

Received: 2016.06.16  
Accepted: 2017.09.10  
Published: 2017.07.30

## Metody oznaczania właściwości przeciwutleniających fitozwiązków w systemach komórkowych z wykorzystaniem zjawiska fluorescencji/luminescencji\*

Determination of antioxidant activity of phytochemicals in cellular models by fluorescence/luminescence methods

Izabela Koss-Mikołajczyk<sup>1</sup>, Monika Baranowska<sup>1</sup>, Jacek Namieśnik<sup>2</sup>, Agnieszka Bartoszek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Chemii Analitycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

<sup>2</sup>Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

### Streszczenie

Od czasu odkrycia roli reaktywnych form tlenu (RFT) w etiologii tzw. chorób cywilizacyjnych, obejmujących nieinfekcyjne chroniczne choroby, takie jak nowotwory, cukrzyca czy nadciśnienie tętnicze oraz możliwości wykorzystania związków o charakterze przeciwutleniaczy w walce z tymi chorobami, naukowcy opracowali wiele metod służących do oznaczania aktywności przeciwutleniającej, zarówno czystych związków chemicznych, jak i ekstraktów roślinnych czy suplementów diety. Metody są przeważnie oparte na prostych reakcjach chemicznych między przeciwutleniaczem a modelowymi wolnymi rodnikami (np. testy ABTS, DPPH) lub jonami metali (np. FRAP czy CUPRAC). Jednak metody chemiczne zazwyczaj nie odzwierciedlają rzeczywistej aktywności przeciwutleniaczy w żywym organizmie. Przyczyną jest to, iż metody te nie tylko wykorzystują нефизjologiczne warunki pH i temperatury, ale również nie uwzględniają metabolizmu przeciwutleniaczy w organizmie ani ich transportu wewnątrz komórki. Idealnym modelem do oceny aktywności związków o charakterze przeciwutleniaczy byłby model ludzki, jednak zarówno badania z udziałem ludzi, jak i testy na zwierzętach są bardzo złożone, a ich wyniki często niejednoznaczne. Najlepszą alternatywą zarówno dla testów chemicznych, jak i badań z udziałem ludzi są obecnie testy wykorzystujące modele komórkowe. Są znacznie tańsze, a przy tym odwzorowują systemy biologiczne lepiej od testów chemicznych. Komórkowe testy oznaczania aktywności przeciwutleniającej są bowiem prowadzone w fizjologicznym zakresie pH i temperatury oraz - co najważniejsze - uwzględniają metabolizm oraz transport komórkowy. W artykule opisano metody oznaczania aktywności przeciwutleniającej w systemach komórkowych z wykorzystaniem zjawisk luminescencji lub fluorescencji.

**Słowa kluczowe:** reaktywne formy tlenu • przeciwutleniacze • komórkowe testy przeciwutleniające

\* Publikację przygotowano w ramach projektu badawczego: „Szereg Mocy Przewodzącej jako narzędzie pozwalające na racjonalne projektowanie i ocenę właściwości prozdrowotnych żywności funkcjonalnej zawierającej związki fitochemiczne” (nr rejestracyjny wniosku 2014/14/A/ST4/00640), finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu „MAESTRO 6”.

## Summary

As soon as the role of Reactive Oxygen Species (ROS) in so-called civilization diseases, which include non-infectious chronic diseases such as cancer, diabetes or high blood pressure has been discovered, and the possibility of employing antioxidants as a remedy for these diseases have been proposed, scientists developed a broad spectrum of methods to determine antioxidant activity of pure chemicals and plant extracts, as well as dietary supplements. Most of these methods are based on simple redox reactions between antioxidant and ROS (for example ABTS, DPPH, or FRAP tests). However, chemical methods of assessing antioxidant activity are rarely biologically relevant. They do not mirror the real effect of antioxidants in living organisms, because they are used in non-physiological conditions of temperature and pH; neither they take metabolism nor intracellular transport under consideration. The perfect model for assessment of antioxidant activity in living organisms would be human or animal model, but such determinations are very complicated and often ambiguous. The current best alternative to chemical and human tests are assays employing cell culture models being less expensive than human tests, yet still reflecting biological systems more convincingly than chemical assays. Cellular antioxidant assays are performed under physiological pH and temperature, but most importantly, they take metabolism and intracellular transport under consideration. In this review, we present cellular tests used to determine antioxidant activity that are based on luminescence and fluorescence methods.

**Keywords:** reactive oxygen species • antioxidants • cellular antioxidant activity

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1244014>

**DOI:** ???

**Word count:** 4663

**Tables:** 4

**Figures:** 4

**References:** 58

**Adres autorki:** mgr inż. Izabela Koss-Mikołajczyk, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk; e-mail: iza.koss88@gmail.com

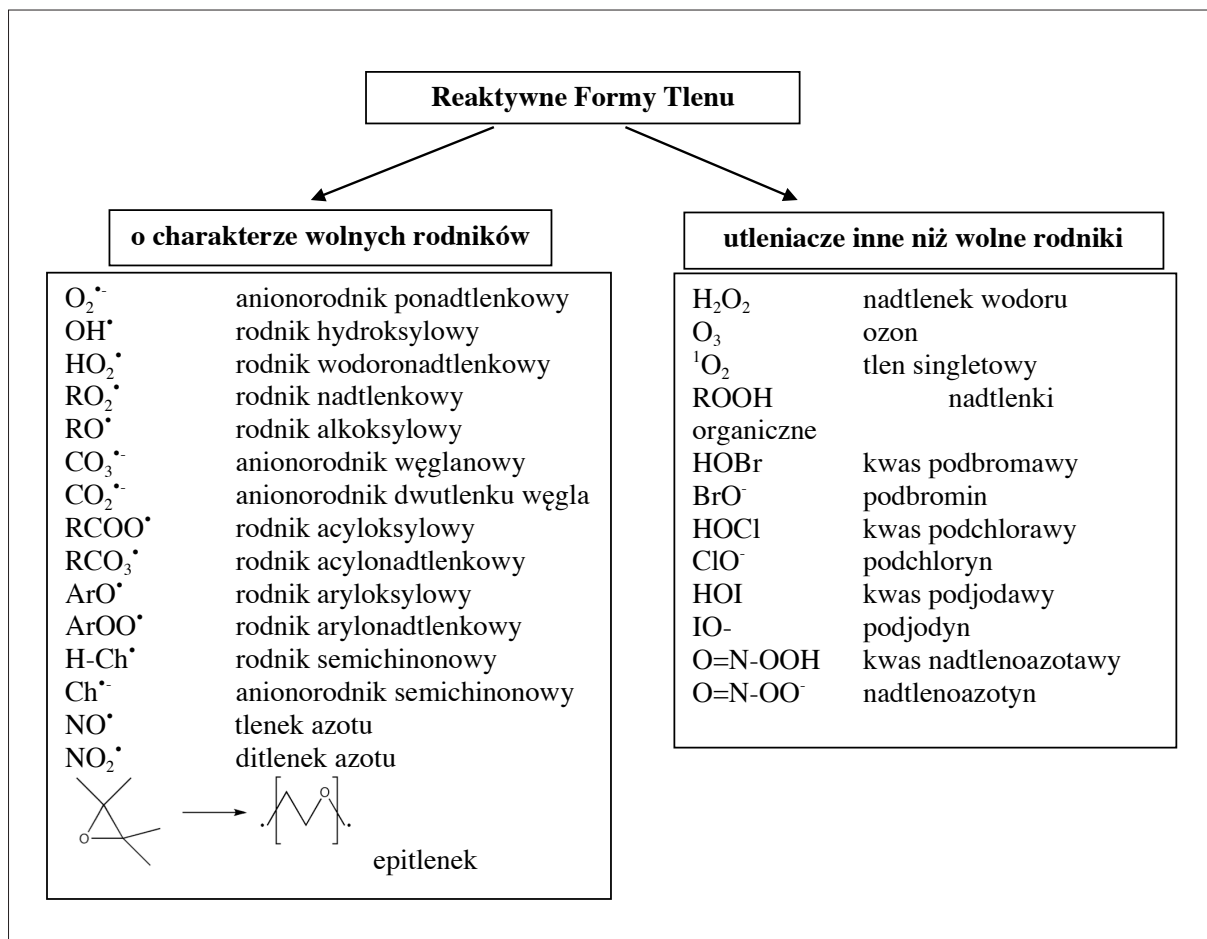
**Wykaz skrótów:** **AAPH/ABAP** – dihydrochlorek 2,2'-azobis(amidopropanu) (2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride); **ABTS** – sól diamonowa 2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu) (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) diammonium salt); **AIPH** - dihydrochlorek 2,2'-azobis[2-(2-imidazol-2-yl)propanu] (2,2'-azobis-[2-(2-imidazol-2-yl)propane] dihydrochloride); **AMVN** – 2,2'-azobis(2,4-dimetylowaleronitryl) (2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile)); **APF** – kwas 2-[6-(4V-amino)-fenoksy-3H-ksanten-3-on-9-yl]benzoesowy (2-[6-(4'-amino)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid); **CAA test** – test mierzący komórkową aktywność przeciwutleniającą (cellular antioxidant activity assay); **CBA** – metoda odbarwienia krocyny (crocin bleaching assay); **CUPRAC** – metoda oznaczania zdolności do redukcji jonów miedzi (II) (cupric ion reducing antioxidant capacity); **CV** – cykliczna woltammetria (cyclic voltammetry); **DCF** – 2,7-dichlorofluoresceina (2,7-dichlorofluorescein); **DCFH** – 2,7-dichlorodihydrofluoresceina (2,7-dichlorodihydrofluorescein); **DCFH-DA** – dioctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate); **DHE** – dihydroetydyna (dihydroethidium); **DHR** – dihydrorodamina (dihydrorhodamine); **DMSO** – dimetylosulfotlenek (dimethyl sulfoxide); **DNA** – kwas deoksyrybonukleinowy (deoxyribonucleic acid); **DPMD** – dichlorowodorek dimetylo-p-fenylenodiaminy; **DPPH** – 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl); **DPPP** – difenylo-1-pyrenylofosfina (diphenyl-1-pyrenylphosphine); **DPV** – woltammetria pulsowa różnicowa (differential pulse voltammetry); **FCR** – odczynnik Folin-Ciocalteu (Folin-Ciocalteu reagent); **FRAP** – metoda oznaczania zdolności redukcji jonów żelaza (III) (ferric ion reducing antioxidant parameter); **HPF** – kwas 2-[6-(4V-hydrokso) fenoksy-3H-ksanten-3-on-9-yl] benzoesowy (2-[6-(4'-hydroxy)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid); **LDL** – lipoproteina o niskiej gęstości (low density lipoprotein); **LPIC** – metoda oznaczania inhibicji utlenienia frakcji LDL (lipid peroxidation capacity); **mtDNA** – mitochondrialny DNA (mitochondrial DNA); **NADH** – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (nicotinamide adenine

dinucleotide); **ORAC** – metoda oznaczania zdolności absorpcji rodników tlenowych (oxygen radical absorbance capacity); **RFA** – reaktywne formy azotu (RNS - reactive nitrogen species); **RFT** – reaktywne formy tlenu (ROS – reactive oxygen species); **TOSC** – metoda oznaczania całkowitej zdolności wychwytywania rodników tlenowych (total oxidant scavenging capacity); **TPTZ** – 2,4,6-tripirydylo-5-tiazyna (2,4,6-tripirydylo-5-triazyna); **TRAP** – metoda oznaczania całkowitej zdolności zmiatania wolnych rodników (total redox antioxidant parameter); **UV** – promieniowanie ultrafioletowe (ultra-violet).

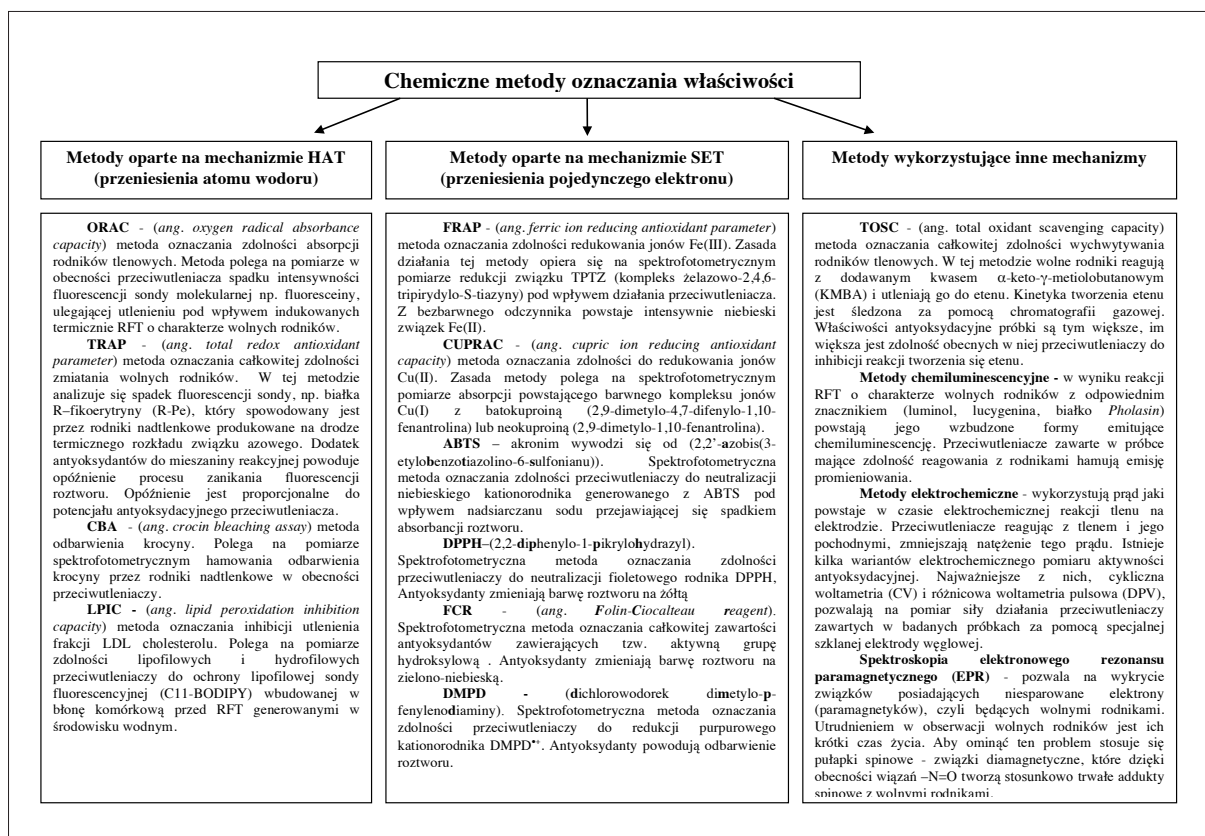
## HOMEOSTAZA REDOKSOWA

Reaktywne formy tlenu (RFT) są chemicznie aktywnymi cząsteczkami powstającymi przeważnie w enzymatycznych lub nieenzymatycznych reakcjach metabolizmu komórkowego. Do reakcji enzymatycznych należą zaangażowane przede wszystkim w łańcuch oddechowy, fagocytozę, syntezę prostaglandyn i układ cytochromu P-450. RFT mogą być również generowane w wyniku nieenzymatycznych reakcji tlenu ze związkami organicznymi oraz w odpowiedzi na niekorzystne dla komórek czynniki środowiskowe, takie jak promieniowanie jonizujące lub nadfioletowe, czy też toksyczne związki chemiczne [27]. Informacje o rodzajach RFT i ich klasyfikację przedstawiono na ryc. 1.

Rola RFT oraz reaktywnych form azotu (RFA) jest przedmiotem obszernych badań dotyczących tzw. stresu oksydacyjnego, jak i udziału w komórkowych szlakach sygnalizacyjnych. Do niedawna uważano, że RFT mają tylko szkodliwy wpływ na ludzki organizm, a skutki ich działania w komórkach wiązano głównie ze stanami patologicznymi. Koncentrowano się na udziale RFT w etiologii wielu chorób przewlekłych, określanych często mianem chorób cywilizacyjnych. Obecnie zwraca się uwagę na „drugą twarz” RFT, czyli na ich funkcje fizjologiczne, takie jak udział w zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych szlakach sygnalizacyjnych zaangażowanych w procesy proliferacji, różnicowania i apoptozy komórek [35,54,58]. Stwierdzono również, że RFT nie zagrażają prawidłowemu funkcjonowaniu komórek dopóki



Ryc. 1. Klasyfikacja i rodzaje reaktywnych form tlenu [2]

Ryc. 2. Klasyfikacja klasycznych metod *in vitro* oznaczania właściwości przeciwutleniających

jest utrzymywana w nich tzw. homeostaza redoksowa, czyli stan równowagi między ilością RFT a stężeniem substancji przeciwutleniających. W warunkach fizjologicznych poziom RFT jest kontrolowany przez antyoksydacyjny system obrony organizmu. Dopiero nadmiar RFT, które nie zostały zneutralizowane w komórkach może wywołać stan stresu oksydacyjnego, w wyniku którego może dochodzić do uszkodzeń oksydacyjnych wielu cząsteczek, w tym lipidów, białek i kwasów nukleinowych [34,40,42].

Uważa się, że zagrożeniom tym zapobiega nie tylko wspomniany antyoksydacyjny system obrony organizmu, ale także substancje przeciwutleniające spożywane z pokarmami, szczególnie pochodzenia roślinnego. Przeciwutleniacze można zdefiniować jako substancje redukujące i/lub antyrodnikowe, które przeciwdziałają powstawaniu w komórkach zniszczeń spowodowanych działaniem RFT. Definicja dotyczy niskocząsteczkowych związków chemicznych o wysokim potencjale redukcyjnym. Jednak również makrocząsteczki mogą przeciwdziałać szkodliwym skutkom utleniania, takie jak enzymy, czy pewne struktury komórkowe. Są również określane mianem antyoksydantów, pojęcie to zaczerpnięte z języka angielskiego odnosi się do wszystkich cząsteczek zdolnych do wychwytu i/lub redukcji prooksydantów. Wyróżnia się 5 mechanizmów działania antyoksydantów:

- antyoksydanty tworzące fizyczną barierę przeciwdziałającą powstawaniu RFT i ich wnikanii do ważnych struktur biologicznych, np. substancje redoks aktywne w błonie komórkowej czy filtry UV,
- pułapki chemiczne absorbujące energię bądź wiążące elektrony pochodzące z RFT, czyli związki najbardziej kojarzące się z podaną definicją przeciwutleniaczy, do których należą np. karotenoidy czy antocyjany,
- systemy katalityczne odpowiedzialne za neutralizację RFT, np. enzymy antyoksydacyjne, takie jak dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationowa czy katalaza,
- antyoksydanty zdolne do chelatowania jonów metali i w wyniku tego zapobiegające powstawaniu RFT, np. katechiny,
- antyoksydanty przerywające łańcuch reakcji utleniania przez wylapywanie RFT, np. kwas askorbinowy czy tokoferole [21].

Zrozumienie roli zaburzonej homeostazy redoksowej w patogenezie nieinfekcyjnych chorób przewlekłych, takich jak miażdżycy, nadciśnienie, cukrzyca, choroby neurodegeneracyjne, czy nawet nowotwory, zwróciło uwagę naukowców na znaczenie przeciwutleniaczy w przeciwdziałaniu i/lub spowalnianiu rozwoju oraz wspomaganiu leczenia tych chorób. Biomarkery stresu oksydacyjnego *in vivo* są zazwyczaj produkty utleniania lipidów, produkty oksydatywnej modyfikacji

białek i cukrów, pęknięcia nici DNA oraz produkty utlenienia zasad azotowych, jak również utlenienia endogennych przeciwutleniaczy. Wykorzystanie próbek ludzkich potwierdziło wpływ przeciwutleniaczy oraz diety w nie bogatej na obniżenie poziomu biomarkerów stresu oksydacyjnego w ludzkim organizmie [14]. Wpływ był bardziej widoczny, gdy obiektem badań były osoby narażone na podwyższony poziom stresu oksydacyjnego, np. cierpiące na nadciśnienie, niż gdy badano osoby zdrowe [21]. Przeciwutleniacze dostarczane z pożywieniem zaczęto zalecać w profilaktyce wspomnianych chorób przewlekłych, jako wsparcie naturalnego antyoksydacyjnego systemu obronnego przed uszkodzeniami wywołanymi stresem oksydacyjnym. Na przykład większość leków stosowanych w chemioterapii przeciwnowotworowej charakteryzuje się działaniem toksycznym na mięsień sercowy. Sugeruje się, że odpowiada za to stres oksydacyjny stymulowany w kardiomiocytach pod wpływem przyjmowanych leków. Dieta wzbogacona w fitozwiązki o aktywności przeciwutleniającej, podobnie jak syntetyczne związki antyoksydacyjne, może ograniczać niepożądane działania chemioterapii, takie jak kardiotoksyczność, jednocześnie nie obniżając terapeutycznej skuteczności leku [32].

Trzeba jednak podkreślić, iż w chorobach przewlekłych terapia z użyciem fitozwiązków nie może być podstawą leczenia, a jedynie wspomagać terapię środkami farmaceutycznymi. Natomiast w chorobach infekcyjnych,

takich jak np. grypa, przeziębienie czy stany zapalne, preparaty lecznicze na bazie naturalnych ekstraktów o dużej zawartości przeciwutleniaczy mogą jednak być podstawą terapii i cieszą się rosnącą popularnością wśród pacjentów.

### CHEMICZNE METODY OZNACZANIA WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWUTLENIAJĄCYCH

Aktywność przeciwutleniająca różnych substancji pochodzenia naturalnego, m.in. preparatów ziołowych czy składników żywności, była oznaczana w niezliczonej liczbie eksperymentów z użyciem wielu metod i w różnych warunkach. Niestety, często brakuje korelacji między wynikami uzyskanymi dla tego samego materiału z użyciem różnych metod, a nawet między wynikami uzyskanymi dla tego samego materiału i tą samą metodą w różnych laboratoriach badawczych [30]. Chemiczne metody oznaczania zdolności przeciwutleniającej są oparte na pomiarze wpływu przeciwutleniaczy na szybkość procesów utlenienia zachodzących w próbce (ORAC i TRAP), redukcji jonów metali, np. żelaza (FRAP), czy miedzi (CUPRAC), zdolności wyłapywania syntetycznego rodnika (ABTS, DPPH) lub też pomiarze ilości produktów utlenienia lipidów lub frakcji LDL [17]. Informacje o klasyfikacji chemicznych metod i mechanizmach wykorzystywanych do oznaczania właściwości przeciwutleniających zestawiono na rycinie 2.

**Tabela 1.** Porównanie stosowanych do oceny aktywności przeciwutleniającej metod chemicznych i metod umożliwiających pomiar w systemach komórkowych [17]

	Metody chemiczne	Metody wykorzystujące systemy komórkowe
Zasada metody	Opierają się na znanych reakcjach chemicznych	Opierają się na interakcji pomiędzy badanymi związkami a skomplikowanymi reakcjami enzymatycznymi w systemach biologicznych
Ekstrakcja związków aktywnych	Dopuszczalne zastosowanie różnych rozpuszczalników	Test musi być prowadzony w roztworze soli fizjologicznej; ograniczone zastosowanie rozpuszczalników
Użycie rozpuszczalników alkoholowych	Dopuszczalne, jeśli nie wchodzi w reakcje z odczynnikami używanymi w teście	Dopuszczalne, pod warunkiem iż są one odpowiednio rozcieńczone i przetestowana została tolerancja komórek na dany rozpuszczalnik
Użycie DMSO jako rozpuszczalnika	Dopuszczalne, jeśli nie wchodzi w reakcje z odczynnikami używanymi w teście	Niedopuszczalne, może powodować wzrost wytwarzania RFT w mitochondriach
Analiza i interpretacja danych	ilościowa	ilościowa
Oczekiwana liniowa zależność aktywności od stężenia	tak	nie

Ze względu na wspomnianą wcześniej dużą różnorodność RFT i mechanizmów ich działania (ryc. 1) żadnej z powyższych metod oznaczania aktywności przeciwutleniającej nie można uznać za uniwersalną. Co najważniejsze, mimo powszechnego stosowania testów chemicznych możliwość przewidywania na ich podstawie aktywności przeciwutleniającej w warunkach *in vivo* jest kwestionowana z kilku powodów. Testy chemiczne, jak już wspomniano, są wykonywane w нефизjologicznym zakresie pH i temperatury, ponadto żaden z nich nie uwzględnia wpływu biodostępności, dawki, ani przemian metabolicznych badanego przeciwutleniacza w żywej komórce.

### **ZALETY PROWADZENIA OZNACZANIA AKTYWNOŚCI PRZECIWUTLENIAJĄCEJ W UKŁADACH KOMÓRKOWYCH**

Ograniczenia w interpretacji wyników uzyskanych metodami chemicznymi do oznaczania aktywności przeciwutleniającej sprawiły, że rozpoczęto poszukiwania metod, które zapewnią możliwość uzyskania wyników lepiej odzwierciedlających los przeciwutleniaczy w komórkach i żywych organizmach. Jedną z pierwszych metod zaproponowanych do oceny wpływu przeciwutleniaczy na poziom stresu oksydacyjnego w komórkach był tzw. test kometowy (elektroforeza pojedynczych komórek w żelu agarozowym). Test służący do wykrywania fragmentacji jądrowego DNA, po odpowiednich modyfikacjach pozwala wykazać ochronne działania przeciwutleniaczy. W tym przypadku w komórkach traktowanych czynnikiem wywołującym stres oksydacyjny, co może spowodować indukcję uszkodzeń nici DNA, obserwuje się zmniejszenie fragmentacji (ogona komety) w obecności substancji przeciwutleniającej [22,34]. Przeprowadzenie badań z użyciem testu kometowego umożliwia uzyskanie wyników, które mogą być źródłem informacji czy dana substancja jest zdolna do przeciwdziałania genotoksycznym uszkodzeniom wywołanym przez RFT. Uzyskane wyniki nie mogą być jednak podstawą do ilościowej oceny aktywności przeciwutleniającej różnych próbek czy też jednoznacznego stwierdzenia czy ochronne działanie wynikało z neutralizacji prooksydantów, czy też np. z indukcji naprawy DNA [22]. Bezpośrednimi metodami umożliwiającymi ocenę aktywności przeciwutleniającej w warunkach komórkowych są metody, w których zastosowano zostało zjawisko chemiluminescencji i fluorescencji i to one będą tematem dalszych rozważań.

Informacje, które można traktować jako porównanie głównych cech metod chemicznych i biologicznych stosowanych w oznaczeniach aktywności przeciwutleniającej zestawiono w tabeli 1. Na aktywność przeciwutleniającą w układach biologicznych wpływa wiele czynników, które muszą być uwzględniane podczas prowadzenia oznaczeń, jednym z głównych jest biodostępność. Aby spełnić swoją rolę przeciwutleniacze muszą zostać zaabsorbowane, przetransportowane do komórek czy tkanek i zakotwiczone w błonach biologicznych lub rozpuszczone w płynach ustrojowych. Dlatego też biodostępność oraz dawkę aktywną wyznacza się w wyniku analizy płynów ustrojowych (np. krew, mocz, ślina) i tkanek ludzkich bądź

zwierzęcych po spożyciu przeciwutleniaczy, oznaczając zarówno stężenia natywnych substancji, jak również produktów ich metabolizmu. W niektórych przeciwutleniaczach obserwuje się znaczące różnice aktywności antyoksydacyjnej w przypadku jej oznaczania w warunkach bezkomórkowych i *in vivo*.

Odpowiednio użyte układy komórkowe stosowane w badaniach mechanizmów stresu oksydacyjnego oraz ochronnego działania przeciwutleniaczy mogą być alternatywą dla badań klinicznych. Zaletami stosowania kultur komórkowych są możliwości porównania różnych linii komórkowych i różnych czynników stresogennych do oceny efektywności działania przeciwutleniaczy, jak również to, iż kultur komórkowych nie dotyczą ograniczenia (m.in. nie jest potrzebna zgoda komisji bioetycznych na prowadzenie badań), jakie należy brać pod uwagę prowadząc badania z udziałem ludzi. Zastosowanie modeli komórkowych pozwala również na szybką i stosunkowo niedrogą ocenę biodostępności, metabolizmu i bioaktywności przeciwutleniaczy. Do skutków działania przeciwutleniaczy monitorowanych w hodowli komórkowej zalicza się przede wszystkim zmniejszenie intensywności powstawania RFT, zahamowanie szybkości procesu utleniania lipidów, białek i DNA, jak również spowolnienie śmierci komórkowej. Przeciwutleniacze są dodawane do hodowli komórkowej jednocześnie z czynnikiem stresogennym lub komórki są z nimi preinkubowane w celu wnikięcia przeciwutleniaczy do wnętrza komórki [21].

Najczęściej stosowane metody oznaczania poziomu RFT w układach biologicznych polegają na pomiarze chemiluminescencji lub fluorescencji produktów powstałych w wyniku reakcji RFT z sondami, które wskutek utlenienia nabywają zdolności emitowania promieniowania [9,10,12,33]. Może to służyć detekcji prooksydantów generowanych w komórce, gdzie wzrost promieniowania jest skorelowany ze stężeniem RFT. Natomiast po wprowadzeniu antyoksydanta, można ocenić jego skuteczność w neutralizacji RFT, co będzie się objawiało tłumieniem promieniowania.

### **WYKORZYSTANIE CHEMILUMINESCENCJI W METODACH POMIARU AKTYWNOŚCI PRZECIWUTLENIAJĄCEJ**

Termin „chemiluminescencja” jest stosowany do określenia procesu emisji światła, która towarzyszy niektórym reakcjom chemicznym. W przypadku RFT z jej pomocą można m.in. wykryć tlen singletowy powstający w układach biologicznych. Wykorzystywane jest w tym przypadku to, że powrotowi tlenu singletowego do trypletowego stanu podstawowego towarzyszy emisja kwantu promieniowania elektromagnetycznego o długości fali około 1270 nm. Poza tlenem singletowym żadna inna cząsteczka występująca w układach biologicznych nie emituje światła w jednym wąskim pasmie o tej długości fali, ale ponieważ przypada ono na zakres podczerwieni, jego wykrycie wymaga stosowania specjalnych detektorów [20]. Inne RFT mogą być wykrywane metodami chemiluminescencyjnymi wyłącznie w wyniku reakcji z substancjami, których utlenione formy

**Tabela 2.** Luminofory stosowane jako źródła chemiluminescencji

Nazwa	Wzór strukturalny	Swoistość
Luminol		RFT
L-012 (analog Luminolu)		O2 <sup>-</sup> - ONOO <sup>-</sup>
Lucygenina		O2 <sup>-</sup>
ROS-Glo		H2O2

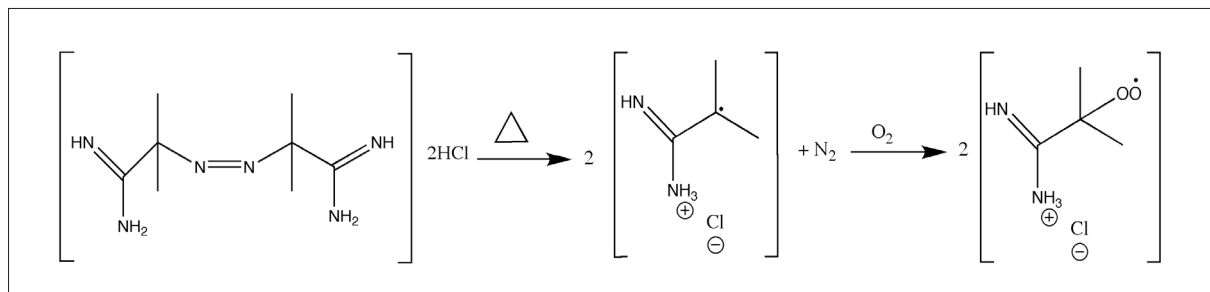
mają zdolność luminescencji. Także luminescencja emitowana przez tlen singletowy obecny w próbce jest zbyt niska, aby mogła być podstawą metody pomiaru. Istnieje jednak możliwość wzmocnienia (w przypadku obecności tlenu singletowego w roztworze) lub wywołania chemiluminescencji (w przypadku RFT innych niż tlen singletowy) przez przeprowadzenie pomiarów w roztworze związku – luminoforu, który po reakcji z RFT charakteryzuje się dużą wydajnością emisji światła. Po zastosowaniu luminoforów natężenie promieniowania może być mierzone za pomocą spektrofotometrycznego w światłoszczelną przystawkę do pomiaru luminescencji lub licznika scyntylicyjnego. Typowymi związkami o dużej wydajności emisji światła używanymi w tym badaniu są luminol i lucygenina (tabela 2).

Luminol ulega wzbudzeniu w mieszaninach reakcyjnych, w których są generowane różne rodzaje RFT. Przy czym najpierw trzeba przeprowadzić luminol do postaci rodnikowej, która następnie może przereagować z substratem. Wykorzystanie luminolu do wykrywania O<sub>2</sub><sup>-</sup> – ważnego biologicznie rodnika – jest natomiast problematyczne, bo mogą reagować bezpośrednio. Co wię-

cej rodnikowa postać luminolu może redukować O<sub>2</sub> do O<sub>2</sub><sup>-</sup>, co powoduje zafałszowanie wyników pomiarów [15]. Aby przezwyciężyć te trudności zsyntetyzowano analog luminolu – związek L-012 – wykazujący większą czułość od związku wyjściowego w stosunku do O<sub>2</sub><sup>-</sup> oraz ONOO<sup>-</sup>.

Lucygenina jest uważana za bardziej swoisty luminofor od luminolu w detekcji O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Jednak również ona nie reaguje z tym anionorodnikiem bezpośrednio. Musi najpierw zostać zredukowana do kationorodnika lucygeniny, który następnie reaguje z O<sub>2</sub><sup>-</sup> dając luminescencyjny produkt [15].

Luminol i lucygenina są obecnie wykorzystywane głównie do śledzenia komórkowych procesów generujących RFT. Oba wymienione luminofory mogą być także wykorzystane do oceny aktywności przeciwutleniającej badanych próbek. Przeciwdziałając procesom prooksydacyjnym lub neutralizując RFT, przeciwutleniacze będą miały wpływ na obniżenie chemiluminescencji badanej próbki. Oznaczony stopień tłumienia natężenia chemiluminescencji w stosunku do próbki kontrolnej bez przeciwutleniacza będzie miarą jego aktywności antyoksydacyjnej.



Ryc. 3. Termiczny rozkład AAPH

Zjawisko chemiluminescencji do wykrywania RFT, jak również oznaczania aktywności przeciwutleniającej próbek wykorzystwała firma Promega, która w 2015 r. wypuściła na rynek nowy test (ROS-Glo™) służący do wykrywania RFT z użyciem luminoforu, który pod wpływem  $H_2O_2$  obecnego w próbce przekształca się do prekursora lucyferyny. Lucyferyna reaguje z odczynnikiem lucyferyny ROS-Glo (zawierającym m.in. lucyferazę). Bierze udział w przekształcaniu prekursora lucyferyny do jej aktywnej luminescencyjnej postaci i emitowany jest sygnał świetlny proporcjonalny do stężenia  $H_2O_2$ . Jest to oczywiście słuszne przy założeniu, że większość RFT pod wpływem enzymów znajdujących się w komórkach (np. dysmutazy ponadtlenkowej) jest przekształcana do  $H_2O_2$ , który ze względu na stosunkowo długi okres półtrwania jest dobrym markerem stresu oksydacyjnego. W związku z tym spadek stężenia  $H_2O_2$  w komórkach, a co za tym idzie spadek luminescencji po dodaniu

do próbki związku o potencjalnym charakterze przeciwutleniającym, świadczy o jego aktywności antyoksydacyjnej. Dodatkową zaletą tego testu jest to, iż może być stosowany zarówno w systemach bezkomórkowych, jak i komórkowych umożliwiając porównania aktywności antyoksydacyjnej danej substancji *in vivo* i *in vitro*.

#### WYKORZYSTANIE ZJAWISKA FLUORESCENCJI W METODACH POMIARU AKTYWNOŚCI PRZECIWUTLENIAJĄCEJ

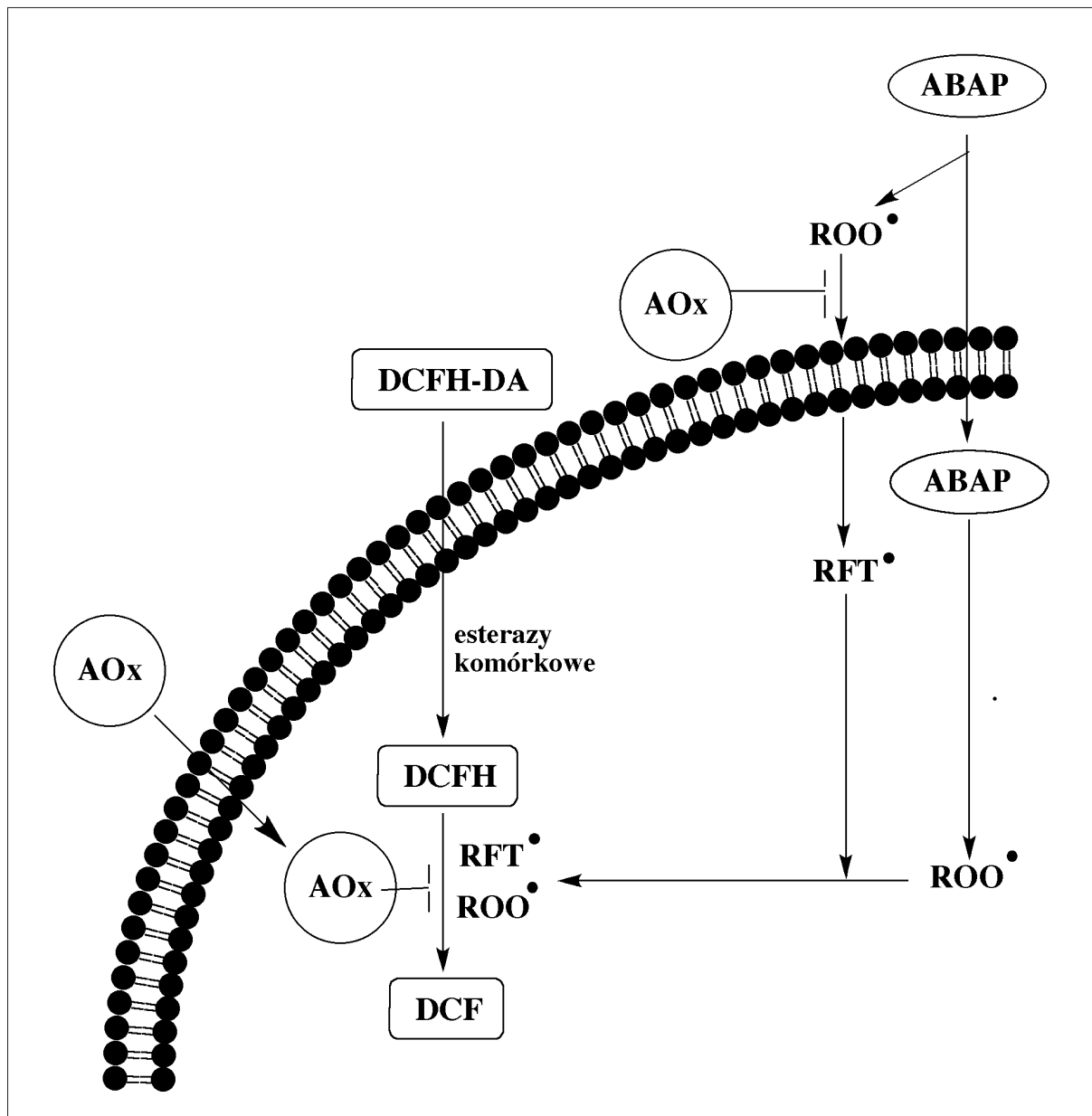
##### Kontrolowane źródła RFT

Niski poziom naturalnie występujących RFT uniemożliwia dokładny pomiar aktywności przeciwutleniającej. Dlatego aby ocenić zdolność przeciwutleniaczy do zmiatania wolnych rodników w systemach komórkowych *in vitro* stosuje się kontrolowane źródła tych reaktywnych cząsteczek. Powinny się charakteryzować

Tabela 3. Najczęściej stosowane kontrolowane źródła RFT

Skrót	Nazwa systematyczna	Wzór strukturalny	Stała szybkość tworzenia wolnych rodników pH=7,4	Okres połowicznego rozpadu w 37 °C, pH=7,4
AAPH lub ABAP	dihydrochlorek 2,2'-azobis (amidynopropanu)		$1,3 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ w 37°C [2]	175 h [16]
AIPH	dihydrochlorek 2,2'-azobis[2-(2-imidazol- 2-yl)propanu]		$2,6 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ w 37° [55]	101 h [55]
AMVN	2,2'-azobis(2,4- dimetylowaleronitryl)		$6,6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ w 40°C	90 h [24,25]





Ryc. 4. Schemat przemian 2,7'-dichlorofluorescyny zachodzących w komórkach podczas testu CAA na podstawie [52]; AOx - przeciwutleniacz, DCFH-DA – diocjan 2,7'-dichlorofluorescyny, DCFH - 2,7'-dichlorofluorescyna, DCF - dichlorofluoresceina, ABAP - dichlorowodorek 2,2'-azobis(2-amidynopropanu), RFT – reaktywne formy tlenu, ROO• - rodnik nadtlenkowy

stałą szybkością tworzenia, znanym okresem półtrwania oraz swoistym umiejscowieniu w obrębie komórki [2]. Takimi inicjatorami wolnych rodników mogą być związki azowe, które z powodzeniem są stosowane w wielu badaniach prowadzonych zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* ze względu na łatwość kontrolowania wymienionych parametrów. Najczęściej wykorzystywanym źródłem wolnych rodników w środowisku hydrofilowym jest dihydrochlorek 2,2'-azobis(amidynopropanu), określane skrótem AAPH lub ABAP, natomiast w środowisku lipofilowym 2,2'-azobis(2,4-dimetylowaleronitryl) - AMVN. AAPH ulega homolitycznemu rozpadowi pod wpływem tempera-

tury do azotu cząsteczkowego i dwóch rodników amidynopropanowych (ryc. 3), które reagując z tlenem przekształcają się w rodniki nadtlenkowe [51].

Okres półtrwania AAPH jest stosunkowo długi w porównaniu do innych kontrolowanych źródeł RFT (tabela 3), dzięki czemu szybkość tworzenia wolnych rodników w ciągu pierwszych kilku godzin jest stała. AAPH znajduje również zastosowanie do oznaczania peroksydacji lipidów w zawiesinach wolnych kwasów tłuszczowych. AMVN natomiast jest stosowany jako źródło rodników w badaniach nad peroksydacją miceli lipidowych lub błon komórkowych. Pomiar hamowania tych procesów

oksydacyjnych przez potencjalne przeciwutleniacze może być miarą ich skuteczności redukcyjnej.

Inna pochodna azowa, mianowicie dihydrochlorek 2,2'-azobis[2-(2-imidazol-2-yl)propanu] – AIPH, generuje dwa razy więcej wolnych rodników niż AAPH w tych samych warunkach (tabela 3). Stwierdzono, że AIPH można stosować w badaniach utleniania miceli, frakcji LDL cholesterolu, osocza oraz hodowli komórkowej *in vitro*, a zatem również potencjalnie w ocenie aktywności antyoksydacyjnej substancji [55].

Różnorodność dostępnych eksperymentalnych źródeł RFT umożliwia wybór takiego związku, który najlepiej odpowiada potrzebom przeprowadzanej procedury badawczej.

#### ZASTOSOWANIE SOND FLUORESCENCYJNYCH DO OZNACZANIA AKTYWNOŚCI PRZECIWUTLENIAJĄCEJ

Akumulacja RFT wewnątrz komórek oraz zdolność przeciwutleniaczy do ich neutralizacji może być mierzona z użyciem sond fluorescencyjnych. Najnowszą i najlepiej dopracowaną metodą określania aktywności przeciwutleniającej związków bioaktywnych w hodowli komórkowej jest test CAA (Cellular Antioxidant Activity), którego autorami są Wolf i wsp. [52]. Test powstał w celu zastąpienia chemicznych metod oznaczania aktywności antyoksydacyjnej, na podstawie których, jak wykazało doświadczenie, na ogół nie można przewidzieć skutku działania związków przeciwutleniających w warunkach *in vivo*. Badania z wykorzystaniem testu CAA są prowadzone w układach komórkowych, czyli w fizjologicznym zakresie pH i temperatury. Dodatkowo uwzględniono w nim biodostępność, dystrybucję oraz metabolizm przeciwutleniaczy w obrębie komórki, zatem w dużym stopniu odzwierciedla zachowanie badanych związków w warunkach *in vivo* [3,8,48,52].

W teście CAA jako marker stresu oksydacyjnego wykorzystuje się niepolarną sondę diocetan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (DCFH-DA). Sonda DCFH-DA w wyniku dyfuzji biernej wnika do wnętrza komórki ulegając w wyniku działania esteraz błonowych deacetylacji do bardziej polarnej postaci 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (DCFH). DCFH zostaje następnie uwieczona wewnątrz komórki i jeśli są obecne w otoczeniu RFT natychmiast jest przez nie utleniana do 2',7'-dichlorofluoresceiny (DCF) wykazującej właściwości fluorescencyjne (ryc. 4).

W pomiarach aktywności antyoksydacyjnej w komórkach celowo, w sposób kontrolowany jest stymulowany stres oksydacyjny. Syntetycznym źródłem RFT stosowanym w teście CAA jest opisywany wcześniej dichlorododok 2,2'-azobis(2-amidynopropanu) (ABAP), który po wnikięciu do komórki ulega samorzutnemu rozpadowi z wytworzeniem RFT. Powstałe nadtenki atakują lipidy błonowe, co indukuje peroksydację lipidów i powstanie jeszcze większej ilości RFT. Poziom fluorescencji DCF

jest proporcjonalny do poziomu indukowanych przez ABAP utleniaczy, które utleniły sondę DCFH do jej fluorescencyjnej postaci DCF [48,52]. Przeciwutleniacze czy zawierające je ekstrakty roślinne oraz inne związki o charakterze przeciwutleniaczy chronią DCFH, a często także lipidy błonowe, przed utlenieniem przez co zmniejszają fluorescencję traktowanych ABAP hodowli komórkowych w porównaniu z próbkami kontrolnymi [46,48,52].

Monitorowanie kinetyki neutralizacji RFT przez związki o charakterze przeciwutleniaczy prowadzi się przez pomiar zmian fluorescencji stosując wzbudzenie przy długości fali  $\lambda=485$  nm i śledzenie emisji przy  $\lambda=538$  nm w stałej temperaturze 37°C przez 1 godzinę w odstępach 5-minutowych dla kilku stężeń przeciwutleniacza. Uzyskane w ten sposób wyniki przedstawia się na wykresie kinetyki zmian fluorescencji  $[RFU] = f(\text{czas pomiaru} [\text{min}])$  i na ich podstawie wyznacza krzywą inhibicji utleniania sondy fluorescencyjnej DCFH w funkcji stężenia próbki. W tym celu oblicza się pola powierzchni pod wykresami krzywych i na ich podstawie dla poszczególnych stężeń wyznacza wartość tzw. jednostek CAA z poniższego wzoru [52].

$$= 100 - \frac{\int SA}{\int CA} \times 100$$

Jednostka CAA,

gdzie:  $\int SA$  - pole powierzchni pod wykresem zależności fluorescencji od czasu dla badanej próbki o danym stężeniu,

$\int CA$  - pole powierzchni pod wykresem krzywej zależności fluorescencji od czasu dla kontroli.

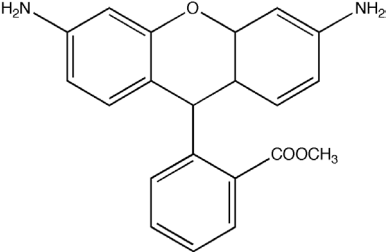
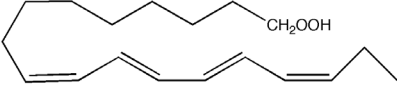
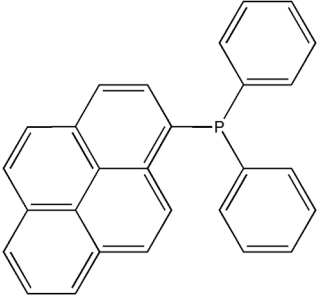
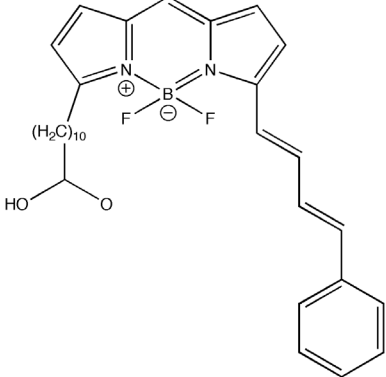
Jako substancja odniesienia, której stężenie jest jednocześnie miarą jednostek CAA, jest stosowana kwercetyna, ponieważ w czasie badań z wykorzystaniem testu CAA stwierdzono dużą zdolność tego związku do neutralizacji RFT w porównaniu z innymi popularnymi przeciwutleniaczami. Uzyskane wyniki są wyrażane w mikromolach równoważników kwercetyny na 100  $\mu\text{moli}$  badanej substancji albo w mikromolach równoważników kwercetyny na 100 g świeżych owoców (lub suchej masy) czy innej próbki zawierającej składniki wykazujące właściwości przeciwutleniające [52].

Mimo wielu zalet sondy DCFH-DA, ma ona również pewne ograniczenia. Przede wszystkim w przypadku testów komórkowych z jej użyciem nie powinno się stosować żywych komórek, gdyż mogą się w niej znajdować endogenne esterazy powodujące deestryfikację DCFH-DA do DCFH, która jak już wspomniano nie może migrować przez błony komórkowe, przez co zdolność wnikanía sondy do wnętrza komórki zostaje osłabiona [1,15]. Pojawiły się również doniesienia wskazujące, że po hydrolizie przez wewnątrzkomórkowe

**Tabela 4.** Sondy fluorescencyjne stosowane do wykrywania RFT w systemach komórkowych

Stosowana skrócona nazwa*	Wzór strukturalny	Długość fali wzbudzenia/emisji [nm]	Specyficzność
DCFH-DA		485/520 (w teście CAA)	H2O2 OH ROO• NO2• CO3•-
HPF i APF HPF X=O APF X=NH		500/520	•OH ONOO– (HPF i APF) HOCl (tylko APF)
Amplex Red		563/587	H2O2
pep3-NP1		488/530 ± 20	H2O2
DHE		520/610	O2•-

Tabela 4. cd

Stosowana skrócona nazwa*	Wzór strukturalny	Długość fali wzbudzenia/emisji [nm]	Specyficzność
DHR		505/529	•OH, ONOO <sup>-</sup> , NO <sub>2</sub> <sup>•</sup> , CO <sub>3</sub> <sup>-•</sup> , HOCl; O <sub>2</sub> <sup>-•</sup> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
cis-PnA		320/432	ROO <sup>•</sup>
DPPP		351/380	ROO <sup>•</sup>
C-11-BODIPY		510/595	ROO <sup>•</sup> , RO <sup>•</sup> , •OH

\*pełne nazwy chemiczne w tekście

esterazy, utleniony produkt, tzn. DCF, może się wydosłać z niektórych typów komórek [18].

Należy też wspomnieć, że DCFH-DA nie może służyć jako selektywny wskaźnik tworzenia określonych RFT czy RFA w komórkach [1,11], choć w literaturze często spotyka się błędne stwierdzenie, że system DCFH/DCF może zostać użyty do selektywnego monitorowania wewnątrzkomórkowego poziomu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. W rzeczywistości sonda nie reaguje z nim bezpośrednio. Fluorescencja emitowana przez sondę może wynikać z jej utleniania

przez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, który powstaje w wyniku reakcji katalizowanej przez jony metali (reakcja Fentona) oraz peroksydazy (np. hemową). Jednak DCFH reaguje także z OH<sup>•</sup>, nadtlenkami organicznymi, NO<sub>2</sub><sup>•</sup>, CO<sub>3</sub><sup>-•</sup>, HOCl i RFT powstałymi z rozkładu nadtlenoazotynu (ONOO<sup>-</sup>/ONOOH) [6,11,19,29,43].

Test CAA jest jedynym komercyjnie dostępnym testem, który można wykorzystać do badania aktywności przeciwutleniającej w systemach komórkowych z zastosowaniem sond fluorescencyjnych, jednak pomiar aktywności anty-

oksydacyjnej w układzie komórkowym może teoretycznie być przeprowadzany również z zastosowaniem innych sond fluorescencyjnych (tabela 4) w połączeniu z różnymi kontrolowanymi źródłami RFT. Odpowiedni dobór obu reagentów może pozwalać na oznaczanie wpływu danego przeciwutleniacza na poziom swoistych RFT [2,23].

Wśród sond fluorescencyjnych (tabela 4), które potencjalnie mogłyby zostać wykorzystane w badaniach aktywności przeciwutleniającej na szczególną uwagę - ze względu na dużą selektywność w stosunku do rodnika  $\text{OH}^\bullet$  - zasługują pochodne fluoresceiny - HPF (kwas 2-[6-(4V-hydroksy)fenoksy-3H-ksanten-3-on-9-yl] benzoosowy) oraz APF (kwas 2-[6-(4V-amino)-fenoksy-3H-ksanten-3-on-9-yl] benzoosowy). Setsukinai i wsp. [41] badali reaktywność tych dwóch sond w stosunku do różnych RFT i RFA. Obie sondy okazały się zdolne do detekcji  $\text{OH}^\bullet$  powstającego w wyniku reakcji Fentona. W wyniku O-dearylacji APF i HPF indukowanej  $\text{OH}^\bullet$  powstają pochodne charakteryzujące się silną fluorescencją przy długości fali 520 nm (tabela 4) [41]. Zauważono jednak, że obecność DMSO w układzie reakcyjnym ma wpływ na spowolnienie wzrostu fluorescencji. Sonda APF okazuje się reaktywna w stosunku do HOCl, w przeciwieństwie do HPF. W obu przypadkach odnotowano wzrost fluorescencji także pod wpływem ONOO<sup>-</sup> [41].

Amplex Red (N-acetylo-3,7-dihydroksyfenoksazylna) jest inną komercyjnie dostępną sondą fluorescencyjną, która w obecności peroksydazy chrzanowej jest utleniana przez  $\text{H}_2\text{O}_2$  do fluorescencyjnej rezorufiny charakteryzującej się wzbudzeniem przy długości fali 563 nm oraz emisją fluorescencji przy 587 nm [36]. Sonda nie jest jednak swoista wyłącznie wobec  $\text{H}_2\text{O}_2$ , gdyż można ją również stosować do wykrywania  $\text{O}_2^{\bullet-}$  w obecności dysmutazy ponadtlenkowej, która katalizuje reakcję dysproporcjonowania anionorodnika ponadtlenkowego, w wyniku której powstaje  $\text{H}_2\text{O}_2$  [44,57]. Zaletą Amplex Red jest mała fluorescencja tła, a także stabilność i silna fluorescencja produktu utleniania sondy. Jednak rezorufina *per se* jest substratem dla peroksydazy chrzanowej i w wyniku dalszego utleniania powstaje resazurylna, która nie wykazuje zdolności do fluorescencji, co może spowodować znaczny spadek intensywności fluorescencji [45].

Inną sondą fluorescencyjną, która może służyć do wykrywania RFT, jak również do oznaczania aktywności przeciwutleniającej próbek, jest dihydroetydyna (DHE). Ze względu na zdolność do swobodnego przenikania przez błony komórkowe, sonda ta jest często wykorzystywana do monitorowania wytwarzania  $\text{O}_2^{\bullet-}$  i jest użyteczna podczas badania wybuchu oddechowego w komórkach (tabela 4) [4,26,37]. Uważano, że DHE w reakcji z  $\text{O}_2^{\bullet-}$  tworzy czerwony fluorescencyjny produkt (etydynę), która interkaluje do DNA [6,39]. Jednak późniejsze badania zasugerowały, że produktem tej reakcji jest rzeczywiście 2-hydroksyetydyna [56]. DHE jest uważana za najbardziej swoisty i użyteczny barwnik, bo jest dobrze tolerowaną przez komórki i może

nawet wytrzymać łagodne utrwalenie stosowane przy przygotowywaniu preparatów mikroskopowych [5,38]. Istnieją jednak pewne ograniczenia w zakresie korzystania z DHE podczas wykrywania lub ilościowego oznaczenia  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Jednym z problemów jest utlenianie DHE przez cytochrom c. Aspekt ten jest ważny, gdy jednym ze źródeł  $\text{O}_2^{\bullet-}$  jest mitochondrium oraz gdy cytochrom c zostaje uwolniony do cytosolu podczas apoptozy komórki. Gdy stan stresu oksydacyjnego i procesy apoptozy nakładają się, nie jest możliwe ilościowe oznaczenie  $\text{O}_2^{\bullet-}$  na podstawie pomiaru ilości powstającej utlenionej postaci DHE ( $\text{E}^+$ ). Zastosowanie wysokich stężeń sondy może doprowadzić do niezależnego od obecności  $\text{O}_2^{\bullet-}$  wzrostu fluorescencji, który jest rezultatem tworzenia  $\text{E}^+$  w ilościach przekraczających dostępność miejsc interkalacji w DNA mitochondrialnym. Wówczas  $\text{E}^+$  może interkalować do DNA jądrowego, powodując tym samym znaczny wzrost fluorescencji. DHE może być również utleniona przez  $\text{H}_2\text{O}_2$  w reakcji katalizowanej przez nieswoiste peroksydazy, np. peroksydazę chrzanową lub mieloperoksydazę [13].

Dihydrorodamina (DHR) jest sondą o innej swoistości i może być używana do wykrywania  $\text{OH}^\bullet$ , ONOO<sup>-</sup>,  $\text{NO}_2^\bullet$ ,  $\text{CO}_3^{\bullet-}$  oraz HOCl, natomiast z  $\text{O}_2^{\bullet-}$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  reaguje jedynie w obecności enzymatycznego katalizatora [47]. DHR jest utleniana do rodamin 123, która charakteryzuje się silną fluorescencją przy długości fali 536 nm (tabela 4). Rodamina 123 ma charakter lipofilowy, zawiera ładunek dodatni i akumuluje się w mitochondriach [15,53].

C-11-BODIPY to inna szeroko stosowana sonda fluorescencyjna, która w wyniku utleniania zmienia zakres fluorescencji z czerwonego na zielony. Sonda reaguje z różnymi rodnikami np.  $\text{OH}^\bullet$ , peroksydowym, alkoksylowym, ONOO<sup>-</sup>, nie reaguje natomiast z  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{NO}^\bullet$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tlenem singletowym ani hydroksynadtlenkami. Dodana do komórek przedostaje się do wnętrza większości organelli bez wyraźnej swoistości [15].

Mimo omówionej wyżej różnorodności, wciąż pojawiają się nowe doniesienia dotyczące poszukiwań idealnej sondy fluorogennej do oznaczania stresu oksydacyjnego w komórkach. W 2014 r. opublikowano wyniki badań, których celem było opracowanie sondy fluorescencyjnej służącej do detekcji wyłącznie  $\text{H}_2\text{O}_2$  w komórkach [28,49]. Nadtlenek wodoru wytwarzany w komórce w sposób regulowany odgrywa rolę wewnątrzkomórkowego przekaźnika II rzędu, aktywując szlaki sygnalizacyjne i stymulując proliferację komórek oraz ich różnicowanie i migrację. Jednak w odróżnieniu od klasycznego przekaźnika II rzędu, jakim jest  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  jest utleniaczem stąd też jego nadmierne wytwarzanie nie tylko zmienia procesy sygnalizacyjne, ale też zaburza homeostazę redoksywową i w rezultacie doprowadza do stresu oksydacyjnego. Zatem badanie ochronnego wpływu przeciwutleniaczy w stosunku do  $\text{H}_2\text{O}_2$  w komórkach jest niezwykle ważne, jednak większość metod stosowanych do detekcji RFT nie jest swoista wyłącznie dla tej postaci.

W odpowiedzi na zapotrzebowanie na sondę selektywną wobec  $H_2O_2$  naukowcy z Uniwersytetu Fudan w Szanghaju zaprojektowali nowatorską radiometryczną sondę fluorescencyjną NP1, której struktura opiera się na szkielecie 1,8-naftalimidu oraz estru kwasu borowego jako sensora swoistego dla  $H_2O_2$ . Sonda zawiera również grupę azydkową, która pozwala na szybkie, efektywne i wydajne łączenie z cząsteczkami biologicznymi. Umożliwia to modyfikowanie swoistości sondy do ukierunkowanego wykrywania cząsteczek  $H_2O_2$  w określonych miejscach w komórce. Możliwość zastosowania sondy NP1 do detekcji  $H_2O_2$  w żywych komórkach i tkankach była przetestowana z zastosowaniem skaningowego laserowego mikroskopu konfokalnego.

Sonda pep-NP1 będąca modyfikacją sondy NP1, ma przyłączony do grupy azydkowej peptyd sygnału lokalizacji jądrowej, umożliwiając jej selektywne wnikanie do jądra komórkowego i swoiste wiązanie się z jądrowym DNA. Komórki inkubowane z pep-NP1 wykazywały silną fluorescencję w kanale niebieskim ( $445 \pm 20$  nm) i słabą fluorescencję w kanale żółtym ( $575 \pm 25$  nm). W obecności  $H_2O_2$  następuje wzrost stosunku fluorescencji w kanale żółtym do fluorescencji w kanale niebieskim [49].

Bardziej podatne na atak RFT w komórce jest jednak nie DNA jądrowe, ale mitochondrialne (mtDNA). Skłoniło to naukowców do zaprojektowania innej modyfikacji sondy NP1, która polegała na wprowadzeniu do sondy NP1 peptydu (pep3) wiążącego DNA znakowanego dodatkowo naładowanym fluoroforem styrylowym wykazującym czerwoną fluorescencję. Ten lipofilowy kation sprzyja akumulacji sondy pep3-NP1 w mitochondrium. Gdy sonda zwiąże się z mtDNA, intensywność czerwonej fluorescencji fluoroforu jest znacznie większa od fluorescencji zielonej. W obecności  $H_2O_2$  natomiast następuje wzrost stosunku fluorescencji zielonej do czerwonej (tabela 4) [48,50].

Istnieje także kilka rodzajów sond służących do oznaczania peroksydacji lipidów błonowych i RFT wewnątrz błon komórkowych. Dobór odpowiedniej sondy oraz eksperymentalnego źródła RFT pozwala na oznaczenie zdolności badanych przeciwutleniaczy do przeciwdziałania peroksydacji lipidów. Jedną z bardziej znanych sond tego rodzaju jest kwas *cis*-parynarowy (*cis*-PnA), który w wyniku wiązania się z lipidami ulegającymi peroksydacji sam szybko ulega utlenieniu tracąc przy tym zdolność do fluorescencji (tabela 4). Kwas parynarowy musi być stosowany ze szczególną ostrożnością, ponieważ jest to kwas wielonienasycony i może łatwo ulegać nieswoistym reakcjom utleniania, w związku z czym należy go przechowywać w szczelnie zamkniętych pojemnikach bez dostępu światła, w atmosferze  $N_2$ . Może być stosowany jako wolny kwas bądź związany ze swoistymi fosfolipidami.

Inną sondą pozwalającą wykrywać produkty peroksydacji lipidów jest difenyl-1-pyrenylofosfina (DPPP), która reaguje z produktami peroksydacji lipidów z wytworze-

niem związku charakteryzującego się fluorescencją przy długości fali 380 nm (tabela 4). Sonda ta jest niezwykle wrażliwa na działanie światła i dlatego mogą występować problemy z powtarzalnością wyników [15]. Jednak zastosowanie DPPP do detekcji produktów peroksydacji lipidów ma również wiele zalet. Sonda reaguje z wodoronadtlenkami lipidów w stosunku stechiometrycznym, co umożliwia ich ilościowe oznaczenie. DPPP jest silnie lipofilowa i reaguje selektywnie z produktami peroksydacji lipidów wewnątrz błony komórkowej, natomiast w przeciwieństwie do sondy DCFH lub DHR nie reaguje z nadtlenkami w środowisku wodnym. Sonda DPPP jest odporna na kataboliczne i metaboliczne procesy zachodzące w komórkach, dlatego też jest fluoroforem z wyboru w monitorowaniu peroksydacji lipidów błonowych w żywych komórkach [31].

## POMIAR FLUORESCENCJI

Istnieje kilka metod pomiaru fluorescencji: najprostszą jest wykorzystanie czytnika płytek wielodołkowych z możliwością pomiaru fluorescencji, a dane są przedstawiane jako spadek bądź wzrost fluorescencji w porównaniu z próbką kontrolną. Jednak jakość i czułość komercyjnie dostępnych czytników jest bardzo zróżnicowana, a potrzeba dokupienia specjalnych filtrów sprawia, iż pomiary te są często bardzo kosztowne. Nowsze modele nie wymagają filtrów, ponieważ stosuje się w nich podwójny monochromator, przez co mają zwiększony zakres działania. Ważne jest również, aby sprawdzić czy czytnik podaje pomiar fluorescencji z góry czy z dołu, ponieważ w przypadku tych pierwszych komórki muszą być zawieszane w roztworze, natomiast w drugim pomiar może być dokonywany w warunkach *in situ* bez konieczności odklejania komórek od podłoża, co może zwiększać w nich stres oksydacyjny. Ponadto czytniki płytek wielodołkowych mierzą całkowitą fluorescencję nie rozróżniając fluorescencji wewnątrzkomórkowej i fluorescencji tła, a to może być problemem w tego typu pomiarach [15].

Cytometria przepływowa rozwiązuje ten problem umożliwiając dokonywanie pomiaru wyłącznie fluorescencji wewnątrzkomórkowej. W wyniku zastosowania tej techniki otrzymuje się dane ilościowe mówiące o liczbie komórek emitujących fluorescencję, zamiast względnej fluorescencji całej próbki. Wadą metody jest to, iż komórki muszą być zawieszane w próbce, a więc wymagana jest ich trypsynizacja bądź zeszkobanie, co jak już wspomniano grozi stymulacją stresu oksydacyjnego i może doprowadzić do zafalszowania wyników testu [15].

Najnowszym rozwiązaniem jest mikroskopia konfokalna, w przypadku której komórki mogą być badane w czasie rzeczywistym *in situ*, w temperaturze  $37^\circ C$ . Umożliwia to lokalizację RFT wewnątrz komórki, a dzięki barwnikom, np. MitoTracker, pozwala na wizualizację udziału poszczególnych struktur komórkowych, np. mitochondriów w stresie oksydacyjnym bądź jego tłumieniem [15].

## PODSUMOWANIE

Obserwowany w ostatnich latach wzrost zainteresowania zarówno badaczy, jak i opinii publicznej reaktywnymi formami tlenu (RFT) jest bez wątpienia spowodowany dualistyczną naturą tych substancji. Z jednej strony RFT w warunkach homeostazy pełnią w organizmie funkcje mediatorów i regulatorów metabolizmu, jednak ich nadmierne wytwarzanie oraz wyczerpanie przez organizm naturalnych rezerw antyoksydacyjnych indukuje stres oksydacyjny, który jak się sugeruje leży u podłoża większości globalnie szerzących się i powszechnie znanych chorób cywilizacyjnych, takich jak miażdżyca, nadciśnienie, czy nawet nowotwory. Wraz ze zrozumieniem mechanizmów odpowiadających za powstawanie stresu oksydacyjnego zaczęto poszukiwać środków zaradczych - substancji redukujących i/lub antyrodnikowych, które mogłyby przeciwdziałać powstawaniu w komórkach zniszczeń spowodowanych działaniem RFT. Szczególną uwagę zwraca się na przeciwutleniające dostarczane z pożywieniem, które wspierają naturalny antyoksydacyjny system obronny organizmu przed uszkodzeniami wywołanymi zaburzoną homeostazą redoksową,

dzięki czemu mogą przeciwdziałać i/lub spowalniać rozwój oraz wspomagać leczenie wspomnianych chorób. Rosnące zagrożenie chorobami cywilizacyjnymi stymuluje poszukiwania lepszych metod oznaczania aktywności przeciwutleniającej w warunkach hodowli komórkowych, które poprawnie odzwierciedlałyby aktywność antyoksydacyjną *in vivo*. Stosowanie klasycznych metod chemicznych nie zapewnia uzyskania informacji na temat rzeczywistego działania przeciwutleniaczy w żywym organizmie. Biodostępność, dystrybucję i metabolizm substancji przeciwutleniających w warunkach *in vivo* odzwierciedlać mogą natomiast testy przeprowadzane w warunkach hodowli komórkowych. Najczęściej stosowane metody oznaczania poziomu RFT oraz zdolności przeciwutleniaczy do ich neutralizacji w układach biologicznych polegają głównie na pomiarze chemiluminescencji lub fluorescencji produktów powstałych w wyniku reakcji RFT z sondami, które wskutek utlenienia nabywają zdolności emitowania promieniowania. Różnorodność dostępnych sond oraz kontrolnych źródeł RFT umożliwia wybór takiego układu, który jest najlepiej dostosowany do oceny aktywności przeciwutleniającej badanych substancji.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Aranda A., Sequedo L., Tolosa L., Quintas G., Burello E., Castell J.V., Gombau L.: Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: a quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. *Toxicol. In Vitro*, 2013; 27: 954-963
- [2] Bartosz G.: *Druga twarz tlenu*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2009
- [3] Bender S., Grabiano S.: Evaluation of the antioxidant activity of foods in human cells. Integrated study of biologically active antioxidants from *Camellia sinensis*. *Nutrafoods*, 2015; 14: 79-85
- [4] Bindokas V.P., Jordán J., Lee C.C., Miller R.J.: Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J. Neurosci.*, 1996; 16: 1324-1336
- [5] Bucana C., Saiki I., Nayar R.: Uptake and accumulation of the vital dye hydroethidine in neoplastic cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 1986; 34: 1109-1115
- [6] Buettner G.R.: Moving free radical and redox biology ahead in the next decade(s). *Free Rad. Biol. Med.*, 2015; 78: 236-238
- [7] Buettner G.R., Jurkiewicz B.A.: Ascorbate free radical as a marker of oxidative stress: an EPR study. *Free Radic. Biol. Med.*, 1993; 14: 49-55
- [8] Chen X., Zou L.Q., Niu J., Liu W., Peng S.F., Liu C.M.: The stability, sustained release and cellular antioxidant activity of curcumin nanoliposomes. *Molecules*, 2015; 20: 14293-14311
- [9] Dmitriev R.I., Zhdanov A.V., Jasionek G., Papkovsky D.B.: Assessment of cellular oxygen gradients with a panel of phosphorescent oxygen-sensitive probes. *Anal. Chem.*, 2012; 84: 2930-2938
- [10] Esipova T.V., Karagodov A., Miller J., Wilson D.F., Busch T.M., Vinogradov S.A.: Two new «protected» oxyphors for biological oximetry: properties and application in tumor imaging. *Anal. Chem.*, 2011; 83: 8756-8765
- [11] Forman H.J., Augusto O., Brigelius-Flohe R., Dennery P.A., Kalyanaram B., Ischiropoulos H., Mann G.E., Radi R., Roberts L.J.<sup>2nd</sup>, Vina J., Davies K.J.: Even free radicals should follow some rules: a guide to free radical research terminology and methodology. *Free Radic. Biol. Med.*, 2015; 78: 233-235
- [12] Freeman B.A., Crapo J.D.: Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, 1982; 47: 412-426
- [13] Gomes A., Fernandes E., Lima J.L.: Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2005; 65: 45-80
- [14] Gouda M., Moustafa A., Hussein L., Hamza M.: Three week dietary intervention using apricots, pomegranate juice or/and fermented sour sobya and impact on biomarkers of antioxidative activity, oxidative stress and erythrocytic glutathione transferase activity among adults. *Nutr. J.*, 2016; 15: 52
- [15] Halliwell B., Whiteman M.: Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.*, 2004; 142: 231-255
- [16] Hernandez L., Grasa L., Fagundes D.S., Gonzalo S., Arruebo M.P., Plaza M.A., Murillo M.D.: Role of potassium channels in rabbit intestinal motility disorders induced by 2,2'-azobis (2-aminopropane) dihydrochloride (AAPH). *J. Physiol. Pharmacol.*, 2010; 61: 279-286
- [17] Honzel D., Carter S.G., Redman K.A., Schauss A.G., Endres J.R., Jensen G.S.: Comparison of chemical and cell-based antioxidant methods for evaluation of foods and natural products: generating multifaceted data by parallel testing using erythrocytes and polymorphonuclear cells. *J. Agric. Food Chem.*, 2008; 56: 8319-8325
- [18] Jakubowski W., Bartosz G.: Estimation of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* with fluorescent probes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1997; 29: 1297-1301
- [19] Kalyanaram B., Darley-Usmar V., Davies K.J., Dennery P.A., Forman H.J., Grisham M.B., Mann G.E., Moore K., Roberts L.J.<sup>2nd</sup>, Ischiropoulos H.: Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic. Biol. Med.*, 2012; 52: 1-6
- [20] Kanofsky J.R.: Singlet oxygen production by lactoperoxidase. *J. Biol. Chem.*, 1983; 258: 5991-5993

- [21] Karadag A., Ozelik B., Saner S.: Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Anal. Methods*, 2009; 2: 41
- [22] Klaude M., Eriksson S., Nygren J., Ahnström G.: The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat. Res.*, 1996; 363: 89-96
- [23] Komatsu H., Yoshihara K., Yamada H., Kimura Y., Son A., Nishimoto S., Tanabe K.: Ruthenium complexes with hydrophobic ligands that are key factors for the optical imaging of physiological hypoxia. *Chemistry*, 2013; 19: 1971-1977
- [24] Koshiishi I., Tsuchida K., Takajo T., Komatsu M.: Radical scavenger can scavenge lipid allyl radicals complexed with lipoxygenase at lower oxygen content. *Biochem. J.*, 2006; 395: 303-309
- [25] Koshiishi I., Tsuchida K., Takajo T., Komatsu M.: Quantification of lipid alkyl radicals trapped with nitroxyl radical via HPLC with post-column thermal decomposition. *J. Lipid Res.*, 2005; 46: 2506-2513
- [26] Li N., Ragheb K., Lawler G., Sturgis J., Rajwa B., Melendez J.A., Robinson J.P.: Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 8516-8525
- [27] Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N.: Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.*, 2010; 4: 118-126
- [28] Meng L., Wu Y., Yi T.: A ratiometric fluorescent probe for the detection of hydroxyl radicals in living cells. *Chem. Commun.*, 2014; 50: 4843-4845
- [29] Mills E.M., Takeda K., Yu Z.X., Ferrans V., Katagiri Y., Jiang H., Lavigne M.C., Leto T.L., Guroff G.: Nerve growth factor treatment prevents the increase in superoxide produced by epidermal growth factor in PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 22165-22168
- [30] Niki E.: Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radic. Biol. Med.*, 2010; 49: 503-515
- [31] Okimoto Y., Watanabe A., Nikia E., Yamashita T., Noguchi N.: A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. *FEBS Lett.*, 2000; 474: 137-140
- [32] Piasek A., Bartoszek A., Namieśnik J.: Substancje pochodzenia roślinnego przeciwdziałające kardiotoksyczności towarzyszącej chemioterapii nowotworów. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 142-158
- [33] Pryor W.A., Godber S.S.: Noninvasive measures of oxidative stress status in humans. *Free Radic. Biol. Med.*, 1991; 10: 177-184
- [34] Rahman T., Hosen I., Islam M.M., Shekhar H.U.: Oxidative stress and human health. *J. Adv. Biosci. Biotechnol.*, 2012; 3: 997-1019
- [35] Ray P.D., Huang B.W., Tsuji Y.: Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.*, 2012; 24: 981-990
- [36] Reszka K.J., Wagner B.A., Burns C.P., Britigan B.E.: Effects of peroxidase substrates on the Amplex red/peroxidase assay: antioxidant properties of anthracyclines. *Anal. Biochem.*, 2005; 342: 327-337
- [37] Rivera A., Maxwell S.A.: The p53-induced gene-6 (proline oxidase) mediates apoptosis through a calcineurin-dependent pathway. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 29346-29354
- [38] Robinson K.M., Janes M.S., Pehar M., Monette J.S., Ross M.F., Hagen T.M., Murphy M.P., Beckman J.S.: Selective fluorescent imaging of superoxide *in vivo* using ethidium-based probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 15038-15043
- [39] Rothe G., Valet G.: Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J. Leukoc. Biol.*, 1990; 47: 440-448
- [40] Schieber M., Chandel N.S.: ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.*, 2014; 24: R453-R462
- [41] Setsukinai K., Urano Y., Kakinuma K., Majima H.J., Nagano T.: Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 3170-3175
- [42] Sies H.: Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.*, 2015; 4: 180-183
- [43] Sundaresan M., Yu Z.X., Ferrans V.J., Irani K., Finkel T.: Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*, 1995; 270: 296-299
- [44] Towne V., Will M., Oswald B., Zhao Q.: Complexities in horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of dihydroxyphenoxazine derivatives: appropriate ranges for pH values and hydrogen peroxide concentrations in quantitative analysis. *Anal. Biochem.*, 2004; 334: 290-296
- [45] Votyakova T.V., Reynolds I.J.: Detection of hydrogen peroxide with Amplex Red: interference by NADH and reduced glutathione auto-oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2004; 431: 138-144
- [46] Wang L.F., Chen J.Y., Xie H.H., Ju X.R., Liu R.H.: Phytochemical profiles and antioxidant activity of Adlay varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 2013; 61: 5103-5113
- [47] Wardman P.: Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic. Biol. Med.*, 2007; 43: 995-1022
- [48] Wen L., Guo X., Liu R.H., You L., Abbasi A.M., Fu X.: Phenolic contents and cellular antioxidant activity of Chinese hawthorn "*Crataegus pinnatifida*". *Food Chem.*, 2015; 186: 54-62
- [49] Wen Y., Liu K., Yang H., Li Y., Lan H., Liu Y., Zhang X., Yi T.: A highly sensitive ratiometric fluorescent probe for the detection of cytoplasmic and nuclear hydrogen peroxide. *Anal. Chem.*, 2014; 86: 9970-9976
- [50] Wen Y., Liu K., Yang H., Liu Y., Chen L., Liu Z., Huang C., Yi T.: Mitochondria-directed fluorescent probe for the detection of hydrogen peroxide near mitochondrial DNA. *Anal. Chem.*, 2015; 87: 10579-10584
- [51] Werber J., Wang Y.J., Milligan M., Li X., Ji J.A.: Analysis of 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride degradation and hydrolysis in aqueous solutions. *J. Pharm. Sci.*, 2011; 100: 3307-3315
- [52] Wolfe K.L., Liu R.H.: Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 2007; 55: 8896-8907
- [53] Yazdani M.: Concerns in the application of fluorescent probes DCDHF-DA, DHR 123 and DHE to measure reactive oxygen species *in vitro*. *Toxicol. In Vitro*, 2015; 30: 578-582
- [54] Ye Z.W., Zhang J., Townsend D.M., Tew K.D.: Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochim. Biophys. Acta*, 2015; 1850: 1607-1621
- [55] Yoshida Y., Itoh N., Saito Y., Hayakawa M., Niki E.: Application of water-soluble radical initiator, 2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propane] dihydrochloride, to a study of oxidative stress. *Free Radic. Res.*, 2004; 38: 375-384
- [56] Zhao H., Joseph J., Fales H.M., Sokoloski E.A., Levine R.L., Vasquez-Vivar J., Kalyanaram B.: Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 5727-5732
- [57] Zhou M., Diwu Z., Panchuk-Voloshina N., Haugland R.P.: A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal. Biochem.*, 1997; 253: 162-168
- [58] Zuo L., Zhou T., Pannell B.K., Ziegler A.C., Best T.M.: Biological and physiological role of reactive oxygen species – the good, the bad and the ugly. *Acta Physiol.*, 2015; 214: 329-348

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.