

*Zakład Farmakologii Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych
Akademii Rolniczej w Lublinie

**Instytut Przemysłu Mięsnego i Tuszczowego, ul. Jubilerska 4, 04-190, Warszawa

CEZARY KOWALSKI*, MAŁGORZATA POMORSKA*,
BRONISŁAW K. GŁÓD**, ANNA KONIOR**

*Zastosowanie metody fluorymetrycznej do oszacowania
całkowitego potencjału antyoksydacyjnego*

Total antioxidant potential measurement using improved fluorometric assay

STRESZCZENIE

Całkowity potencjał antyoksydacyjny (CPA) opisuje właściwości antyoksydacyjne złożonych układów biologicznych (takich jak ekstrakty ziół czy osocze krwi) często lepiej niż stężenia wszystkich antyoksydantów zawartych w próbce mierzonych oddzielnie. W pracy przedstawiono i porównano metody wyznaczenia CPA odniesione do różnych wolnych rodników. Metody te wykorzystują termolabilny związek AAPH [2,2'-diazobis (2-amidinopropan) dichlorowodorku], generujący rodniki peroksyłowe, reakcję Fentona, w wyniku której wytwarzane są rodniki hydroksylowe i SIN-1 (3-morfolino-sydnonimin) generujący nadtlenoazotyny. Rodniki te utleniają analizowane próbki i tzw. „detektor”. Próbką współzawodniczy z detektorem w reakcji z wolnymi rodnikami, co opóźnia pojawienie się sygnału detektora. Opóźnienie to, zależne od stężenia antyoksydantów w próbce, stanowi podstawę analizy wyników. Pomiar CPA, odnoszące się do różnych wolnych rodników, wykonano na próbkach ekstraktów ziół i napojów alkoholowych.

Słowa kluczowe: wolne rodniki, antyoksydanty, całkowity potencjał antyoksydacyjny, fluorymetria

WSTĘP

Wolne rodniki są uwikłane w patogenezę wielu chorób, w tym nowotworów, chorób Alzheimera i Parkinsona, czy też miażdżycy. Mają także znaczący udział w procesach degeneracyjnych, zachodzących w komórkach w czasie ich starzenia się i śmierci [Halliwell 1994, Głód i in. 2000]. Obserwowane w patologii zmiany w stężeniach antyoksydantów są wynikiem ich współdziałania z wolnymi rodnikami. W literaturze przedmiotu są opisy wielu metod wyznaczenia stężenia każdego z wolnych rodników [Głód i in. 2000]. Można oznaczyć stężenia poszczególnych antyoksydantów, wydaje się jednak, że oszacowanie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (CPA) jest zdecydowanie bardziej użyteczne [Valkonen i Kuusi 1999, Malinka i in. 2002]. Współdziałanie między różnymi antyoksydantami skutkuje często lepszą ochroną niż można by sądzić po własnościach antyoksydacyjnych poszczególnych związków. Przykładem może być glutation, który regeneruje askorbinian czy sam kwas askorbinowy, odtwarzający α -tokoferol [Halliwell 2000]. Warto

zaznaczyć, że stres oksydacyjny i całkowity potencjał antyoksydacyjny są to wielkości skorelowane ze sobą. Zdolność do wymiatania wolnych rodników jest różnie definiowana, a samo zjawisko jest też różnie nazywane (TAC – total antioxidant capacity, FRAP – ferric reducing ability of plasma, TRAP – total redox antioxidant potential, ORAC – oxygen radical absorbance capacity, TEAC – trolox-equivalent antioxidant capacity czy TAR – total antioxidant reactivity) [Buhmann i in. 2004]. W tej pracy będzie używana nazwa całkowity potencjał antyoksydacyjny, CPA. Metody pomiaru CPA zostały opracowane do oszacowania zdolności antyoksydacyjnej złożonych próbek biologicznych, takich jak osocze krwi. Testy te wykorzystują generatory różnych wolnych rodników (zwykle są to termolabilne związki diazowe, generujące rodniki peroksylove) i utlenianie analizowanych próbek. Próbkę dodana do mieszaniny reakcyjnej opóźnia współdziałanie pomiędzy detektorem a wolnym rodnikiem. Wyniki pomiarów oznaczane są na podstawie opóźnienia zajścia reakcji detektor-rodnik, w czasie którego zużywane są antyoksydanty zawarte w analizowanym materiale. Istotne jest, aby stała szybkości reakcji utleniania próbki była dużo większa niż stała szybkości utleniania związku używanego jako detektor. Metody opisane w literaturze opierają się na wygenerowaniu rodników peroksylove i pomiarze kinetyki fluorescencji lub chemiluminescencji produktu ich reakcji z tzw. detektorem, związkiem łatwym do wykrycia. Zwykle jako detektor stosuje się pochodne fluoresceiny w pomiarach fluorescencyjnych, a luminol w pomiarach chemiluminescencyjnych [Wang i Joseph 1999]. Opisano także zastosowanie metody fotometrycznej do oznaczania potencjału antyoksydacyjnego w komórkach [Valkonem i Kuusi 1999].

Celem badań było sprawdzenie możliwości zastosowania metody fluorymetrycznej do oszacowania potencjału antyoksydacyjnego w stosunku do wygenerowanych rodników peroksylove, hydroksylove i nadtlendiozotynów. Metodę testowano na grupie naturalnych antyoksydantów.

MATERIAŁ

Odczynniki: diocetan 2,7-dichlorofluorescyny (DCFH-DA) 2,2'-diazobis (2-amidinopropan) dichlorowodorek (AAPH – generator rodników peroksylove), chlorowodorek 3-morfolino-sydnoniminu (SIN-1 – generator nadtlendiozotynów) oraz bufor fosforanowy w tabletkach (phosphate buffered saline, PBS) zakupiono w firmie Sigma (St. Louis, MO, USA). Pozostałe odczynniki były klasy cz.d.a. i stosowano je bez dalszego oczyszczania. Wodę Milli-Q (Millipore, Bedford, USA) używano do przygotowania wszystkich roztworów.

Do badań wykorzystano także zieloną herbatę, aronię i imbir. Napoje alkoholowe stosowane w pomiarach (Wódka Żołądkowa Gorzka – Polmos, Lublin, Polska; Bols Vodka – Bols Royal Distillers, Amsterdam, Holandia; Unicum Herb Liqueur – Zwack Unicum Co. Ltd., Węgry; Salmiaki Cosken Corva – Altia Oyj, Helsinki, Finlandia; Metaxa – S.αE.αA. Metaxa, A.B.E. Grecja; Whisky Johnnie Walker – Red Label, Szkocja) zakupione zostały w pobliskim supermarkiecie.

Aparatura: produkt utleniania DCFH mierzono przy użyciu czytnika fluorescencji z płytek (Thermo Labsystems, Finland); pomiary wykonywano w temperaturze pokojowej, zastosowano długości fali wzbudzenia i emisji odpowiednio 485 i 538 nm; poziom fluorescencji mierzono co minutę.

METODA

W przeprowadzonych badaniach używano jako detektora diocetan 2,7-dichlorofluorescyny (DCFH-DA), która pod wpływem esteraz komórkowych ulega przekształceniu do dichlorofluorescyny (DCFH). Ostatecznie, po reakcji z rodnikiem peroksylovym, otrzymuje się dichlorofluoresceinę (DCF), która charakteryzuje się maksimum adsorpcji przy 520 nm.

Pomiary całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (CPA) w stosunku do rodników peroksylove oparto na zmodyfikowanej procedurze Valkonena i Kuusi [1997], w której rodniki peroksylove generowane są metodą rozkładu termicznego AAPH (końcowe stężenie – 56 mM).

W pierwszym etapie reakcji pojawiają się dwa rodniki węglowe, które następnie szybko reagują z cząsteczkami tlenu, dając rodniki peroksyłowe. Ich stężenie mierzono poprzez konwersję diocetanu dichlorodihydrofluorescyny (DCFH-DA) do silnie fluoryzującej dichlorofluoresceiny (DCF). Reakcję przeprowadzano w 50 mM roztworze PBS w 24°C. DCFH-DA rozpuszczano w DMSO, a następnie dwukrotnie rozcieńczano wodą do końcowego stężenia 14 μM .

Rodniki hydroksyłowe były generowane w reakcji Fentona. 0,5 mM Fe^{2+} i 2 mM H_2O_2 inkubowano w 5 mM buforze fosforanowym (pH 7,4) w obecności 1 mM pHBA w 37°C. SIN-1, donor nadtlenuazotynów (końcowe stężenie 200 μM) został wykorzystany do generowania tlenu azotu (NO). SIN-1 spontanicznie hydrolizuje w fizjologicznym pH do tlenu azotu NO i anionorodnika ponadtlenukowego O_2^- . Anion ten nie wpływa na fluorescencję DCF (1). Tlenek azotu, jak i wytworzony z nich nadtlenuazotyn utleniają DCFH, co zwiększa fluorescencję (3). Analizowana próbka przesuwana mierzone sigmoidalne krzywe kinetyczne. Mierzono czas, po jakim wartość fluorescencji wzrastała o zadaną wartość (w naszym przypadku wynosiła ona w jednostkach względnych 0,2). Wielkość ta, definiowana jako CPA, zależy od sumy iloczynów stężenia wszystkich antyoksydantów w próbce i ich stałych szybkości reakcji.

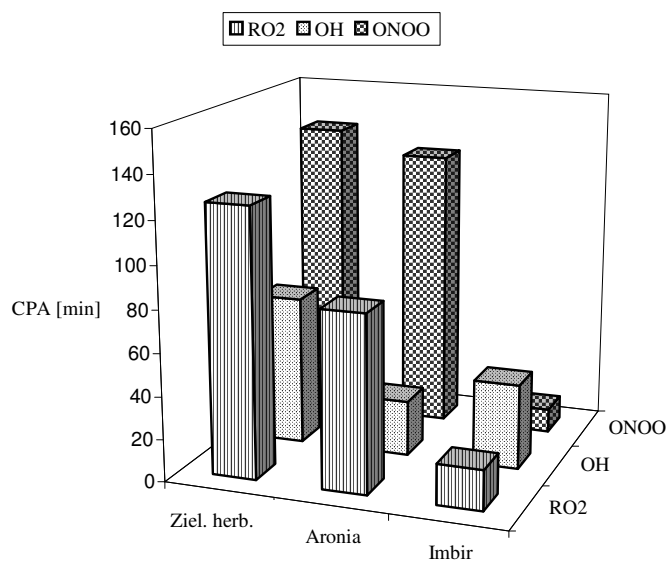
Pomiary powtarzano 3-krotnie dla każdej próbki. Wyniki uśredniono i wyrażono względem średniej wartości uzyskanej dla próbki kontrolnej. Wyjściowe roztwory ekstraktów analizowanych ziół przygotowano w stężeniu 10 mg/ml, zaś roztwory alkoholi w stężeniu 10 $\mu\text{l/ml}$. Roztwory przygotowano w wodzie Milli-Q.

Procedura doświadczalna została oparta na metodzie, w której produkty reakcji wygenerowanych wcześniej rodników peroksyłowych z DCFH były mierzone fluorometrycznie. Nie używano esterazy, DCFH-DA rozpuszczano w DMSO (50% końcowej objętości). Sigmoidalne krzywe kinetyczne uzyskane dla badanych próbek były przesunięte względem krzywych uzyskanych dla próbek niezawierających antyoksydantów. Dla każdej krzywej określono czas, po którym kinetyczna krzywa fluorescencyjna przyrasta o 0,2 swojej wartości początkowej. Różnice między wyznaczonymi z krzywych czasami dla próbki z antyoksydantem i bez niego były miarą całkowitego potencjału antyoksydacyjnego CPA.

WYNIKI I DYSKUSJA

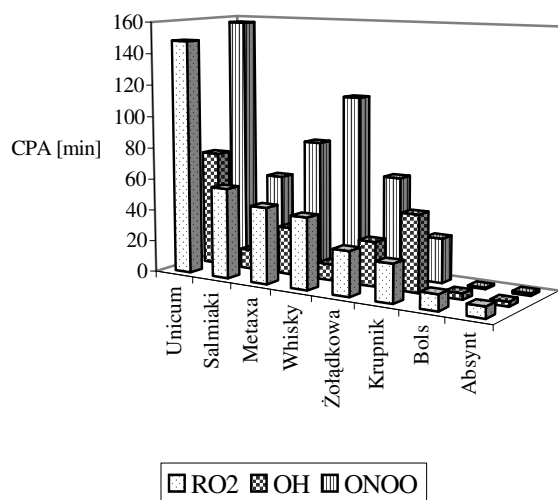
W ostatnim czasie obserwuje się wzrost zainteresowania naturalnymi antyoksydantami, wśród nich zwłaszcza barwnikami roślinnymi – flawonoidami i antocyjanami. Przykładem może tu być antocyjan C3G (3-O- β -D glikozyd cyjanidyny) i jego aglikol – cyjanidyna. Związki te, obecne w wielu herbatach i ziołach, są silnymi antyoksydantami [Tsuda i in. 2000]. Szczególnie duże ich ilości znajdują się w aronii (*Aronia melanocarpa*). Cyto- i neuroprotektoryjne właściwości tych związków są szeroko opisywane w literaturze. Szczególnie bogatym we flawonoidy ziołem jest herbata. Jej prozdrowotne właściwości są znane już od czterech tysięcy lat.

Wartości CPA 1 mg/ml ekstraktów ziół, odniesione do rodników hydroksyłowego i peroksyłowego oraz nadtlenuazotynu, przedstawiono na rys. 1. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że najsilniejszymi właściwościami antyoksydacyjnymi ze wszystkich badanych substancji charakteryzowała się zielona herbata (przy czym były one najsłabsze w stosunku do rodnika hydroksyłowego). Wartości CPA mocnych alkoholi objętych badaniem przedstawiono na rys. 2. Stwierdzono, że najsilniejszym antyoksydantem wśród alkoholi był węgierski Unicum. Ponadto potwierdzono spostrzeżenie, że względne wartości CPA zależą od generowanego rodnika, co oznacza, że zawsze powinny być one odniesione do rodnika, którego dotyczą wykonywane pomiary.



Rys. 1. Wartości CPA 1 mg/ml ekstraktów ziół, odniesione do rodników hydroksylowego i peroksyłowego oraz nadtlenoazotynu

Fig. 1. TAP values of 1mg/ml of herb extracts related to peroxy and hydroxyl radicals and peroxy nitrite



Rys. 2. Wartości CPA badanych alkoholi

Fig. 2. TAP values of the examined alcohols

Zgodnie z wyprowadzonym równaniem CPA, odniesionym do rodnika peroksyłowego, powinno się ono charakteryzować liniową krzywą kalibracji, co zostało potwierdzone w badaniach. Liniowa krzywa kalibracji umożliwia łatwe porównywanie wyników różnych próbek. Krzywe kalibracyjne odniesione do rodnika hydroksyłowego i nadtlenoazotynu nie wykazywały zależności liniowej, w tych przypadkach otrzymano zależności wykładniczą i logarytmiczną.

PIŚMIENNICTWO

- Bass D.A., Parce J.W., Dechatelet L.R., Szejda P., Seeds M.C., Thomas M. 1983. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.* 130, 1910–1917.
- Buhmann C., Arlt S., Kontush A., Moller-Bertram T., Sperber S. 2004. Plasma and CSF markers of oxidative stress are increased in Parkinson's disease and influenced by antiparkinsonian medication. *Neurobiol. Disease* 15, 160–170.
- Gabriel C., Camnis A., Sureda F.X., Aquirre L., Escubedo E., Pallas M., Comarasa J. 1997. Determination of nitric oxide generation in mammalian neurons using dichlorofluorescein diacetate and flow cytometry. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 38, 93–98.
- Ghiselli A., Serafini M., Nautella F., Scaccini C. 2000. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Rad. Biol. Med.* 29, 1106–1114.
- Głód B.K., Czapski G.A., Haddad P. 2000. Application of high-performance liquid chromatography to the of free radical reactions in biological systems. *Trends Anal. Chem.* 19, 492–449.
- Halliwell B. 1994. Free radicals, antioxidants and human diseases: Curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344, 721–724.
- Halliwell B. 2000. The antioxidant paradox. *Lancet* 355, 1179–1180.
- Malinka W., Kaczmarz M., Filipek B., Sapa J., Głód B. 2002. Preparation of novel derivatives of pyridothiazine-1,1-dioxide and their CNS and antioxidant properties. *Farmaco.* 57, 737–746.
- Tsuda T., Horio F., Osawa T. 2000. The role of anthocyanins as an antioxidant under oxidative stress in rats. *BioFactors.* 13, 133–139.
- Valkonen M., Kuusi T. 1997. Spectrophotometric assay for total peroxy radical-trapping antioxidant potential in human serum. *J. Lipid Res.* 38, 823–833.
- Wang H., Joseph J.A. 1999. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Rad. Biol. Med.* 27, 612–616.

SUMMARY

Total Antioxidant Potential (TAP) frequently better describes the antioxidant properties of the complex biological samples (such as herbal extracts or blood plasma) than concentrations of all individual antioxidants in the sample. In the paper improved fluorometric assays of the TAP measurements have been described. These tests adopt thermolabile diazocompound [2,2'-diazobis (2-amidinopropane) dihydrochloride – AAPH] generating peroxy radical, Fenton reaction produced hydroxyl radicals and SIN-1 (3-morpholino-sydnonimine) generating peroxy nitrite. These radicals oxidize the analyzed samples and so called „detector”. Sample competes with the reaction between detector and radical; therefore, it delays this reaction. Results are calculated from the delay time during which antioxidants are consumed. Assays related to different radicals are described and compared. They will be tested measuring antioxidant potentials of different herb extracts and alcohol compounds.

Key words: free radicals, antioxidant, Total Antioxidant Potential, fluorometry