Postępy w analizie reaktywnych form tlenu (RFT) *in situ*

Maja Szelańska¹, Justyna Skrzypek¹, Maciej Gawlik²

¹Oddział Analityki Medycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków, Polska

²Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków, Polska

Farmacja Polska, ISSN 0014-8261 (print); ISSN 2544-8552 (on-line)

Adres do korespondencji

Maciej Gawlik, Katedra i Zakład Toksykologii,
Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet
Jagielloński Collegium Medicum, ul. Medyczna 9,
30-688 Kraków; e-mail: maciej.gawlik@uj.edu.pl

Źródła finansowania

Nie wskazano źródeł finansowania.

Konflikt interesów

Nie istnieje konflikt interesów.

Otrzymano: 2021.08.30

Zaakceptowano: 2021.10.12

Opublikowano on-line: 2021.10.13

DOI

10.32383/farmpol/143037

ORCID

Maja Szelańska (ORCID iD: 0000-0003-3930-7301)

Justyna Skrzypek (ORCID iD: 0000-0002-5834-9657)

Maciej Tadeusz Gawlik (ORCID iD: 0000-0002-0808-4603)

Copyright

© Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne

To jest artykuł o otwartym dostępie,

na licencji CC BY NC

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Advances in the *in situ* analysis of reactive oxygen species (ROS)

In recent years, a particular increase in interest in the subject of reactive oxygen species (ROS) has been observed. ROS are produced in cells under physiological conditions, but in the event of an oxidative imbalance, an increase in their concentration adversely affects the functioning of the body. Free radical ROS are compounds that contain oxygen atoms with an unpaired electron. These ROS include the superoxide anion radical and the hydroxyl radical. ROS that do not have an unpaired electron are singlet oxygen, ozone and hydrogen peroxide. As a result of the imbalance between ROS generation and antioxidant defence, oxidative stress (OS) arises. It contributes to the damage of DNA and proteins, causes lipid peroxidation, destruction of the cell membrane and, as a result, loss of cell integrity and function, apoptosis and necrosis. These processes are the basis for the development of most civilization diseases, such as atherosclerosis, arterial hypertension, cancer and neurodegenerative diseases. The critical impact of these disorders on basic vital functions emphasizes the importance of monitoring ROS levels at the place of their formation (*in situ*). Precise knowledge about the actual production of ROS opens up wider possibilities of diagnosing the above-mentioned diseases. It allows to determine their genesis, predict the direction of their development and to improve the treatment process. There are many methods for determining ROS, unfortunately none is completely perfect. Difficulties in the diagnosis of ROS are caused by their high reactivity and low durability. The article describes the techniques that allow for the precise determination of ROS. These include chemiluminescence, fluorescence, near infrared fluorescence, Amplex Red, immunohistochemical methods, electron spin resonance or Frequency Mixing Magnetic Detection (FMMD). There is a need to invent a method that will enable quick, non-invasive and reliable determination of ROS, which in turn will contribute to the improvement of the diagnostic process of many diseases.

Keywords: Reactive Oxygen Species, *in situ*, chemiluminescence, fluorescence, Amplex Red.

© Farm Pol, 2021, 77(8): 529–535

Wstęp

Reaktywne formy tlenu (RFT) to wysoce reaktywne związki chemiczne zawierające tlen [1]. Dzieli się na dwie grupy: wolne rodniki tlenowe (rodnikowe RFT), posiadające jeden lub więcej niesparowanych elektronów na zewnętrznej powłoce elektronowej [2], oraz nierodnikowe RFT, nieposiadające niesparowanych elektronów [3]. Rodnikowe RFT to m.in. anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$) i rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$). Jedną z nierodnikowych RFT to nadtlenek wodoru (H_2O_2) [4]. W układach biologicznych RFT współistnieją z reaktywnymi formami azotu (RFA), tworząc pulę cząsteczek czynnych oksydacyjnie [5]. RFT to m.in. produkty uboczne reakcji enzymatycznych zachodzących w cytoplazmie, mitochondrium, błonie komórkowej, retikulum endoplazmatycznym (RE) i peroksysomach [2]. Odpowiadają za wzrost, migrację, proliferację, różnicowanie [6] oraz starzenie się i apoptozę komórek. Biorą udział w mitochondrialnym łańcuchu transportu elektronów (ang. *mitochondrial electron transport chain*, METC.). Aktywują jądrowy czynnik transkrypcyjny (NF- κ B) i wpływają na ekspresję genów [2] oraz na interakcję, aktywację i supresję komórek układu immunologicznego [3].

Zaburzenia równowagi pomiędzy generacją RFT/RFA a obroną antyoksydacyjną prowadzą do wywołania stresu oksydacyjnego (SO) [7]. W stanie SO dochodzi do uszkodzenia DNA i białek i dodatkowo zainicjowany zostaje łańcuchowy proces peroksydacji lipidów [6], prowadząc do zniszczenia błony komórkowej, a w rezultacie do utraty integralności i funkcji komórek, apoptozy i nekrozy [8]. Wpływ tych zaburzeń na podstawowe cechy życiowe podkreśla znaczenie monitorowania poziomu RFT w miejscu ich powstawania. Ocena rzeczywistej produkcji RFT jest istotna w stanach patologicznych, w których zaawansowanie SO to skutek zachodzących zmian chorobowych, a nie ich przyczyna. Te informacje przyczyniają się do dokładniejszej oceny stanu zdrowia, pozwalają przewidywać kierunek i szybkość rozwoju choroby. W prezentowanym artykule przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat możliwości oznaczeń RFT *in situ* na tle charakterystyki wybranych RFT i uszkodzeń oksydacyjnych.

Charakterystyka wybranych RFT

Do RFT najczęściej występujących w układach biologicznych należą: nadtlenek wodoru (H_2O_2), anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$) oraz rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$). Należy wymienić także: ozon (O_3) [2], tlen singletowy (1O_2) [9], kwas podchlorawy (HOCl) [5].

Nadtlenek wodoru (H_2O_2)

Nadtlenek wodoru (H_2O_2) nie zawiera niesparowanych elektronów. Utleniając tle, działa jako przekaźnik sygnału [6]. W układach biologicznych powstaje głównie z $O_2^{\cdot-}$ w reakcji dysmutacji przy udziale dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) [7]. Usuwany jest przez katalazę (CAT) lub peroksydazę glutationową (GPX). W reakcji Fentona (**reakcja 1**) w obecności metali przejściowych przechodzi w $\cdot OH$. Uzupełnionym i uogólnionym zapisem reakcji Fentona jest reakcja Habera-Weissa (**reakcja 2**) [9]. H_2O_2 ulega dalszym reakcjom. W reakcji katalizowanej przez mieloperoksydazę w neutrofilach i makrofagach powstaje HOCl [5]. Reakcja HOCl z $O_2^{\cdot-}$ i jonem żelaza (Fe^{2+}) prowadzi do powstania $\cdot OH$ [10].

Anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$)

Enzymatyczne źródła anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) to: oksydaza fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (oksydaza NADPH) i oksygenaza zależna od cytochromu P450. Oksydaza NADPH katalizuje redukcję tlenu do $O_2^{\cdot-}$ [11]. We frakcji mikrosomalnej RE, zawierającej monoooksygenazy zależne od cytochromu P450, tlen cząsteczkowy jest redukowany do $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 [7]. Nieenzymatyczne źródło $O_2^{\cdot-}$ to elektrony wyciekające z METC w kompleksie I (dehydrogenaza NADH) i kompleksie III (oksydoreduktaza Q – cytochrom c). Cząsteczka tlenu przyjmuje elektrony, powstaje $O_2^{\cdot-}$ [12]. $O_2^{\cdot-}$ posiada krótki okres półtrwania i nie przechodzi przez błony komórkowe [13], dlatego działa głównie lokalnie. Bezpośrednio inaktywuje enzymy, m.in. mitochondrialny kompleks dehydrogenazy NADPH [14]. $O_2^{\cdot-}$ jest głównym prekursorem $\cdot OH$ (reakcja Fentona, **reakcja 1**). W reakcji z $NO\cdot$ powstaje bardzo reaktywny jon nadtlenoazotynowy $ONOO^-$ [15].

Rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$)

Rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$) powstaje w wyniku reakcji Fentona (**reakcja 1**), Habera-Weissa (**reakcja 2**), w reakcji HOCl z $O_2^{\cdot-}$ i Fe^{2+} [10]. $\cdot OH$ jest bardzo agresywnym, najsilniejszym oksydantem spośród RFT [5]. Z powodu wysokiej reaktywności i krótkiego okresu półtrwania, działa głównie lokalnie. Reaguje z większością związków organicznych i nieorganicznych – DNA, białkami, lipidami (powodując ich peroksydację), aminokwasami, cukrami, metalami i enzymami [9]. $\cdot OH$ i 1O_2 uszkadzają plemniki, prowadząc do

dalszych zaburzeń. Powodują pękanie nici DNA i powstawanie adduktów oraz rozrywanie wiązań fosfodiesterowych między nukleotydami. Modyfikują strukturę puryn i pirymidyn: rybozy w RNA i deoksyrybozy w DNA. Konsekwencją tych zmian są rearanżacje chromosomów, delecje i niestabilność genomu oraz nieprawidłowości replikacji i transkrypcji [9]. $\cdot\text{OH}$ odgrywa istotną rolę w powstaniu i rozwoju chorób neurodegeneracyjnych [4]. Wywołuje choroby nowotworowe i stany zapalne stawów [16]. Nieodwracalnie uszkadza kardiomiocyty podczas niedokrwienia mięśnia sercowego oraz w przebiegu zespołu poreperfuzyjnego [17].

Uszkodzenia oksydacyjne

RFT reagują z białkami i kwasami nukleinowymi, w tym DNA oraz lipidami, uszkadzając je. Produktem modyfikacji białek jest 3-nitrotyrozyna, powstająca w potranslacyjnej nitracji aromatycznych aminokwasów [18]. 8-hydroksydeoksyguanozyna powstaje w wyniku hydroksylacji pozycji C-8 nukleotydu guaniny przez $\cdot\text{OH}$. Prowadzi to do wzrostu mutagenności, ryzyka nowotworów i do rozwoju chorób neurodegeneracyjnych. W reakcji $\cdot\text{OH}$ z wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi (WKT) (kwas linolowy i arachidonowy) powstają nadtlutki lipidowe. Następnie lipidy ulegają peroksydacji [19]. Oksydacja WKT (głównie kwasu arachidonowego i dokozaheksaenowego) powoduje powstanie malonyldialdehydu (MDA), np. w reakcji z H_2O_2 [5].

Jedną z metod oceny uszkodzeń oksydacyjnych i ich przyczyn, to pomiar produktów oksydacji. Jednak często nie jest on miarodajny. Pomiary ilościowe uszkodzeń białkowych mogą być zawyżone lub znajdować się poniżej poziomu detekcji. Bezpośredni pomiar zmodyfikowanych lipidów jest trudny, ponieważ ulegają one szybkiemu metabolizmowi. Pomiary produktów oksydacji nie niosą ze sobą informacji o miejscu powstania uszkodzenia, a jedynie o jego występowaniu [20].

Zasady technik pomiaru RFT *in situ*

Metody *in situ* (w miejscu) to rodzaj technik badawczych pozwalający na identyfikację i pomiar ilościowy substancji w miejscu jej powstawania w organizmie, wykorzystywany do pomiaru RFT. Dzieli się na bezpośrednie, pozwalające na pomiar RFT w biopsjach z wątroby, nerek czy komórek nowotworowych i na pośrednie, analizujące wydychane powietrze, surowicę krwi, mocz. Poniżej przedstawiono techniki pozwalające na precyzyjne oznaczenie RFT.

Chemiluminescencja

Chemiluminescencja to jedna z metod oceny RFT *in situ*, wykorzystująca emisję światła (kwantu promieniowania elektromagnetycznego) o długości fali 1270 nm podczas powrotu $^1\text{O}_2$ do trypletowego stanu podstawowego. To metoda pośrednia, umożliwiająca detekcję głównie $\text{O}_2^{\cdot-}$ i $^1\text{O}_2$. Celem wzmocnienia chemiluminescencji, jej pomiary prowadzone są w obecności związku charakteryzującego się dużą wydajnością emisji światła po reakcji z RFT – luminoforu [21], np.: luminolu, lucygeniny, pochodnych lucyferyny cytrydyny, 2-metylo-6-(p-metoksyfenylo)-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pirazyno-3-onu (MCLA). MCLA emituje światło po wzbudzeniu, w wyniku reakcji z $\text{O}_2^{\cdot-}$, $^1\text{O}_2$, Fe^{2+} , H_2O_2 oraz w reakcji Fentona (**reakcja 1**). Emisja światła, proporcjonalna do stężenia RFT, mierzona jest za pomocą spektrofotometru, a obrazowana przez maksima na wykresie [22], co umożliwia identyfikację RFT. Luminol i lucygenina są wykorzystywane do wykrywania procesów generujących RFT i do oceny aktywności przeciwutleniającej, kiedy to obserwowane jest obniżenie chemiluminescencji badanej próbki. Ze względu na wysokie koszty i skomplikowany proces metoda ta jest rzadko stosowana [23].

Fluorescencja

Częściej stosowanym sposobem oznaczania RFT jest pośrednia metoda oparta na fluorescencji (zjawisku emitowania światła przez wzbudzony atom lub cząsteczkę). Metoda Wolfe i wsp. [24], wykorzystująca sondy fluorescencyjne, określa aktywność przeciwutleniającą związków w hodowli komórkowej. Jako sonda stosowany jest diocetan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (DCFH-DA) – łatwo przenikający przez błony komórkowe prekursor fluoresceiny, niewykazujący właściwości fluorescencyjnych. Wewnątrzkomórkowe esterazy deacetyluje go, produkując polarny produkt – 2',7'-dichlorodihydrofluoresceinę (H_2DCF), ulegający wewnątrzkomórkowej akumulacji. Utlenienie powoduje powstanie wysoce fluorescencyjnego produktu – 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (DCF) [25]. Stan oksydacyjno-redukcyjny komórek wskazujący na obecność RFT może być monitorowany poprzez pomiar zmian fluorescencji. Wzbudzenia cząsteczki dokonuje się przy długości fali 485 nm, a pomiaru fluorescencji przy 530 nm, wykorzystując cytometr przepływowy. Fluorescencja jest proporcjonalna do stężenia H_2O_2 . Technika tę cechuje łatwość użycia i duża wrażliwość na zmiany stanu oksydacyjno-redukcyjnego komórki. Może być stosowana do śledzenia zmian stężenia RFT w czasie [22].

Opisane techniki posiadają ograniczenia. Luminol może reagować z $O_2^{\cdot-}$ lub redukować tlen do O_2^{2-} , co zafałszuje wynik. Luminol i lucygeninę należy przeprowadzić do postaci kationorodnika, który reagując z RFT daje luminescencyjny produkt [26]. W przypadku testów komórkowych z użyciem sondy DCFH-DA nie powinno się stosować pożywek zawierających surowicę, gdyż mogą się w niej znajdować endogenne esterazy powodujące deestryfikację DCFH-DA do DCFH. DCFH nie migruje przez błony komórkowe, co osłabia zdolność wnikania sondy do wnętrza komórki [27].

Metody oznaczania wybranych reaktywnych form tlenu (RFT) *in situ*

Metody pomiaru nadtlenu wodoru (H_2O_2) *in situ*

Rozpuszczalny w tłuszczach H_2O_2 przechodzi przez błony komórkowe do sąsiadujących komórek i organelli [28]. Bierze udział w transdukcji sygnału i reguluje procesy zachodzące w organizmach [6]. 1O_2 może uszkadzać mitochondrium, prowadząc do trwałej produkcji H_2O_2 i $O_2^{\cdot-}$. Generowane w ten sposób H_2O_2 może uszkadzać mitochondrialne DNA, dyfundować do jądra i uszkadzać telomery, ale nie powoduje całkowitego zniszczenia jądrowego DNA [29].

Szeroko używaną metodą pomiaru H_2O_2 *in situ*, polegającą na katalizowanym przez peroksydazę chrzanową utlenianiu N-acetylo-3,7-dihydroksyfenoksazyny do rezorufiny, jest Amplex Red, [30]. Rezorufina wzbudzona przy długości fali 530 nm emituje światło o długości fali 590 nm [31]. Może być stosowana do detekcji mitochondrialnego H_2O_2 [32]. Stosuje się także Amplex Ultra Red – modyfikację powyższej metody. Produktem jest resazuryrna, która jest wzbudzana przez promieniowanie o długości fali 568 nm. Emituje światło o długości 581 nm [33].

W mitochondrium ssaków RFT produkowane są m.in. w obszarze I_Q kompleksu I łańcucha oddechowego i obszarze III_{Qo} kompleksu III [34]. Pomiar mitochondrialnej produkcji $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ *in situ* wykorzystuje cząsteczki hamujące wyciek elektronów S1QEL (ang. *Suppressors of site IQ Electron Leak*) i S3QEL (ang. *Suppressors of site IIIQ Electron Leak*), hamujące odpowiednio mitochondrialną produkcję $O_2^{\cdot-}$ z obszaru I_Q i III_{Qo} . Cząsteczki te nie wpływają na fosforylację oksydacyjną. Jednocześnie charakteryzują się wysokim potencjałem i specyficznością [35]. Wykazują działanie *in vitro*, *in situ* i *in vivo*. Obniżają wydzielanie H_2O_2 do przestrzeni zewnątrzkomórkowej [36]. H_2O_2 jest obecny we krwi, gdzie może być wytwarzany lub transportowany z narządów. Jego stężenie w surowicy jest niestabilne. Do pomiaru

w surowicy wykorzystywane są m.in. metody oparte o pomiar elektrochemiczny i fluorescencyjny [37].

Wykazano obecność H_2O_2 w kondensacie z powietrza wydychanego (ang. *exhaled breath condensate*, EBC), produkowanego przez komórki dróg oddechowych: komórki epitelialne, endotelialne oraz aktywowane komórki stanu zapalnego: neutrofile, eozynofile, makrofagi płucne. Zwiększona produkcja EBC ma miejsce w komórkach nowotworowych. Stężenie H_2O_2 mierzone jest za pomocą fluorymetrycznej metody Rucha. Jest zwiększone w przypadku wielu chorób płuc w tym: raka niedrobnokomórkowego (NSCLC), chorób zapalnych płuc (astma, przewlekła obturacyjna choroba płuc, mukowiscydoza). Trudności sprawia przeliczenie stężenia H_2O_2 w EBC na stężenie H_2O_2 w płynie pokrywającym pęcherzyki płucne, czyli stężenie *in situ*. W celu rozwiązania tego problemu potrzebne są dalsze badania [38].

Do wzrostu zawartości H_2O_2 w moczu przyczyniają się zależna od $O_2^{\cdot-}$ autooksydacja cząsteczek moczu i reakcje enzymatyczne zachodzące w moczu. Nadtlenek wodoru może być wydzielany przez aktywowane fagocyty i produkowany w nerkach przez oksydazę NADPH oraz w pęcherzu moczowym. Poziom H_2O_2 w moczu może być podwyższony w wyniku stosowanej diety (np. picie kawy). Uważa się, że stężenie H_2O_2 w moczu odzwierciedla poziom SO w organizmie [38]. Może być oznaczony za pomocą metody utleniania jonu żelaza (Fe^{2+}) w obecności oranżu ksilenowego, z wykorzystaniem selektywnej elektrody tlenowej lub poprzez pomiar chemiluminescencji w radialnych kuwetach przepływowych (ang. *radial flow-cell*) [39].

Metody pomiaru anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) *in situ*

Zhang i wsp. [15] opisali metodę pozwalającą na wizualizację zmian poziomu $O_2^{\cdot-}$ i ONOO⁻ *in situ* w czasie rzeczywistym. Dwubarwna dwufotonowa sonda fluorescencyjna (CyCA) umożliwia zlokalizowanie miejsce wzbudzenia i pomiar subkomórkowy. Wang i wsp. [40] zaproponowali wysokoefektywną, elektrochemiczną metodę pomiaru $O_2^{\cdot-}$ *in situ* CTS-Mn₃(PO₄)₂ (nano-Mn₃(PO₄)₂-chitosan). Dzięki rozproszeniu ultra małych cząsteczek fosforanu manganu pomiędzy łańcuchami chitosanu, zapobiega się wnikanii nanocząstek do komórek, nie dopuszczając do ich toksycznego uszkodzenia ani powstania SO. Metoda ta wykazuje się wysoką czułością, niskim limitem detekcji i wysoką selektywnością dla $O_2^{\cdot-}$.

Liu i wsp. [1] przedstawili metodę obrazowania wykorzystującą ratiometryczną fluorescencję w bliskiej podczerwieni (ang. *New Near-Infrared*,

NIR) ratiometric fluorescence imaging) z użyciem nanosondy opartej na FRET (ang. *Förster Resonance Energy Transfer*), mierzącej w czasie rzeczywistym $O_2^{\cdot-}$ i $\cdot OH$ *in vivo* i badającej proces zapalny *in situ*. Śledzenie procesu zapalnego *in situ* pozwala na poznanie jego patogenezę i przygotowanie indywidualnej terapii. W NIR w dwóch kanałach mierzone są zmiany intensywności fluorescencji indukowanych przez analit, co zapewnia autokalibrację, eliminację interferencji oraz wzrost wiarygodności i czułości oznaczeń. Autorzy do badań wykorzystali luminescencyjne, grafenowe kropki kwantowe. Podobną metodę, opartą na pomiarze fluorescencji w bliskiej podczerwieni, służącą do pomiaru *in situ* $O_2^{\cdot-}$ oraz polisaccharidów (H_2S_n), opisali Huang i wsp. [41].

Pomiaru $O_2^{\cdot-}$ można dokonać przez dodanie egzogennej SOD, co powoduje powstanie H_2O_2 , mierzonego za pomocą Amplex Ultra Red [35]. $O_2^{\cdot-}$ oznacza się przez pomiar absorbancji roztworu w czasie, w którym cytochrom c ulega redukcji w obecności SOD. Umożliwia to detekcję tylko dużych ilości $O_2^{\cdot-}$ uwolnionych do przestrzeni międzykomórkowej [42].

Metody pomiaru rodnika hydroksylowego ($\cdot OH$) *in situ*

Wykorzystanie detektora magnetycznego z mieszaniem częstotliwości (ang. *Frequency Mixing Magnetic Detection*, FMMD) opisali Hong i wsp. [43]. Substancje są wzbudzane w dwóch polach magnetycznych generujących dwie różne częstotliwości. Detektor mierzy składowe pola magnetycznego o sumarycznej częstotliwości generowanej przez próbkę. Metoda jest czuła na nieliniowość krzywej magnetyzacji próbki. Autorzy wykorzystali metodę FMMD do badania aktywowanych komórek mikrogleju z mózgów szczurów. Komórki te wydzielają $O_2^{\cdot-}$ i jego pochodne, które wykrywano *in situ* dzięki utlenieniu hydroetydyny do bromku etydy. Włączenie bromku etydy do struktury DNA powoduje powstanie czerwonej fluorescencji, intensywniejszej niż kontrolnych komórek mikrogleju, których fluorescencja jest większa niż próby ślepe. FMMD może być wykorzystane do nieinwazyjnych pomiarów $O_2^{\cdot-}$ i $\cdot OH$ *in situ*.

Liu R. i wsp. [1] zaproponowali metodę pomiaru $\cdot OH$ *in situ*, która pozwala na ocenę zniszczeń spowodowanych stanem zapalnym. Metoda omówiona przez Liu M. i wsp. [44] opiera się na wzroście podwójnej nici DNA na powierzchni elektrody *in situ* w toku łańcuchowej hybrydyzacji. Długolanicuchowe fragmenty DNA unieruchomione na powierzchni elektrody mogą zostać wykorzystane do oceny zniszczeń nici DNA przez $\cdot OH$. Zaobserwowano znaczne różnice w sygnale

elektrochemicznym, porównując pomiar przed i po narażeniu na $\cdot OH$. Chen i wsp. [45] opracowali nanopipetę do pomiarów $\cdot OH$ wewnątrz komórek, w pobliżu mitochondrium (*in situ*). Pomiar oparty jest o prostowanie prądu jonowego (ang. *ionic current rectification*). Elektrode wykonano pokrywając złotem wewnętrzną ścianę nanopipety, na której przez kowalencyjne wiązania Au-S zmodyfikowano 1-heksanotiol (HAT). $\cdot OH$ jako jedyna RFT zmienia strukturę HAT, co gwarantuje wysoką selektywność pomiaru i ograniczenie interferencji. Po rozpoznaniu $\cdot OH$, zmiana zwilżalności warstwy HAT wpływa na transport jonów przez nanopory, co zapewnia dużą czułość metody. Limit detekcji wynosi 1 nmoL/L. Zaobserwowano istotne zmiany prądu pod wpływem stymulacji makrofagów przez fragment amyloidu- β 1-42. Amyloid- β 1-42 ma istotny wpływ na rozwój AD. Zatem opisana nanopipeta mogłaby służyć do oceny progresji oraz leczenia AD.

Inne metody oznaczania RFT

Inne sposoby oznaczania RFT *in situ* opierają się na metodach histochemicznych, bazujących na użyciu barwników, reagujących z komponentami badanej tkanki i uwidaczniających je. Karnowski [46] przedstawił metodę uwidaczniania H_2O_2 przy użyciu 3,3-diaminobenzydyny (DAB). Metoda została wzbogacona o dodatek manganu oraz kobaltu, przebiega w dwóch reakcjach. Mn^{2+} pod wpływem $O_2^{\cdot-}$ utlenia się do Mn^{3+} . W reakcji Mn^{3+} z DAB powstaje utleniony DAB, który łącząc się z tkanką daje produkt końcowy. Kobalt zwiększa ilość produktu końcowego i poprawia czułość metody. Powstały niebieski produkt ma wysoką gęstość elektronową, co pozwala na jego obserwację w mikroskopie elektronowym [47].

Jedyną metodą, która pozwala na specyficzne i bezpośrednie uwidocznienie wolnych rodników tlenowych jest elektronowy rezonans spinowy (RSE), wykrywający obecność niesparowanych elektronów. Ze względu na swoją reaktywność, wolnorodnikowe RFT występują w układach biologicznych w niskich stężeniach, stąd zaprojektowano mało reaktywne molekuly (pułapki spinowe), mogące wiązać się w specyficznych miejscach w komórce lub białku. Reagują one z RFT, tworząc wiązania kowalencyjne i dając stabilny produkt, co umożliwia detekcję wolnorodnikowych RFT [48]. Jako pułapki spinowe używane są m.in.: N-tlenek 5,5-dimetylo-1-piroliny (DMPO), N-tert-butylo-p-fenylonitron (DEPMPO), cykliczna hydroksylamina [49]. Badania przeprowadza się jedynie na zwierzętach, ze względu na brak informacji o ich bezpieczeństwie. Jednym

z problemów w analizie RSE jest fakt, że RFT są szybko usuwane przez enzymy oraz antyoksydanty [50]. Naukowcy wiążą z tą metodą wiele nadziei ze względu na jej specyficzność i dokładność oraz możliwość dokonania nieinwazyjnego pomiaru RFT. Nowszą adaptacją tej metody są immunologiczne pułapki spinowe. DMPO w reakcji z rodnikami białkowymi tworzy epitopy wykrywane immunologicznie. Wykorzystuje się panel przeciwciał immunospecyficznie łączących się z epitopami. Do uwidocznienia kompleksów stosowane są: Western Blot, immunofluorescencja i cytometria przepływowa [51].

Podsumowanie

W ostatnich latach obserwuje się szczególny wzrost zainteresowania tematyką RFT. Przyczynia się do tego dualistyczna natura tych substancji. RFT pełnią w organizmie funkcje mediatorów i regulatorów metabolizmu. Jednak ich nadmierne wytwarzanie i wyczerpanie naturalnych rezerw antyoksydacyjnych organizmu, indukuje SO, który jest podstawą rozwoju większości chorób cywilizacyjnych, m.in: miażdżycy, nadciśnienia tętniczego, nowotworów, chorób neurodegeneracyjnych. Trudności w analizie RFT powoduje ich wysoka reaktywność i niewielka trwałość. Szybko reagują z cząsteczkami z najbliższego otoczenia. Istnieje wiele metod służących do oznaczania RFT, jednak żadna z nich nie jest w pełni doskonała. Niektóre skupiają się na wykrywaniu produktów reakcji z RFT, co często skutkuje zafałszowaniem wyniku. Wnioskowanie o roli RFT w procesach destrukcyjnych tylko na podstawie biomarkerów nie jest wystarczająco wiarygodne, aby powiązać efekt z bezpośrednią przyczyną. Precyzyjniejsze są metody oceniające aktywność RFT *in situ*, czyli w miejscu ich powstawania w organizmie. Istnieje potrzeba wynalezienia metody, dzięki której będzie możliwe szybkie, nieinwazyjne i rzetelne oznaczenie RFT, co w konsekwencji przyczyni się do usprawnienia procesu diagnostycznego wielu chorób.

Piśmiennictwo

1. Liu R, Zhang L, Chen Y, Huang Z, Huang Y, Zhao S. Design of a New Near-Infrared Ratiometric Fluorescent Nanoprobe for Real-Time Imaging of Superoxide Anions and Hydroxyl Radicals in Live Cells and in Situ Tracing of the Inflammation Process in Vivo. *Anal Chem*. 2018; 90(7): 4452–4460. doi: 10.1021/acs.analchem.7b04488.
2. Hryciay EG, Bandiera SM. Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. *Adv Pharmacol*. Elsevier Inc.; 2015; 74: 35–84. doi: 10.1016/bs.apha.2015.03.003.
3. Signaling by Reactive Oxygen Species. *Mol Aspects Med*. 2018; 63: 1–2. doi: 10.1016/j.mam.2018.09.001.
4. Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S. Oxidative stress: A key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules*. 2019; 24(8): 1–20. doi: 10.3390/molecules24081583.

5. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*. 2015; 97: 55–74. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040
6. Kim SM, Hwang KA, Choi KC. Potential roles of reactive oxygen species derived from chemical substances involved in cancer development in the female reproductive system. *BMB Rep*. 2018; 51(11): 557–562. doi: 10.5483/BMBRep.2018.51.11.056.
7. Collin F. Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(10): 2407. doi: 10.3390/ijms20102407.
8. Tsugawa S, Noda Y, Tarumi R, Mimura Y, Yoshida K, Iwata Y, Elsalhy M, Kuromiya M, Kurose S, Masuda F, Morita S, Ogyu K, Plitman E, Wada M, Miyazaki T, Graff-Guerrero A, Mimura M, Nakajima S. Glutathione levels and activities of glutathione metabolism enzymes in patients with schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. *J Psychopharmacol*. 2019; 33(10): 1199–1214. doi: 10.1177/0269881119845820.
9. Marchlewicz M, Szypulska-Koziarska D, Grzegorzółka A, Kruk J, Duchnik E, Wiszniewska B. Protection against oxidative stress in male reproductive system. *Pomeranian J Life Sci*. 2016; 62(1): 44–52.
10. Koppenol WH. Hydrogen peroxide, from Wieland to Sies. *Arch Biochem Biophys*. 2016; 595: 9–12. doi: 10.1016/j.abb.2015.09.025.
11. Jakubczyk K, Dec K, Kałduńska J, Kawczuga D, Kochman J, Janda K. Reaktywne formy tlenu – źródła, funkcje, uszkodzenia oksydacyjne. *Pol Merkuriusz Lekarski*. 2020; 48(284): 124–127.
12. Togo M, Konari N, Tsukamoto M, Kimoto R, Yamaguchi T, Takeda H, Kambayashi I. Effects of a high-fat diet on superoxide anion generation and membrane fluidity in liver mitochondria in rats. *J Int Soc Sports Nutr*. 2018; 15(1): 1–8. doi: 10.1186/s12970-018-0217-z.
13. Möller MN, Cuevasanta E, Orrico F, Lopez AC, Thomson L, Denicola A. Diffusion and transport of reactive species across cell membranes. *Adv Exp Med Biol*. 2019; 1127: 3–19. doi: 10.1007/978-3-030-11488-6_1.
14. Bayir H. Reactive oxygen species. *Crit Care Med*. 2005; 33(12 SUPPL.): S498–501. doi: 10.1097/01.ccm.00000186787.64500.12.
15. Zhang W, Liu J, Li P, Wang X, Bi S, Zhang J, Zhang W, Wang H, Tang B. In situ and real-time imaging of superoxide anion and peroxynitrite elucidating arginase 1 nitration aggravating hepatic ischemia-reperfusion injury. *Biomaterials*. 2019; 225(8): 119499. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119499.
16. Xu D, Huang CH, Xie LN, Shao B, Mao L, Shao J, Kalyanaraman B, Zhu B-Z. Mechanism of unprecedented hydroxyl radical production and site-specific oxidative DNA damage by photoactivation of the classic arylhydroxamic acid carcinogens. *Carcinogenesis*. 2019; 40(9): 1153–1163. doi: 10.1093/carcin/bgz021.
17. Inagaki T, Akiyama T, Du CK, Zhan DY, Yoshimoto M, Shirai M. Monoamine oxidase-induced hydroxyl radical production and cardiomyocyte injury during myocardial ischemia-reperfusion in rats. *Free Radic Res*. 2016; 50(6): 645–653. doi: 10.3109/10715762.2016.1162300.
18. Smallwood MJ, Nissim A, Knight AR, Whiteman M, Haigh R, Winyard PG. Oxidative stress in autoimmune rheumatic diseases. *Free Radic Biol Med*. 2018; 125(2): 3–14. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.086.
19. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017; 482(3): 419–425. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.086.
20. Griending KK, Touyz RM, Zweier JL, Dikalov S, Chilian W, Chen Y-R, Harrison DG, Bhatnagar A. Measurement of Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species, and Redox-Dependent Signaling in the Cardiovascular System: A Scientific Statement from the American Heart Association. *Circ Res*. 2016; 119: e39–e75. doi: 10.1161/res.0000000000000110.
21. Hananya N, Green O, Blau R, Satchi-Fainaro R, Shabat D. A Highly Efficient Chemiluminescence Probe for the Detection of Singlet Oxygen in Living Cells. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2017; 56(39): 11793–11796. doi: 10.1002/anie.201705803.
22. Kazumura K, Takeuchi K, Hara A, Miwa T, Hattori M, Wu Y, Morishita N, Tsuchiya H, Osawa T. Rapid on-site dual optical system to measure specific reactive oxygen species (O₂⁻ and OCl⁻) in a tiny droplet of whole blood. *PLoS One*. 2018; 13(8): 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0200573.
23. Kricka LJ. Chemiluminescence. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018; 2018(4): 245–250. doi: 10.1101/pdb.top098236.
24. Wolfe KL, Rui HL. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *J Agric Food Chem*. 2007; 55(22): 8896–8907. doi: 10.1021/jf0715166.
25. Balducci V, Incerti S, Stano P, Tofani D. Antioxidant activity of hydroxytyrosyl esters studied in liposome models. *Biochim*

- Biophys Acta Biomembr.* 2018; 1860(2): 600–610. doi: 10.1016/j.bbmem.2017.11.012.
26. Koss-Mikolajczyk I, Baranowska M, Namieśnik J, Bartoszek A. Determination of antioxidant activity of phytochemicals in cellular models by fluorescence/luminescence methods. *Postepy Hig Med Dosw.* 2017; 71: 602–617.
27. Devi LR, Raza MdK, Musib D, Roy M. New Selenonaphthaquinone-Based Copper (II) Complexes as the Next-Generation Photochemotherapeutic Agents. *Anticancer Agents Med Chem.* 2021; 21(1): 33–41. doi: 10.2174/1871520620999200727204237.
28. Krylatov A, Maslov LN, Voronkov NS, Boshchenko AA, Popov SV, Gomez L, Wang H, Jaggi AS, Downey JM. Reactive Oxygen Species as Intracellular Signaling Molecules in the Cardiovascular System. *Curr Cardiol Rev.* 2018; 14(4): 290–300. doi: 10.2174/1573403x14666180702152436.
29. Qian W, Kumar K, Roginskaya V, Fouquerel E, Oprea PL, Shiva S, Watkins SC, Kolodziejny D, Bruchez MP, Van Houten B. Chemoprotective damage to mitochondria causes rapid telomere dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019; 116(37): 18435–18444. doi: 10.1073/pnas.1910574116.
30. Weissig V, Edeas M. Mitochondrial Medicine. *Mitochondrial Medicine.* 2015; 1: 1–480. doi: 10.1007/978-1-4939-2257-4.
31. Lefrançois P, Vajralla VSR, Arredondo IB, Goudeau B, Doneux T, Bouffier L, Arbault S. Direct oxidative pathway from amplex red to resorufin revealed by: In situ confocal imaging. *Phys Chem Chem Phys.* 2016; 18(37): 25817–25822. doi: 10.1039/c6cp04438g.
32. Miwa S, Treumann A, Bell A, Vistoli G, Nelson G, Hay S, von Zglinicki T. Carboxylesterase converts Amplex red to resorufin: Implications for mitochondrial H₂O₂ release assays. *Free Radic Biol Med.* 2016; 90: 173–183. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.011.
33. Wong H-S, Monternier P-A, Orr AL, Brand MD. Plate-Based Measurement of Superoxide and Hydrogen Peroxide Production by Isolated Mitochondria. *Methods Mol Biol.* 2018; 1782: 287–299. doi: 10.1007/978-1-4939-7831-1_16.
34. Brand MD. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radic Biol Med.* 2016; 100: 14–31. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.001.
35. Wong HS, Dighe PA, Mezera V, Monternier PA, Brand MD. Production of superoxide and hydrogen peroxide from specific mitochondrial sites under different bioenergetic conditions. *J Biol Chem.* 2017; 292(41): 16804–16809. doi: 10.1074/jbc.R117.789271.
36. Brand MD, Goncalves RLS, Orr AL, Vargas L, Gerencser AA, Borch Jensen M, Wang YT, Melov S, Turk CN, Matzen JT, Dardov VJ, Petrassi HM, Meeusen SL, Perevoshchikova IV, Jasper H, Brookes PS, Ainscow EK. Suppressors of Superoxide-H₂O₂ Production at Site I of Mitochondrial Complex I Protect against Stem Cell Hyperplasia and Ischemia-Reperfusion Injury. *Cell Metab.* 2016; 24(4): 582–592. doi: 10.1016/j.cmet.2016.08.012.
37. Forman HJ, Bernardo A, Davies KJA. What is the concentration of hydrogen peroxide in blood and plasma? *Arch Biochem Biophys.* 2016; 603: 48–53. doi: 10.1016/j.abb.2016.05.005.
38. Shlyonsky V, Boom A, Mies F. Hydrogen Peroxide and Sodium Transport in the Lung and Kidney. *Biomed Res Int.* 2016; 2016: 9512807. doi: 10.1155/2016/9512807.
39. Gupta V, Mahbub P, Nesterenko PN, Paull B. A new 3D printed radial flow-cell for chemiluminescence detection: Application in ion chromatographic determination of hydrogen peroxide in urine and coffee extracts. *Anal Chim Acta.* 2018; 1005(2017): 81–92. doi: 10.1016/j.aca.2017.12.039.
40. Wang Y, Wang D, Sun LH, Xue P, Wang MQ, Lu Z, Wang F, Xia Q, Xu M-W, Bao S-J. Constructing high effective nano-Mn₃(PO₄)₂-chitosan in situ electrochemical detection interface for superoxide anions released from living cell. *Biosens Bioelectron.* 2019; 133: 133–140. doi: 10.1016/j.bios.2019.03.029.
41. Huang Y, Yu F, Wang J, Chen L. Near-Infrared Fluorescence Probe for in Situ Detection of Superoxide Anion and Hydrogen Polysulfides in Mitochondrial Oxidative Stress. *Anal Chem.* 2016; 88(7): 4122–4129. doi: 10.1021/acs.analchem.6b00458.
42. Barbacanne MA, Souchard JP, Darblade B, Iliou JP, Nepveu F, Pipy B, Bayard F, Arnal JF. Detection of superoxide anion released extracellularly by endothelial cells using cytochrome c reduction, ESR, fluorescence and lucigenin-enhanced chemiluminescence techniques. *Free Radic Biol Med.* 2000; 29(5): 388–396. doi: 10.1016/S0891-5849(00)00336-1.
43. Hong H, Krause HJ, Sohn S, Baik T, Park JH, Shin S, Park CH, Song DY. In situ measurement of superoxide and hydroxyl radicals by frequency mixing detection technique. *Anal Biochem.* 2014; 447(1): 141–145. doi: 10.1016/j.ab.2013.11.009.
44. Liu M, Xu J, Yang F, Gu Y, Chen H, Wang Y, Li F. Sensitive electrochemical detection of DNA damage based on in situ double strand growth via hybridization chain reaction. *Anal Bioanal Chem.* 2017; 409(29): 6821–6829. doi: 10.1007/s00216-017-0641-y.
45. Chen W, Ding S, Wu J, Shi G, Zhu A. In situ detection of hydroxyl radicals in mitochondrial oxidative stress with a nanopipette electrode. *Chem Commun (Camb).* 2020; 56(86): 13225–13228. doi: 10.1039/d0cc05889k.
46. Karnovsky MJ, Robinson JM, Briggs RT, Karnovsky ML. Oxidative cytochemistry in phagocytosis: the interface between structure and function. *Histochemical J.* 1981; 13(1): 1–22. doi: 10.1007/BF01005835.
47. Kerver ED, Vogels IMC, Bosch KS, Vreeling-Sindelarová H, van den Munkhof RJM, Frederiks WM. In situ detection of spontaneous superoxide anion and singlet oxygen production by mitochondria in rat liver and small intestine. *Histochem J.* 1997; 29(3): 229–237. doi: 10.1039/d0cc05889k.
48. He W, Liu Y, Wamer WG, Yin JJ. Electron spin resonance spectroscopy for the study of nanomaterial-mediated generation of reactive oxygen species. *J Food Drug Anal.* 2014; 22(1): 49–63. doi: 10.1016/j.jfda.2014.01.004.
49. Dikalov SI, Polienko YF, Kirilyuk I. Electron Paramagnetic Resonance Measurements of Reactive Oxygen Species by Cyclic Hydroxylamine Spin Probes. *Antioxid Redox Signal.* 2018; 28(15): 1433–1443. doi: 10.1089/ars.2017.7396.
50. Kishimoto S, Matsumoto KI, Saito K, Enomoto A, Matsumoto S, Mitchell JB, Devasahayam N, Krishna MC. Pulsed Electron Paramagnetic Resonance Imaging: Applications in the Studies of Tumor Physiology. *Antioxid Redox Signal.* 2018; 28(15): 1378–1393. doi: 10.1089/ars.2017.7391.
51. Mason RP. Imaging free radicals in organelles, cells, tissue, and in vivo with immuno-spin trapping. *Redox Biol.* 2016; 8: 422–429. doi: 10.1016/j.redox.2016.04.003.