



Chemiluminescencja modyfikowanych układów Fenton'a i jej potencjalne zastosowanie do badania antyoksydacyjnych właściwości roślinnych kwasów fenolowych

dr n. med. Michał Nowak

Klinika: Zakład Medycyny Nuklearnej USK im. WAM

Kierownik: dr hab. n. med. Wiesław Tryniszewski

Rozprawa doktorska – streszczenie

Promotor: dr hab. n. med. Wiesław Tryniszewski

Recenzenci: prof. dr hab. n. med. Zbigniew Maziarz, prof. dr hab. n. med. Jan Błaszczyk

Publiczna obrona – 20.05.2019

Zatwierdzona decyzją Rady Wydziału Wojskowo – Lekarskiego 3go czerwca 2019

Założenia i cel pracy

Biologicznym procesom utleniania i redukcji może towarzyszyć bardzo słaba emisja kwantów światła widzialnego (UPE – ultra-weak photon emission). Wynika ona z powstawania tlenu singletowego i wzbudzonych tripletowo grup karbonylowych podczas utleniania różnych drobno cząsteczkowych związków (np. kwasu moczowego, tryptofanu, witaminy B12) jak i dużych biomolekuł (DNA, lipidów). Tlen singletowy oraz wzbudzone tripletowo grupy karbonylowe wracając do stanu podstawowego emitują odpowiednio światło w pasmach 634 nm, 703 nm i 1270 nm oraz w przedziale 350 nm do 550 nm. Takie światło można rejestrować bezpośrednio ze skóry lub błon śluzowych człowieka. Dzięki zastosowaniu czułych metod pomiarowych (luminometry z nowoczesnymi fotopowielaczami chłodzonymi do niskich temperatur) można precyzyjnie mierzyć UPE i wykorzystywać to do monitorowania intensywności reakcji wolno-rodnikowych in vivo i in vitro, a także może to służyć do oceny farmakologicznych interwencji mających ograniczyć stres oksydacyjny w organizmie lub oceny antyoksydacyjnych właściwości różnych syntetycznych lub naturalnych związków pochodzenia roślinnego.

Odczynnik Fenton'a ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$) a także jego modyfikowane układy (dodatek AA i czynników chelatujących Fe^{2+} takich jak EDTA lub EGTA) generujące rodniki wodorotlenowe są wykorzystywane do badania oksydacyjnych uszkodzeń DNA, białek i lipidów. Ponieważ jego składniki (Fe^{2+} i H_2O_2) występują naturalnie w organizmie człowieka jest to często stosowany model w badaniach nad wolno-rodnikowymi procesami patologicznymi odpowiedzialnymi za rozwój różnych chorób. Sam odczynnik Fenton'a generuje UPE poprzez tworzenie i rozpad tlenu singletowego. Do tej pory nie opisano czy modyfikowane układy Fenton'a generują UPE (jeśli tak to jaki jest mechanizm emisji światła) i czy zjawisko to można wykorzystać do badania antyoksydacyjnych właściwości różnych fitozwiązków w tym polifenoli roślinnych.

Dlatego też celem mojej pracy było :

1. Opracowanie wydajnego i stabilnego generatora fotonów w mechanizmie utleniania - redukcji na bazie modyfikowanych układów Fenton'a: Fe^{2+} -EGTA- H_2O_2 i Fe^{2+} -EDTA-AA- H_2O_2 .
2. Zbadanie która z reaktywnych form tlenu jest odpowiedzialna za UPE modyfikowanych układów Fenton'a.
3. Zaproponowanie mechanizmu powstawania UPE w modyfikowanych układach Fenton'a.
4. Zastosowanie opracowanego generatora do oceny antyoksydacyjnych właściwości wybranych roślinnych kwasów fenolowych o znanych właściwościach prozdrowotnych: kwasu ferulowego, kwasu kawowego i kwasu chlorogenowego.

Material i Metody

Doświadczenia składały się z czterech etapów. W pierwszym etapie zbadalem emisję UPE dla czterech różnych stężeń układu Fenton'a Fe^{2+} -EGTA- H_2O_2 i Fe^{2+} -EDTA-AA- H_2O_2

w warunkach stałego wzajemnego stosunku molowego poszczególnych reagentów Fe^{2+} do EGTA do H_2O_2 i Fe^{2+} do EDTA do AA do H_2O_2 równego odpowiednio 1:2:28,1 i 1: 2: 5,1 : 28,1 .

W drugim etapie po ustaleniu optymalnego (pod względem emisji UPE) stężenia obu modyfikowanych układów Fenton'a przeprowadziłem eksperymenty dotyczące specyficzności emisji UPE z Fe^{2+} -EGTA- H_2O_2 i Fe^{2+} -EDTA-AA- H_2O_2 .

W tym celu jony żelaza Fe^{2+} zamieniałem na te same stężenia dwuwartościowych kationów innych metali (Cu^{2+} , Cr^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+}), a czynnik chelatujący EGTA zamieniałem na inne chelatory (EDTA lub cytrynian). Odpowiednio EDTA zamieniałem na EGTA lub cytrynian.

W trzecim etapie oceniłem wpływ zmiataczy rodnika wodorotlenowego (mannitolu i DMSO), katalazy (rozkłada H_2O_2), SOD (rozkłada rodnik ponadtlenkowy) oraz azydku sodu (zmiatacza tlenu singletowego) na emisję światła z obu badanych układów Fenton'a. Dodatkowo oceniłem wpływ AA na emisję UPE z układu Fe^{2+} -EGTA- H_2O_2

W czwartym etapie oceniłem wpływ roślinnych kwasów fenolowych (kwas ferulowy, kwas kawowy, kwas chlorogenowy) w końcowych stężeniach 87 $\mu\text{mol/l}$, 174 $\mu\text{mol/l}$ i 870 $\mu\text{mol/l}$ na emisję światła z układu Fe^{2+} -EGTA- H_2O_2 i Fe^{2+} -EDTA-AA- H_2O_2 .

Każde doświadczenie było przynajmniej czterokrotnie powtarzane wraz z odpowiednim zestawem układów kontrolnych. Emisję światła UPE mierzyłem za pomocą luminometru AutoLumat Plus LB 953 (Berthold, Germany) wyposażonego w fotopowielacz chłodzony układem Peltiera do temperatury 8°C i zakresie czułości od 380 nm do 630 nm w ciągu 120 s w temperaturze 37°C .

Wyniki

Optymalne stężenia obu układów Fenton'a jako emiterów UPE były następujące 92,6 $\mu\text{mol/l}$ Fe^{2+} -185,2 $\mu\text{mol/l}$ EGTA-2,6 mmol/l H_2O_2 oraz 92,6 $\mu\text{mol/l}$ Fe^{2+} – 185,2 $\mu\text{mol/l}$ EDTA – 472 $\mu\text{mol/l}$ AA – 2,6 mmol/l H_2O_2 . Emisja światła jest ich cechą specyficzną gdyż zamiana Fe^{2+} na inne kationy i EGTA lub EDTA na inne chelatory powodowała prawie całkowity zanik chemiluminescencji. Emisja UPE z układu Fe^{2+} -EGTA- H_2O_2 zależała od rodnika wodorotlenowego i częściowo od rodnika ponadtlenkowego ($77\pm 5\%$ hamowania przez DMSO

w stężeniu 2,22 mmol/l i 65±14% hamowania przez SOD w stężeniu 0,185 U/μl, p<0,001). Natomiast w przypadku Fe²⁺-EDTA-AA-H₂O₂ tylko zmiatacze rodnika wodorotlenowego hamowały istotnie UPE (76±12 % hamowania przez DMSO w stężeniu 2,22 mmol/l, p<0,01). W obu przypadkach dodanie katalazy hamowało UPE, co jasno wskazuje, że H₂O₂ jest niezbędnym reagentem do zapoczątkowania procesów emisji światła.

Kwasy fenolowe we wszystkich badanych stężeniach hamowały UPE z układu Fe²⁺-EGTA- H₂O₂. Już w najniższym badanym stężeniu 87 μmol/l hamowanie emisji światła osiągało 90±4, 90±5 i 97±2 % (p<0,001) odpowiednio dla kwasu ferulowego, chlorogenowego i kawowego. Również AA w stężeniu 0,46 mmol/l prawie całkowicie zahamował (92±1 % p<0,001) emisję światła z Fe²⁺-EGTA- H₂O₂.

Natomiast dodanie kwasów fenolowych do układu Fe²⁺-EDTA-AA-H₂O₂ miało całkowicie odwrotny efekt, silnie zwiększało emisję UPE. Dla najwyższego badanego stężenia 870 μmol/l efekt wzmocnienia emisji światła wynosił 5, 13,9 i 46,8 razy (p<0,001) odpowiednio dla kwasu ferulowego, chlorogenowego i kawowego. W oparciu o uzyskane wyniki i dane literaturowe zaproponowałem mechanizm emisji światła z obu układów, w którym końcowym i kluczowym elementem jest inicjowane przez rodniki wodorotlenowe powstawanie wzbudzonych tripletowo grup karbonylowych, które wracając do stanu podstawowego (nie wzbudzonego) emitują światło.

Wnioski

1. Modyfikowane układy Fenton'a 92,6 μmol/l Fe²⁺-185,2 μmol/l EGTA-2,6 mmol/l H₂O₂ oraz 92,6 μmol/l Fe²⁺ – 185,2 μmol/l EDTA – 472 μmol/l AA – 2,6 mmol/l H₂O₂ są wydajnym i stabilnym źródłem UPE i mogą być wykorzystane do badań biologicznych procesów utleniania i redukcji w warunkach in vitro.

2. Emisja światła z układu Fe²⁺-EGTA-H₂O₂ zależy od rodników wodorotlenowych i częściowo od rodników ponadtlenkowych zaś emisja z układu Fe₂₊-EDTA-AA-H₂O₂ zależy tylko od rodników wodorotlenowych.

3. Bezpośrednim źródłem światła w obu układach są powstające tripletowo wzbudzone grupy karbonylowe. W układzie Fe^{2+} -EGTA- H_2O_2 powstają one w następstwie pęknięcia wiązań eterowych w cząsteczce EGTA pod wpływem rodników wodorotlenowych. W układzie Fe^{2+} -EDTA-AA- H_2O_2 produkty utleniania EDTA i AA tworzą wiązanie estrowe które pękając pod wpływem rodników wodorotlenowych przekształcają się we wzbudzone grupy karbonylowe.

4. Emisja światła z układu Fenton'a Fe^{2+} -EGTA- H_2O_2 jest silnie hamowana przez roślinne kwasy fenolowe (ferulowy, kawowy, chlorogenowy) i AA. Zjawisko to może być wykorzystane do badania antyoksydacyjnych właściwości polifenoli i innych fitozwiązków w kontekście ich właściwości pro-zdrowotnych.

5. Emisja światła z układu Fe^{2+} -EDTA-AA- H_2O_2 jest silnie wzmacniana przez roślinne kwasy fenolowe (ferulowy, kawowy, chlorogenowy). Zjawisko to może być wykorzystane do wykrywania i pomiaru stężenia kwasów fenolowych i innych polifenoli w wyciągach roślinnych poddanych rozdzielaniu chromatograficznemu. Może to mieć zastosowanie w produkcji różnych suplementów diety o właściwościach antyoksydacyjnych