

## MĚŘENÍ CELKOVÉ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY (TAC)

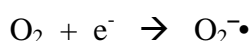
Buňky živého organismu v průběhu svého buněčného života prakticky nepřetržitě produkují **volné radikály**, reaktivní kyslíkové radikály označované jako ROS (Reactive Oxygen Species) a reaktivní dusíkaté radikály označované jako RNS (Reactive Nitrogen Species). Volné radikály mohou být definovány jako molekuly, případně molekulové fragmenty, obsahující jeden nebo více nepárových elektronů v atomových či molekulových orbitalech.

Tyto nepárové elektrony vznikající štěpením vazby, přijetím nebo ztrátou elektronu, určují vysoký stupeň reaktivity volných radikálů. Hlavními zdroji volných radikálů jsou lyzosomy a peroxysomy, buňky schopné fagocytózy, biotransformační procesy na endoplazmatickém retikulu, Fentonova reakce přechodných kovů a některé fyzikální faktory jako UV nebo X záření. Jedním z procesů, kde může také docházet ke vzniku volných radikálů je dýchací řetězec v mitochondriích. K exogenním faktorům, které výrazně zvyšují produkci volných radikálů, patří kouření, průmyslové znečištění životního prostředí, pesticidy, řada léčiv (zejména potom celková anestetika) či organická rozpouštědla.

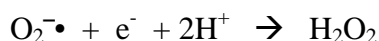
Reakce volných radikálů, případně látek neradikálové povahy s biomakromolekulami jsou nejčastější příčinou poškození buněčných struktur, buněk a celých tkání.

<b>Reaktivní formy kyslíku (ROS)</b>			
<i>volné radikály</i>		<i>látky neradikálové povahy</i>	
superoxidový radikál	$O_2^{\bullet-}$	peroxid vodíku	$H_2O_2$
hydroperoxylový radikál	$HO_2^{\bullet}$	kyselina chlorná	$HClO$
hydroxylový radikál	$OH^{\bullet}$	ozon	$O_3$
peroxylový radikál	$ROO^{\bullet}$	singletový kyslík	$^1O_2$
alkoxylový radikál	$RO^{\bullet}$		
<b>Reaktivní formy dusíku (RNS)</b>			
<i>volné radikály</i>		<i>látky neradikálové povahy</i>	
oxid dusnatý	$NO^{\bullet}$	kyselina dusitá	$HNO_2$
oxid dusičitý	$NO_2^{\bullet}$	oxid dusitý	$N_2O_3$
		peroxynitrit	$ONOO^-$
		alkylperoxynitrit	$ROONO^-$

Přijetím jednoho elektronu se molekula kyslíku redukuje na superoxid,

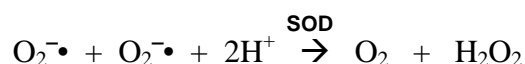


který se dalším elektronem redukuje na peroxid vodíku.



Superoxid podléhá také spontánní dismutaci, při které jedna jeho molekula poskytuje elektron druhé, takže dochází zároveň k oxidaci i redukcí jejímž produktem je kyslík a peroxid vodíku.

Přestože ve vodném prostředí probíhá reakce velkou rychlostí, v biologických organismech je ještě urychlována enzymem superoxididismutázou (SOD).



Reakce peroxidu vodíku s biomolekulami jsou poměrně pomalé, avšak v přítomnosti tranzitních kovů, jako je dvojmocné železo  $\text{Fe}^{2+}$  nebo jednomocná měď  $\text{Cu}^+$ , se ochotně redukuje



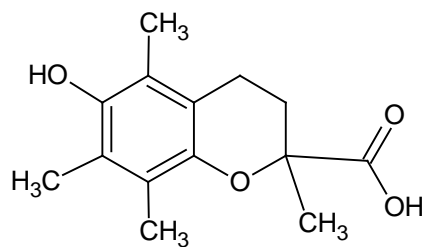
Touto **Fentonovo reakcí** vzniká vysoce toxický hydroxylový radikál  $\text{HO}\cdot$ , který okamžitě reaguje s okolními molekulami. Jedná se o extrémně silné oxidační činidlo, které vytrhuje elektron z nenasycených mastných kyselin, hydroxylyje aminokyseliny a báze nukleových kyselin.

Proti působení ROS v organismech existuje řada obranných mechanismů, kterých se zúčastňuje řada látek, tzv. **antioxidantů**. Podle biologické funkce se dělí na enzymové antioxidační systémy (superoxididismutáza, glutathionperoxidáza, glutathiontransferáza, kataláza) a na nízkomolekulární antioxidanty (kyselina askorbová, tokoferoly, karotenoidy, flavonoidy, glutathion, kyselina lipoová, koenzym Q, bilirubin, kyselina močová). Vyčerpání antioxidantů vede k poškození tkáně v důsledku procesů označovaných obecně jako tzv. **oxidační stres**. Míra schopnosti tkáně vzdorovat oxidačnímu stresu je určena jednak množstvím v ní přítomných antioxidantů, jednak jejich druhem. Parametr, který koreluje se schopností tkáně odolávat oxidačnímu stresu, je označován jako **antioxidační kapacita**. Obsah antioxidantů se stanovuje nepřímou jako tzv. **celková antioxidační kapacita** (Total Antioxidant Capacity - TAC), která představuje schopnost systému vzdorovat oxidačnímu stresu.

Pro stanovení celkové antioxidační kapacity existuje velké množství metod, přičemž nejčastěji používanou metodou je **TEAC** (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). TEAC odpovídá antioxidační aktivitě vzorku, která je vztažena ke standardní látce – Troloxu (6hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), což je rozpustný syntetický analog vitamínu E.

Vlastní metoda stanovení je založena na zhašení uměle připraveného stabilního radikálu ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonová kyselina)). Působením persíranu draselného je ABTS převedeno na svůj stabilní radikál  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ . Tento radikál má tyrkysově modrou barvu. Přidáním vzorku s antioxidační kapacitou dochází ke

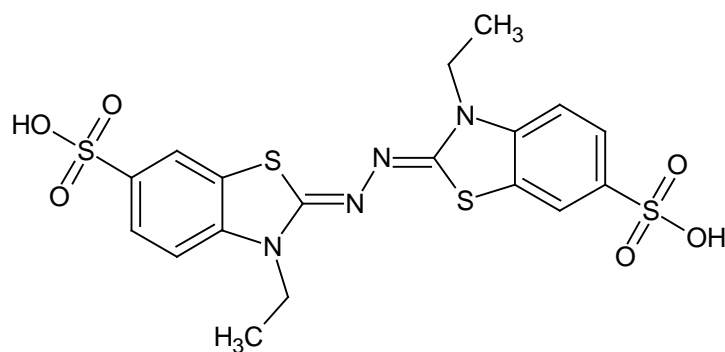
Obr.1: Trolox

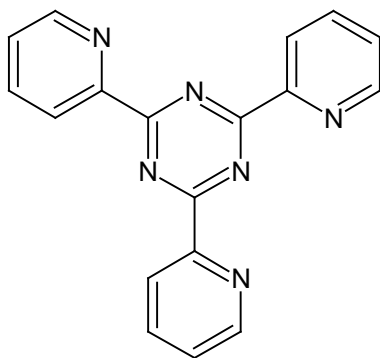


konverzi zpět na neutrální bezbarvou formu, přičemž celková barva přechází na světle zelenou až bezbarvou. Tato změna intenzity se měří fotometricky při vlnové délce 734 nm.

Další používaná metoda se nazývá **FRAP** (Ferric Reducing Antioxidant Power). Je založena na principu redoxní reakce, kde se využívá schopnost antioxidantů ve

Obr.2: ABTS





vzorku redukovat železité komplexy [např.  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin)], které jsou téměř bezbarvé a po redukci na  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ vytváří intenzivně fialové produkty, které se měří při vlnové délce 593 nm. Výsledek se poté vyjádří pomocí kalibrační křivky na ekvivalentní množství iontů  $\text{Fe}^{2+}$ . Narozdíl od metody TEAC je metodou FRAP měřena u antioxidantů spíše jejich redukční schopnost.

Obr.3: TPTZ

#### Doporučená literatura:

- 1) Štípek a kol.: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci, 2000
- 2) Ďuračková Z.: Volné radikály a antioxidanty v medicíně II, 1999