość tych metod opiera się na tej samej zasadzie. Utleniacz inicjuje reakcję której przebieg można łatwo śledzić, np. fotometrycznie. Obecność antyoksydantów w próbce spowalnia reakcję utleniania, a mierzony parametr (np. czas indukcji) charakteryzujący to spowolnienie jest miarą zawartości antyoksydantów w próbce [118].

Jednym z najpowszechniejszych oznaczeń jest TAS (*Total Antioxidant Status*), zaproponowane przez Rice-Evans [118]. Opiera się ono na następującej zasadzie. W środowisku reakcji znajduje się 2,2'-azynobis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian) (ABTS), nadtlenek wodoru i peroksydaza lub mioglobina działająca jako *pseudoenzym*. Peroksydaza katalizuje reakcje jednoelektronowego utleniania ABST przez nadtlenek wodoru. W wyniku reakcji powstaje kationorodnik ABTS^{•+} charakteryzujący się zielononiebieską barwą. Im więcej antyoksydantów znajduje się w środowisku reakcji tym wolniej powstaje zielone zabarwienie i tym jest ono słabsze. Zahamowanie zielenienia próbki mierzonego spektrofotometrycznie po określonym czasie inkubacji jest miarą zawartości przeciwutleniaczy w próbce. Metoda ta ma wiele wad, jednak jej ogromną zaletą jest wykonanie oznaczeń w ściśle określonych warunkach, gdyż zestaw odczynników do przeprowadzenia testu jest powszechnie dostępny [118].



Rys. 4. Schemat pomiaru całkowitego potencjału antyoksydacyjnego metodą fotometryczną. 1 – hipotetyczna zmiana sygnału przy braku próbki w mieszaninie reakcyjnej, 2 – przebieg rzeczywistej zmiany sygnału w obecności próbki charakteryzującej się dużo większą stałą szybkości reakcji z rodnikiem niż „detektor” i 3 – stałą szybkości reakcji porównywalną z nim

Pomiar CPA jest szczególnie często stosowany do badań skomplikowanych próbek biologicznych, głównie surowicy lub osocza krwi [59-67]. Oparty on jest na fotometrycznym pomiarze wytworzonych trwałych rodników [62, 99] lub redukcji żelaza przez składniki surowicy [60]. Najczęściej jednak wykorzystuje się metodę opartą o generację rodników wskutek termicznego rozpadu związków dwuazowych, najczęściej AAPH (2,2-diazobis-(2-amidinopropano)-dihydrochlorek). Początkowo AAPH rozpada się samorzutnie na dwa rodniki alkilowe, które następnie reagując z tlenem wytwarzają rodniki ponadtlenkowe. Powstałe rodniki monitoruje się za pomocą tzw. detektora, tzn. związku, który po przereagowaniu z rodnikami zmienia sygnał luminescencyjny [63], fluorometryczny [59, 119] lub fotometryczny [61, 65]. Miarą potencjału antyoksydacyjnego jest czas opóźnienia krzywej obrazują-

cej zmiany stężenia detektora lub produktu jego reakcji w czasie (rys. 4). To przesunięcie spowodowane jest tym, że antyoksydanty zawarte w próbce nie dopuszczają do reakcji rodnika z detektorem. Stąd podstawowym wymogiem tej metody jest, aby reakcja próbki z rodnikiem była znacznie szybsza od analogicznej reakcji detektora.

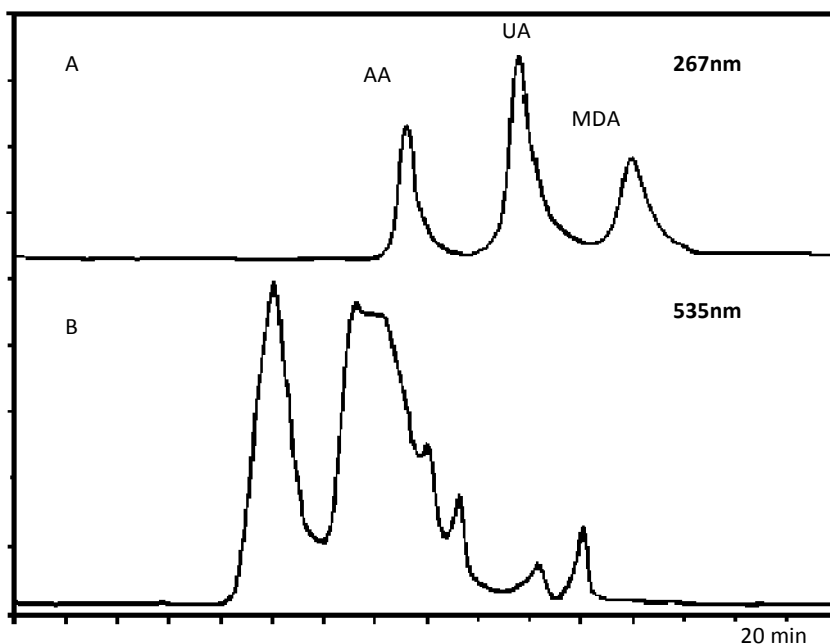
Duża ilość metod pomiaru CPA powoduje, że ten sam materiał mierzony za pomocą różnych metod może dawać odmienne wyniki. W celu ujednoczenia wyników w większości przypadków stosuje się przeliczanie ich na jeden ze standardów, przeważnie stężenie Troloksu, syntetycznego, rozpuszczalnego w wodzie analogu witaminy E.

CHROMATOGRAFICZNY POMIAR STRESU OKSYDACYJNEGO

CPA jest odwrotnie skorelowany z inną sumaryczną wielkością, mianowicie ze stresem oksydacyjnym. Pośrednią grupę technik oznaczania stresu oksydacyjnego jest analiza niektórych związków naturalnie występujących w układach biologicznych. Zaliczyć do tego można oznaczanie sumarycznego stężenia tioli, stosunku stężeń glutationu do jego utlenionej postaci czy kwasu askorbinowego do dehydroaskorbinowego. Wolne rodniki reagują z praktycznie wszystkimi związkami biologicznie aktywnymi (najbardziej istotne są ich oddziaływania z DNA, białkami i lipidami). Produkty tych reakcji służą do wyznaczenia stopnia uszkodzenia tych związków. Ponieważ są one nietrwałe ich bezpośrednie oznaczanie w próbkach materiału biologicznego (np. w osoczu, czy w homogenatach tkankowych) nie jest zazwyczaj możliwe, dlatego też pośrednią metodą oznaczania stresu oksydacyjnego jest analiza produktów tych reakcji. Uszkodzenie wolnorodnikowe białek mierzone jest stopniem przereagowania tyrozyny w bityrozynę lub stężeniem grup karbonylowych. Znanych jest ponad 20 wolnorodnikowych uszkodzeń zasad purynowych i pirymidynowych. Wśród istotnych wskaźników uszkodzenia kwasów nukleinowych wyróżnić należy 8-okyguaninę i 8-oksyadeninę i 8-hydrokso-2-deoksyguanozynę. Inne podejście polega na określeniu aktywności enzymu reperującego nici DNA, poli-ADP-rybozy. Wydaje się, że w chwili obecnej największe zainteresowanie wzbudza określenie stopnia peroksydacji lipidów. Oznaczanymi produktami ich peroksydacji jest dialdehyd malonowy (MDA) [7], 4-hydrokso-2-nonenal (HNO), oksysterole (7 α -, 7 β -, 24-, 25- i 27-hydroksocholesterol oraz epoksocholesterol [8a]), hydrokso-synadtlenki, sprzężone dieny czy też ostatnio intensywnie badane izomery prostaglandyny F₂. F₂-izoprostany (w szczególności 8-*epi*PGF_{2 α}) powstają przede wszystkim w procesie peroksydacji kwasu arachidonowego i eikozanoidów (prostoglandyny, leukotrieny i tromboksany).

Produktami peroksydacji, głównie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), są aldehydy, hydrokso-synadtlenki i ketony, a ich produktem końcowym jest dialdehyd malonowy (MDA). Pomiar jego stężenia jest powszechnie uznawany za miarę wolnorodnikowego uszkodzenia lipidów [7]. Najczęściej stosuje się do tego, ze względu na prostotę obsługi i wysoką

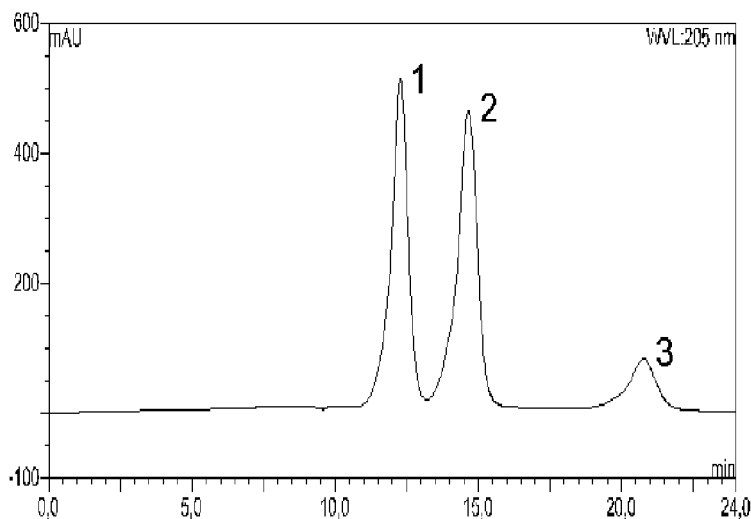
czułość, test kwasu tiobarbiturowego, TBA [7]. Niestety test TBA jest wysoce niespecyficzny i trudny do zastosowania w próbkach biologicznych. Dodatni wynik otrzymuje się także z cukrami, niektórymi aminokwasami, kwasami żółciowymi, alkenami, alkadienami, itp. Pewne udoskonalenie uzyskano stosując chromatografię w układzie faz odwróconych z detekcją fluorometryczną [10, 11] lub fotometryczną przy długości fali 535 nm [13-16]. W tym przypadku derywatywacja (kwasem tiobarbiturowym) wpływa zarówno na rozdział, jak i na detekcję. Ciągłe jednak etap derywatywacji związany z opisaną niejednoznacznością, jest wymagany. Metodę tę próbowano zmodyfikować stosując derywatywację 2,4-dinitrofenylohydrazyną [17-19] lub diamionaftalenem [20] z detekcją fotometryczną przy 310 nm. Etap derywatywacji usunięto stosując tzw. chromatografię par jonowych [21, 22] (dialdehyd jest kwasem i dlatego jest on słabo zatrzymywany na fazie RP-18). Detekcja fotometryczna przy 267 nm pozwala na jednoczesną analizę MDA z dwoma powszechnie występującymi w surowicy krwi antyoksydantami, tzn. kwasem askorbinowym i moczowym. Na rysunku 5 przedstawiono analogiczny chromatogram uzyskany metodą chromatografii wykluczania jonowego (jest to technika predysponowana do rozdziału słabych kwasów), takich jak MDA ($pK_a \sim 4.5$) [23]. Porównany on został z chromatogramem uzyskanym po derywatywacji MDA.



Rys. 5. Chromatogram jonowo-wykluczający 100 μM kwasu (AA) – askorbinowego, (UA) – moczowego, (MDA) – dialdehydumalonylowego i - 25 μM MDA TBA (dolny wykres).
 Warunki: kolumna – 300x7.8 mm I.D. TSK-GEL SCH(H^+) (TosoHaas); faza ruchoma:
 (A) - 3 mM H_2SO_4 , 3 mM TBABr, 5% ACN, temp. – 40°C; (B) – 1 mM H_2SO_4 , 15% ACN,
 temp. – 20°C; detektor UV-267/535 nm

Rodniki hydroksylowe są wyjątkowo reaktywne. Dlatego też są stosunkowo często oznaczane i pośrednio świadczą o całkowitym stresie oksydacyjnym. Ponieważ są one wyjątkowo nietrwałe, do ich oznaczania stosuje się metodę pułapki spinowej. Polega ona na wprowadzeniu do materiału biologicznego względnie nietoksycznych związków aromatycznych i oznaczaniu produktów ich reakcji (substytucja wolnorodnikowa lub nukleofilowa) z rodnikiem hydroksylowym. Jako pułapkę spinową wykorzystuje się naturalnie występującą fenyloalaninę, kwas tereftalowy lub egzogenne pochodne aspiryny. W przypadku fenyloalaniny (D-izomer) jej produktami reakcji z rodnikami hydroksylowymi są tyrozyny [24]. Produkty ich reakcji z rodnikiem hydroksylowym oznaczane są chromatograficznie.

Aspiryna (kwas *o*-acetylosalicylowy) jest lekiem powszechnie stosowanym m.in. przy leczeniu stanów zapalnych i złożeń naczyń krwionośnych. W organizmach jest ona bardzo szybko hydrolizowana do kwasu salicylowego (rys. 9). Kwas ten w warunkach fizjologicznego pH = 7,4 reaguje z rodnikami hydroksylowymi dając trzy produkty reakcji: kwasy 2,3- (49%) i 2,5-dihydroksybenzoesowe (40%) (DHBA) oraz *o*-katechol (11%). Pułapkowanie rodników hydroksylowych kwasem salicylowym zostało wielokrotnie opisane w literaturze [24]. Kwas ten (ok. 5 mM) wprowadzany jest dootrzewnowo lub stereotaktycznie dokomorowo do komory mózgowej. Stężenie 2,5-DHBA może być powiązane ze stężeniem cytochromu P-450. Zmiany stężenia 2,3-DHBA są zaś bezpośrednio powiązane ze zmianami stężenia rodników hydroksylowych. Kwasy te oznaczane są zwykle chromatograficznie w układzie faz odwróconych [25], jak przedstawiono to na rys. 6.

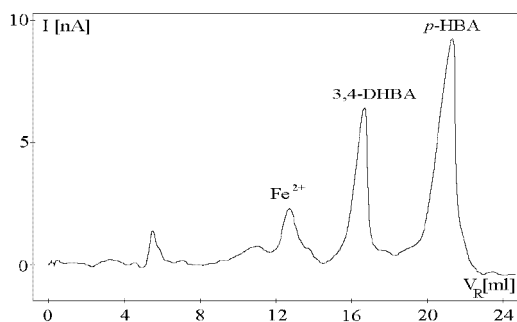


Rys. 6. HPLC chromatogram 1 mM standardów kwasów (1) - 2,5-, (2) - 2,3-dihydroksybenzoesowych oraz (3) - kwasu salicylowego. Warunki chromatograficzne: kolumna - 250x4 mm śr. wew. Zorbax ODS 5 μ m (Knauer); faza ruchoma - bufor octanowo-cytrynianowy pH = 4,3, 1 mM KCl, 0,25 mM EDTA, 5% MeOH, 3 mM TBAP; temp. - 20°C; szybkość przepływu - 0,9 ml/min; detektor - UV-205 nm

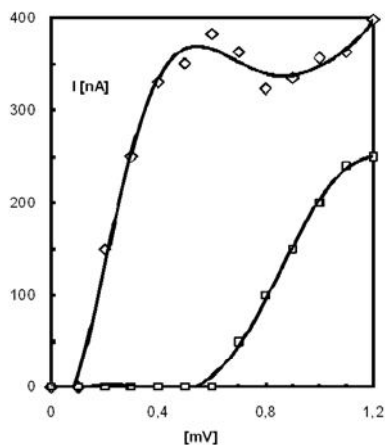
Pułapka salicylanowa posiada szereg wad [26]:

- problematyczne jest oznaczanie kwasu 2,5-dihydroksybenzoesowego gdyż może on występować endogennie, np. wskutek działania cytochromu P-450,
- czułość układu jest zmniejszona na skutek tworzenia się dwóch produktów reakcji,
- pochodne aspiryny mogą występować w pożywieniu, a jej nieuzasadnione podawanie wpływa na stany zapalne.

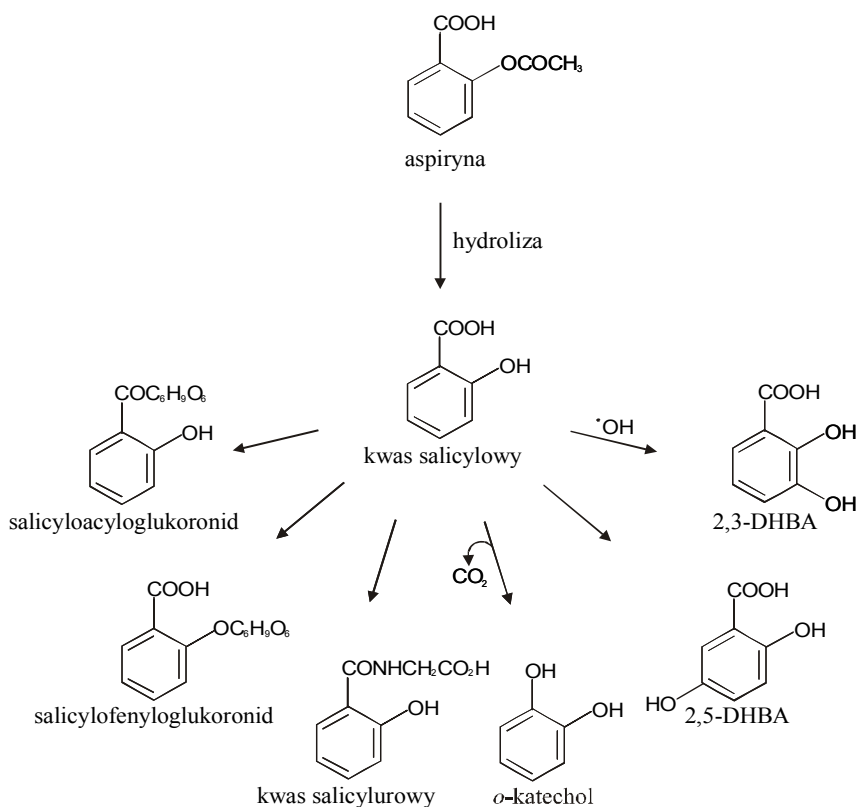
Aby uniknąć tych trudności SteMarie i wsp. zaproponowali zastąpienie salicylanów kwasem *p*-hydroksybenzoesowym [26]. Chociaż kwasy te oznaczać można fotometrycznie to zwykle stosuje się znacznie bardziej czułą (1 pg dla DHBA, 100 pg dla kwasu salicylowego) detekcję elektrochemiczną (elektroda pracująca: węgiel szklisty; 0,8 V vs Ag/AgCl) [25].



Rys. 7. Chromatogram jonowo-wykluczający kwasów 3,4-dihydroksybenzoesowego oraz kwasu *p*-hydroksybenzoesowego. Warunki chromatograficzne: kolumna - 300x7,8 mm śr. wew. TSK-GEL SCX(H⁺) (TosoHaas); faza ruchoma - 1 mM H₂SO₄, 1 mM KCl, 0,25 mM EDTA, 13% ACN; detektor elektrochemiczny

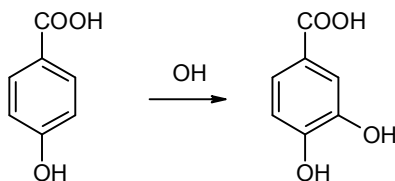


Rys. 8. Hydrodynamiczne voltamogramy 1 mM kwasów 3,4-dihydroksybenzoesowego i *p*-hydroksybenzoesowego. Warunki chromatograficzne jak na rysunku powyżej



Rys. 9. Metabolity i produkty reakcji ataku rodnika hydroksylowego na kwas salicylowy

CHROMATOGRAFICZNY POMIAR CAŁKOWITEGO POTENCJAŁU ANTYOKSYDACYJNEGO

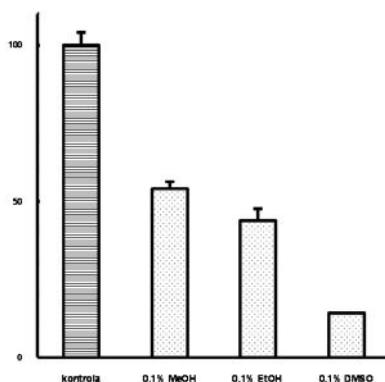


Rys. 10. Reakcja pułapkowania rodnika hydroksylowego kwasem p-hydroksybenzoesowym, w wyniku której powstaje kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy

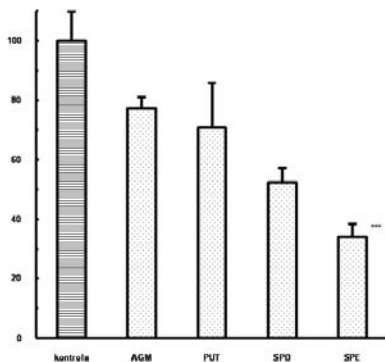
Ponieważ rodnik hydroksylowy jest najbardziej reaktywny z całej kaskady rodników jego oznaczenie pozwala uzyskać informacje o całkowitym stresie oksydacyjnym. Rodniki hydroksylowe są wyjątkowo nietrwałe dlatego do ich oznaczania stosuje się metodę pułapki spinowej. Polega ona na wprowadzeniu do materiału biologicznego względnie nietoksycznych związ-

ków aromatycznych i oznaczaniu produktów ich reakcji (substytucja wolnorodnikowa lub nukleofilowa) z rodnikiem hydroksylowym. Jako pułapkę spinową wykorzystuje się m.in. naturalnie występującą fenyloalaninę, kwas tereftalowy, egzogenne pochodne aspiryny oraz, przedstawiony na rys. 10, kwas *p*-hydroksybenzoesowy (*p*-HBA) [25]. Kwasy hydroksybenzoesowe mogą być oznaczane metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych z detekcją elektrochemiczną (węgiel szklisty; 0,8 V vs Ag/AgCl).

W tym miejscu warto zauważyć, że salicylany, czy szerzej hydroksybenzoesany, (np.: aspiryna - kwas *o*-acetylosalicylowy) występują w wielu roślinach. Wykorzystanie, z powodzeniem, tej grupy związków jako pułapki rodnika hydroksylowego udowadnia, że oprócz własności przeciwzapalnych związki te w organizmie mogą pełnić również rolę antyoksydantów.



Rys. 11. Porównanie potencjałów antyoksydacyjny metanolu, etanolu i dimetylosulfotlenku. Rodniki hydroksylowe zostały wygenerowane w układzie (ADP/Fe(II)/H₂O₂) i pułapkowane kwasem *p*-hydroksybenzoesowym w obecności badanych rozpuszczalników o stężeniu 0.1%. Produkt reakcji (kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy) był oznaczany z zastosowaniem chromatografii wykluczania jonowego. Próbkę kontrolną nie zawierała antyoksydantów, dlatego wysokość jej pików chromatograficznych przyjęto za 100%



Rys. 12. Prównanie potencjału antyoksydacyjny poliamin biogennych (AGM – agmatyny, PUT – putrescyny, SPD – spermidyny i SPE – sperminy). Warunki jak na rys. 11

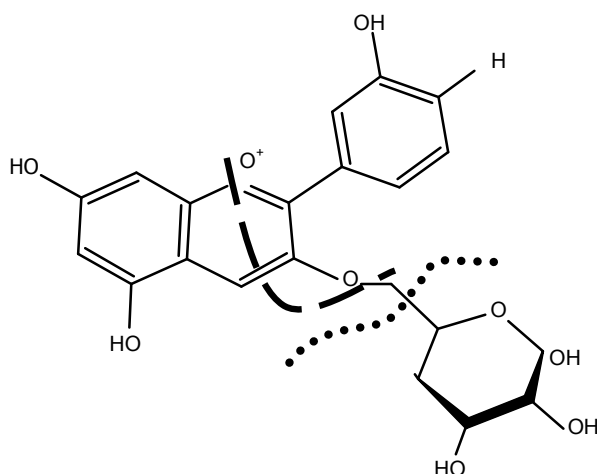
W statycznej, chromatograficznej metodzie pomiaru całkowitego potencjału antyoksydacyjnego układ pomiarowy zawiera badany związek lub próbkę biologiczną oraz będący pułapką spinową „detektor” (np. kwas *p*-hydroksybenzoesowy) [28]. Rodniki hydroksylowe wygenerowane zostają w reakcji analogicznej do Fentona, w układzie żelazo (II), nadtlenek wodoru i ADP [29]. Rodniki te są zmiatane zarówno przez detektor jak i badaną próbkę. Jeśli próbka charakteryzuje się większą reaktywnością z rodnikami wówczas spowoduje to zmniejszenie wysokości pików chromatograficznego produktu reakcji detektora z rodnikiem. Umożliwia to porównanie mocy zmiatania rodników hydroksylowych przez różne próbki. Okazało się, że tak wyznaczony potencjał antyoksydacyjny skorelowany jest ze stałymi szybkości reakcji rodnika hydroksylowego z badanymi związkami.

Na rys. 11 pokazano wysokości pików chromatograficznych uzyskanych w obecności niektórych rozpuszczalników organicznych (metanolu, etanolu i dimetylosulfotlenku – DMSO) w odniesieniu do próbki kontrolnej (wytworzony rodnik+detektor) [28]. Zmniejszenie wysokości pików wskazuje na to, że rozpuszczalniki te zmiatają rodniki hydroksylowe. Może to tłumaczyć protekcyjne własności DMSO obserwowane w czasie stresu oksydacyjnego mózgu [30, 31]. Obserwowane zmniejszenie wysokości pików chromatograficznych dihydroksybenzoesanów jest proporcjonalne do stężenia próbki, ale także i jej własności. Ta ostatnia jest prawdopodobnie zależna od wartości stałej szybkości reakcji próbki z rodnikiem hydroksylowym. Stałe szybkości wynoszą 8.3×10^8 , 2.2×10^9 i 7.0×10^9 mol L⁻¹s⁻¹ odpowiednio dla metanolu, etanolu i DMSO.

Podobne zależności uzyskane dla poliamin biogennych, putrescyny, spermidyny, sperminy i agmatyny przedstawiono na rys. 12 [11]. Związki te pełnią istotną rolę we wszystkich żywych organizmach, m.in. we wzroście i replikacji komórek. Poza tym pełnią rolę antagonistów niektórych kationów (takich jak K⁺, Mg²⁺ czy Ca²⁺) i antyoksydantów [12]. Jako substancje smakowe i zapachowe występują m.in. w winie, herbacie, grzybach, jabłkach itd. Pełnią one rolę też antygenów w komórkach niektórych bakterii, nowotworów, pasożytów i grzybów chorobotwórczych. Dlatego sugeruje się, że picie herbaty ma działanie antykancerogenne gdyż pobudza to aktywność komórek układu odpornościowego i wzrost produkcji np. interferonu gamma. Zmiany ich stężenia obserwowano w czasie ischemii i reperfuzji. Kontrowersje wzbudza w dalszym ciągu czy ich wytwarzanie ma w tym przypadku działanie neurotoksyczne czy neuroprotekcyjne [13]. Z przedstawionego rysunku wynika, że poliaminy są zmiataczami wolnych rodników. Podobnie do opisanych wcześniej rozpuszczalników organicznych ich potencjał antyoksydacyjny proporcjonalny jest do stałych szybkości ich reakcji z rodnikiem hydroksylowym (wynoszą one odpowiednio 1.1×10^8 , 1.2×10^8 i 1.3×10^8 mol L⁻¹s⁻¹). Mechanizm zmiatania rodników w tym przypadku oparty jest głównie na kompleksowaniu jonów żelaza, co zapobiega przebiegowi reakcji Fentona, a nie na konkurencyjnej reakcji z jonami hydroksylowymi.

Ostatnio dużym zainteresowaniem cieszą się naturalne antyoksydanty do których zalicza się występujące w roślinach barwniki – flawonoidy w tym

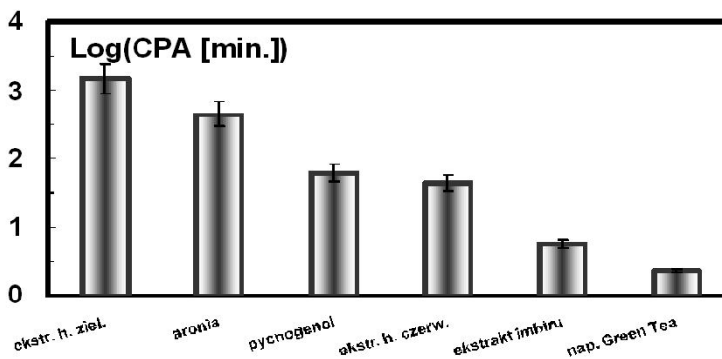
antocyjany. Do tych ostatnich należy m.in. barwnik C3G (3-O-β-D glukozyd cyjanidyny) oraz jego aglikol – cyjanidyna. Są to związki powszechnie występujące w warzywach i owocach. Duże ilości antocyjanów zawierają owoce o niebieskim bądź fioletowym zabarwieniu. Wyizolowano je m.in. z czerwonej i czarnej fasoli. Uważane są one za potencjalne wymiatacze wolnych rodników tlenowych *in vivo* [14]. W szczególności dużo antocyjanów zawartych jest w aronii czarnej (*Aronia melanocarpa*) [14-16]. W literaturze można znaleźć liczne opisy ich neuro- i cytoprotekcyjnego działania, m.in. w chorobie Alzheimera, udarze mózgu, zawale serca itp. [14]. Ekstrakt z owoców aronii jak i zawarte w niej antocyjany charakteryzują się silnymi właściwościami antyoksydacyjnymi. Okazało się jednakże, że nie zmieniał on potencjału antyoksydacyjnego osocza krwi, co oznacza, że związki te nie są wchłaniane z przewodu pokarmowego. Wyjaśnieniem tego paradoksu może okazać się sugestia Tsudy i wsp., że cyjanidyna zawarta w aronii ulega w organizmach żywych alglikolizacji, a następnie jest metabolizowana do kwasu 3,4-dihydroksybenzoowego (3,4-DHBA) (rys. 13), jak wynika z badań silnego zmiatacza rodników peroksydowych.



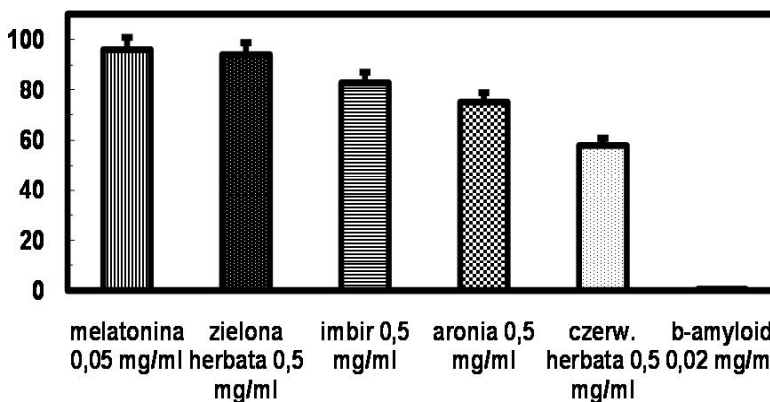
Rys. 13. Przypuszczalny schemat metabolizmu cyjanidyny

Według tradycji w roku 2737 p.n.e. cesarzowi Chen Nung wpadł do wody listek herbaty. Odtąd datują się początki znajomości zdrowotnego działania różnych herbat, które około XVI wieku przybyły do Europy. Spośród przebadanych i przedstawionych na rys. 14 [120] fotometrycznych wartości CPA wynika, że najsilniej wolne rodniki są zmiatane przez ekstrakt z herbaty zielonej. Na uwagę zasługuje też fakt zupełnego braku zmiatania wolnych rodników przez napój herbaciany *Green Tea & Lychee*. Sugeruje się, że tymi aktywnymi antyoksydantami występującymi w herbacie są związki z grupy flawonoidów. Podobne wyniki uzyskane zostały z zastosowaniem metody analogicznej do opisanej powyżej chromatograficznej (rys. 15). Różnica polegała na detekcji z zastosowaniem spektroskopii ma-

sowej. Warto zwrócić w tym przypadku uwagę na silne własności zmiatające melatoninę, zupełnie nieaktywnej w stosunku do rodników peroksydowych.



Rys. 14. Całkowity potencjał antyoksydacyjny, odniesiony do rodników peroksydowych, niektórych ekstraktów roślinnych o stężeniu początkowym 1 mg/ml: ekstraktu z herbaty zielonej, aronii, pycnogenol, ekstraktu z herbaty czerwonej, imbiru oraz napoju herbacianego Green Tea & Lychee



Rys. 15. Całkowity potencjał antyoksydacyjny ekstraktów roślinnych, melatoniny oraz β -amyloidu. Rodnik generowany – hydroksyloxy, metoda pomiaru – MS

LITERATURA

1. B.K. Głód, G.A. Czapski, P.R. Haddad, *TRAC, Trends Anal. Chem.*, **19**(2000)492.
2. R.A. Floyd, *FASEB J.*, **4**(1990)2587.
3. A. Boveris, N. Oshinao, B. Chance, *Biochem. J.*, **128**(1972)617.
4. W. Droge, *Physiol. Rev.*, **82**(2002)47.
5. T. Kulawik, R. Gil, P. Grieb, B.K. Głód, *Probl. Lekar.*, **41**(2002)393.
6. G. Benzi, A. Noretti, *Neurobiol. Aging*, **16**(1995)661.

7. B.K. Głód, J.C. Kowalski, *J. Liquid Chromatogr. & Rel. Technol.*, **27**(2004)2733-2742.
8. B. Halliwell, *Free Radic. Res*, **25**(1996)439.
- 8a. S. Dzeletovic, O. Breuer, E. Lund, U. Diczfalusy, *Anal. Biochem.*, **225**(1995)73-80.
9. I. Fridovich, *Arch. Biochem. Biophys.*, **247**(1986)1.
10. R.M.J. Palmer, D.S. Ashton, S. Moncada, *Nature*, **333**(1988)664.
11. B.K. Głód, P. Grieb, *Chem. Anal. (Warsaw)*, **47**(2002)399.
12. H.C. Ha, J.D. Yager, P.A. Woster, R.A Casero, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **244**(1998)298.
13. E. Lövaas, *Medical Hypotheses*, **45**(1995)59.
14. T. Tsuda, F. Horio, T. Osawa, *BioFactors*, **13**(2000)133.
15. R. Salvayre, P. Braquet, T.H. Perruchot, L. Douste-Blazy, *Proc. Internat. Bioflavan. Symp.*, Munch 1981, str. 437-442.
16. Y.L. Hong, S.L. Yeh, C.Y. Chang, M.L. Hu, *Clin. Biochem.*, **33**(2000)619-625.
17. J. Pilz, I. Meineke, C.H. Gleiter, *J. Chromatogr. B*, **742**(200)315-325.
18. R. Bakalova, M. Mileva, C. Kotsev, V. Bardarov, S. Ribarov, *Method Find. Exp. Clin.*, **22**(2001)267-269.
19. F. Fenaille, P. Mottier, R.J. Turesky, S. Ali, P.A. Guy, *J. Chromatogr. A*, **921**(2001)237-245.
20. P.J. Steghens, A.L. van Kappel, I. Denis, C. Collombel, *Free Radic. Biol. Med.*, **31**(2001)242-249.
21. A.H. Waterfall, G. Singh, J.R. Fry, C.A. Marsden, *Neurosci. Lett.*, **200**(1995)69-72.
22. A.W. Bull, L.J. Marnet, *Analyt. Biochem.*, **149**(1985)284-290.
23. B.K. Głód, *Neurochem. Res.*, **22**(1997)1237-1248.
24. T. Obata, H. Hosokawa, Y. Yamanaka, *Comp. Biochem. Physiol.*, **106**(1997)629-634.
25. B.K. Głód, G.A. Czapski, *Zastosowanie HPLC do Badania Reakcji Wolnorodnikowych w Układach Biologicznych [w] Chromatographic Methods in the Analysis of Food and Ecotoxicology*, Wyd. UMCS, Lublin 1999, 11-15.
26. Ste-Marie L., Boismenu D., Vachon L. and Montgomery J., *Anal. Biochem.*, **241**(1996)67.
27. A.P. Diplock, *Med. Biol.*, **62**(1984)78-80.
28. B.K. Głód, R. Greib, *Chem. Anal.*, **47**(2002)399-407.
29. R.A. Floyd, J.J. Watson, P.K. Wong, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **10**(1984)221.
30. J.W. Phillis, A.Y. Estevez, M.H. O'Regan, *Neurosci. Lett.*, **244**(1998)109-111.
31. A. Bishayee, H.Z. Hill, D. Stein, D.V. Rao, R.W. Howell, *Radiation Res.*, **155**(2001)335-344.
32. B. Kamińska, M. Stańczyk, *Post. Biol. Kom.*, **25** sup.11(1998)15.
33. A. Friedman, *Acta. Neurol. Scand.*, **89**(1994)258.
34. S. Ball, *Chemia szarych komórek*, Medyk, Warszawa 2003.

35. W. Pakszys, B.K. Głód, P.P. Liberski, A. Klimek, red., *Postępy w rozpoznawaniu i monitorowanym klinimetrycznie leczeniu choroby Parkinsona i parkinsonizmu*, Medical Communications, Warszawa 2004.
36. A. Szczudlik, *Choroba Parkinsona*, XVI Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN, Mogilany 1999.
37. H. Ehringer, O. Hornykiewicz, *Klin. Wochenschr.*, **38**(1960)1236.
38. E.S. Tolosa, *Clin. Neuropharm.*, **21** sup.1(1998)S1-S4.
39. J. Cederbaum, *Clin. Pharmacokinet.*, **13**(1987)141.
40. G.C. Cotzias, M.H. Van Woert, L.M. Schiffer, *N. Engl. J. Med.*, **276**(1967)374.
41. Y. Agid, T.Chasa, D.Marschen, *Lancet*, **351**(1998)851.
42. C.W. Olanow, *Eur. J. Neurol.*, **4** sup.3(1997)13.
43. P.G. Jenner, *Eur. J. Neurol.*, **4** sup.3(1997)3.
44. H.S. Markus, M. Cox, A.M. Tomkins, *Clinical Science*, **83**(1992)199.
45. W. Pakszys, *Neurol. Neurochir. Pol.*, **6**(1971)837.
46. M.D. Yahr, *Autonomic Dysfunction in Parkinson Dis. Rev.*, **1**, **2**(1989).
47. D.J. Lanska, Ch.G. Goetz, T.A. Chmura, *Movement Disorders*, **16**(2001)736.
48. K. Kwiatos, *Pomiar i analiza drżeń kończyn człowieka*, rozprawa doktorska na Wydziale Elektroniki WAT 2000.
49. P. Jenner, C.W. Olanow, *Neurology.*, **47**(1996)161.
50. D.T. Dexter, C.J. Carter, F.R. Wells, F. Javoy-Agid, *J. Neurochem.*, **52**(1989)381.
51. J. Garthwaite, *Tren. Neurosci.*, **14**(1991)60.
52. U. Pinkernell, S. Effekemann, U. Karst, *Anal. Chem.*, **69**(1997)3623.
53. M. Gu, M.T. Gash, J.M. Cooper, G.K. Wenning, S.E. Daniel, N.P. Quinn, C.D. Marsden, A.H.V. Schapira, *Ann. Neurol.*, **44**(1997)418.
54. T. Obata, *Toxicol. Lett.*, **132**(2002)83.
55. T. Singer, A.J. Trevor, N. Castagnoli, *Trend Biochem. Sci.*, **12**(1987)266.
56. J.W. Langston, *Life Sci.*, **36**(1985)201.
57. E. Sofic, P. Riederer, H. Heinsen, H. Beckmann, G.P. Reynolds, G. Hebenstreit, *J. Neural. Trans.*, **74**(1988)199.
58. E. Sofic, W. Paulus, K. Jellinger, P. Riederer, *J. Neurochem.*, **56**(1991)978.
59. C. Buhmann, S. Arlt, A. Kontush, T. Moller-Bertram, S. Sperber, M. Oechsner, M. Stuerenburg, U. Beisiegel, *Neurobiol. Disease*, **15**(2004)160.
60. A.N. Basma, E.J. Morris, W.J. Nicklas, H.M. Geller, *J. Neurochem.*, **64**(1995)825.
61. D.G. Graham, *Mol. Pharmacol.*, **14**(1978)633.
62. S.T. Spencer, T. Parker, W.D. Bennet, *Neuroreport*, **5**(1994)1009.
63. E. Martignoni, F. Blandini, L. Godi, S. Desideri, C. Pacchetti, F. Mancini, G. Nappi, *Free Rad. Biol. Med.*, **27**(1999)428.
64. J.W. Miller, J. Selhub, J.A. Joseph, *Free Rad. Biol. Med.*, **21**(1996)241.

65. M. Tanaka, A. Sotomatsu, H. Kanai, S. Hirai, *J. Neurol. Sci.*, **101**(1991)198.
66. Y. Agid, *Neurology*, **43**(1998)145.
67. B.K. Głód, G.A. Czapski, P.R.F. Haddad, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **19**(2000)492.
68. E. Miętkiewski, *Kurs wykładów fizjologii człowieka*, wyd. 2, PZWL, Warszawa, 1969.
69. R.A. Floyd, *FASEB J.*, **4**(1990)2587.
70. A. Boveris, N. Oshinao, B. Chance, *Biochem. J.*, **128**(1972)617.
71. B. Halliwell, *Lancet*, **355**(2000)1179.
72. B. Halliwell, *Free Radic. Res*, **25**(1996)439.
73. I. Fridovich, *Arch. Biochem. Biophys.*, **247**(1986)1.
74. R.M.J. Palmer, D.S. Ashton, S. Moncada, *Nature*, **333**(1988)1.
75. B.K. Głód, J. Strosznajder, *Wolne rodniki w starzeniu się mózgu i innych procesach biologicznych*, w **Mózg a starzenie** (M.J. Mossakowski, J. Strosznajder, red.), Oświata UN-O, Warszawa 2001.
76. P.G. Osborne, K. Yamamoto, *J. Chromatogr. B*, **707**(1998)3.
77. B. Halliwell, H. Kaur, M. Ingelman-Sundberg, *Free Radical Biol. Med.*, **10**(1991)439.
78. B.K. Głód, *Neurochem. Res.*, **22**(1997)1237.
79. B.K. Głód, G.A. Czapski, P.R. Haddad, *TRAC, Trends Anal. Chem.*, **19**(2000)492.
80. B.K. Głód, P. Grieb, *Chem. Anal.*, (Warsaw), **47**(2002)399.
81. A. Rehman, M. Whiteman, B. Halliwell, *British J. Pharmacol.*, **122**(1997)1702.
82. G. Ellis, I. Adatia, M. Yazdanpanah, S.K. Makela, *Clin. Biochem.*, **31**(1998)195.
83. T-K. Lin and C-C. Lai, *J. Chromatogr.*, **227**(1982)369.
84. B.K. Głód, W. Hilgier, J. Strosznajder, J. Albrecht, *Chem. Anal.*, (Warsaw), **45**(2000)27.
85. P.M. Abuja, R. Albertini, *Clin. Chim. Acta*, **306**(2001)1.
86. A. Ghiselli, M. Serafini, G. Maiani, E. Azzini, A. Ferro-Luzzi, *Free Rad. Biol. Med.*, **18**(1995)29.
87. M. Carlberg, *J. Neurosci. Meth.*, **52**(1994)165.
88. K. Kostner, S. Bayai, M. Jansen, G. Khoschorur, W.H. Horl, G. Maurer, B. Winkhofer-Roob, K. Derfler, *Clin. Chim. Acta*, **288**(1999)21.
89. A.H. Waterfall, G. Singh, J.R. Fry, C.A. Marsden, *Neurosci. Lett.*, **200**(1995)69.
90. I.N. Acworth, B. Bailey, *The Handbook of Oxidative Metabolism*, ESA Inc. 1995.
91. C.A. Rice-Evans, *Free Rad. Res.*, **33**(2000)59.
92. M. Valkonen, T. Kuusi, *J. Lipid Res.*, **38**(1997)823.
93. N. J. Miller, C. Rice-Evans, M.J. Davies, V. Gopinathan, A. Milner, *Clin. Scie.*, **84**(1993)407.
94. E. Lissi, M. Salim-Hanna, C. Pascual, M.D. del Castillo, *Free Rad. Biol. Med.*, **18**(1995)153.

95. A. Ghiselli, M. Serafini, F. Natella, C. Saccini, *Free Rad. Biol. Med.*, **29**(2000)1106.
96. F. Tubaro, A. Ghiselli, P. Rapuzzi, M. Maiorino, F. Ursini, *Free Rad. Biol. Med.*, **24**(1998)1228.
97. A. Krasowska, D. Rosiak, K. Szkapiak, M. Łukasiewicz, *Curr. Topics Biophys.*, **24**(2000)89.
98. H. Wang, J.A. Joseph, *Free Rad. Biol. Med.*, **27**(1999)612.
99. D. Genser, M-H. Kang, H. Vogelsang, I. Elmadfa, *Europ. J. Clin. Nutr.*, **53**(1999)675.
100. E.C. Tsai, I.B. Hirsh, J.D. Brunzell, A. Chait, *Diabetes*, **43**(1994)1010.
101. E. Ali, *Zesz. Nauk. Uniw. Jag., Prace Biol. Molek.*, **11**(1985)139.
102. C. O'Gara, K. Maddipati, L. Marnett, *Chem. Res. Toxicol.*, **2**(1989)295.
103. L. Ste-Marie, D. Boismenu, L. Vachon, J. Montgomery, *Anal. Biochem.*, **241**(1996)67.
104. R.A. Floyd, J.J. Watson, P.K. Wong, *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **10**(1984)221.
105. B.J. Tabner, S. Turnbull, O.M.A. El-Agnaf, D. Allsop, *Free Rad. Biol. Med.*, **32**(2002)1076.
106. B.K. Głód, K.I. Stańczak, A. Woźniak, A. Walendzik, W. Pakszys, CPS: analchem/0306002.
107. M.M. Tarpey, I. Fridovich, *Circ. Res.*, **89**(2001)224.
108. S. Chevion, E.M. Berry, N. Kitrossky, R. Kohen, *Free Rad. Biol. Med.*, **22**(1997)411.
109. R. Kohen, E. Vellaichamy, J. Hrbac, I. Gati, O. Tirosh, R. Kohen, *Free Rad. Biol. Med.*, **28**(2000)547.
110. G.L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**(1959)70.
111. E. Bald, w *The XXVth Sci. Symp. "Chromatogr. Met. Invest. Org. Comp."*, Katowice-Szczyrk 5-6.06.2002.
112. C. O'Gara, K. Maddipati, L. Marnett, *Chem. Res. Toxicol.*, **2**(1989)295.
113. M. Asensi, J. Sastre, F.V. Pallardo, A. Lloret, M. Lehnor, J.G. Asucion, *Met. Enzymol.*, **295**(1999)267.
114. K.P. Miltor, T. Działosynski, S.E. Sanford, J.R. Trevithicle, *Curr. Eye Res.*, **16**(1997)564.
115. A.T. Diplock, *Free Rad. Res.*, **33**(2000)521.
116. W.A. Pryor, T. Strickland, D.F. Church, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**(1988)2224.
117. T. Doba, G.W. Burton, K.U. Ingold, *Biochim. Biophys. Acta*, **835**(1985)298.
118. G. Cao, H.M. Alessio, R.G. Cutler, *Free Radic. Biol. Med.*, **14**(1993)303.
119. G. Cao, R.G. Cutler, *Arch. Biochem. Biophys.*, **320**(1995)106.
120. K. Głód, K. Stańczak, A. Woźniak, W. Pakszys, *Farmac. Pol.*, **49**(2003)S26-S30.