

Ocena stanu oksydo-redukcyjnego w żywych organizmach

BOŻENA BAŁASIŃSKA

Katedra Nauk Fizjologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159, 02-767 Warszawa

Bałasińska B.

Evaluation of antioxidant status in living organisms

Summary

Several methods have been developed to measure the total antioxidant capacity of biological samples. Interpreting the changes in plasma antioxidant capacity becomes complicated due to the range of methods used to detect these changes. The interpretation also depends upon the conditions under which the antioxidant capacity is determined because the measurement reflects outcomes in a dynamic system. An increased antioxidant capacity in plasma may not necessarily be a desirable condition if it reflects a response to increased oxidative stress. Similarly, a decrease in plasma antioxidant capacity may not necessarily be an undesirable condition if the measurement reflects decreased production of the reactive species. Because of these complications, no single measurement of antioxidant status will be satisfactory, but a „battery” of measurements will be necessary to adequately assess oxidative stress in biological systems.

Keywords: free radicals, reactive oxygen substances, ROS

Obecnie ponad połowa wszystkich publikacji z zakresu nauk medycznych i żywienia dotyczy badań zależności pomiędzy związkami biologicznie aktywnymi przede wszystkim pochodzenia roślinnego a reakcjami utleniania-redukcji (red-ox) zachodzącymi w żywych organizmach. W badaniach tych wykorzystuje się różne metody analityczne dla oznaczania zarówno właściwości związków biologicznie aktywnych, jak i dla wykazania ich wpływu na zdrowie człowieka. W artykule tym podjęto próbę zwrócenia uwagi na złożoność reakcji utleniania-redukcji zachodzących w żywych organizmach według mechanizmu wolnorodnikowego oraz niedoskonałość metod analitycznych stosowanych w badaniach oceny stanu red-ox tych organizmów.

Pod pojęciem reakcji utleniania-redukcji rozumiemy reakcje z przeniesieniem elektronów (niekoniecznie z udziałem tlenu), przy czym jeden z substratów jest akceptorem, a drugi donorem elektronów. Mechanizm wolnorodnikowy jest jednym z mechanizmów, według którego te reakcje przebiegają. Wolnym rodnikiem nazywamy atom lub cząsteczkę zdolną do samodzielnego istnienia i mającą na swojej orbicie walencyjnej jeden lub więcej niesparowanych elektronów. Pierwszą i podstawową reakcją red-ox w organizmach aerobowych jest oddychanie. W skrócie, podczas oddychania tlen ulega czteroelektronowej redukcji do obojętnej dla organizmu wody, ale od 1% do 5% tlenu może podlegać redukcji niecałkowitej. Powstaje wówczas cząsteczka, która posiada ładunek elektryczny

oraz niesparowany elektron na swojej powłoce walencyjnej – anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{\cdot-}$ (kropka oznacza niesparowany elektron, minus – ładunek ujemny). Mitochondria są więc jednym z głównych źródeł anionorodnika. Znaczne jego ilości mogą powstawać w reakcjach enzymatycznych (np. ksantyna/oksydaza ksantynowa); również fagocyty wytwarzają anionorodnik w stanach zapalnych. Anionorodnik ponadtlenkowy nie jest cząsteczką bardzo reaktywną. Paradoksalnie, w reakcji dysmutacji (jest to reakcja między dwoma identycznymi cząsteczkami, z których jedna jest donorem a druga akceptorem elektronów) przechodzi w związek o wiele bardziej reaktywny – H_2O_2 (wodę utlenioną) i w ten sposób zapoczątkowuje całą kaskadę reakcji wolnorodnikowych zachodzących w organizmie. Związki powstające w organizmie w wyniku reakcji zapoczątkowanej przez anionorodnik ponadtlenkowy, noszą nazwę reaktywnych form tlenu (RFT). Do RFT wytwarzanych w organizmie podczas przemian metabolicznych należą oprócz anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$): woda utleniona (H_2O_2), rodnik wodorotlenowy ($\cdot OH$), tlenek azotu (NO^{\cdot}), dwutlenek azotu (NO_2^{\cdot}), kwas nadtlenoazotawy ($HONO_2$), podchlorkawy ($HOCl$), podtocyjanawy ($HOSCN$). Reakcje RFT z cząsteczkami organicznymi prowadzą do powstania wolnych rodników substancji organicznych, przy czym niesparowany elektron może znajdować się wówczas na atomie tlenu, węgla lub azotu. Wolne rodniki, w których niesparowany elektron znajdzie się na atomie tlenu, również należą do RFT i są to, np.: rod-

Tab. 1. Reaktywne formy tlenu (RFT) powstające w żywych organizmach w procesach metabolicznych

RTF wolnorodnikowe	RTF nierodnikowe
Hydroksylowy (wodorotlenowy) $\cdot\text{OH}$	Kwas nadtlenoazotawy HONO_2
Aloksylowy $\text{RO}\cdot$	Kwas podchloraowy HOCl
Wodoronadtlenowy $\text{HOO}\cdot$	Kwas podtiocijanawy HO SCN
Peroksydowy $\text{ROO}\cdot$	Wodoronadtlenek ROOH
Tlenek azotu $\text{NO}\cdot$	Tlen singletowy $^1\text{O}_2$
Dwutlenek azotu $\text{NO}_2\cdot$	Woda utleniona H_2O_2
Anionorodnik ponadtlenkowy $\text{O}_2^{\cdot-}$	

nik aloksylowy $\text{RO}\cdot$, peroksydowy $\text{ROO}\cdot$ i wiele innych (tab. 1).

Rodnik wodorotlenowy ($\cdot\text{OH}$) uważany jest za najbardziej reaktywny spośród RFT. W jego powstawaniu dużą rolę odgrywają jony metali przejściowych (w żywych organizmach są to przede wszystkim żelazo i miedź). Uczestniczą one w reakcji z H_2O_2 (reakcja Fentona) lub z H_2O_2 i $\text{O}_2^{\cdot-}$ (reakcja Habera-Waisa), mogą reagować z HOCl lub $\text{O}_2^{\cdot-}$ i HOCl , H_2O_2 i $\text{NO}\cdot$. Enzymy, które ułatwiałyby detoksykację $\cdot\text{OH}$ są nieznane, jednak środowisko reakcyjne, pH, obecność przeciwutleniaczy w pobliżu powstającego rodnika i wiele innych czynników mogą uniemożliwiać jego powstanie. Ponadto w warunkach fizjologicznych metale przejściowe są silnie chelatowane, tzn. tworzą kompleksy o budowie pierścieniowej z wielopodstawnymi ligandami, np.: hemoglobina, albumina, ceruloplazmina, ferrytyna, transferyna. Tak silnie związane metale nie uczestniczą wówczas w powstawaniu rodnika wodorotlenowego, chociaż w przypadku choroby uwalnianie $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ jest możliwe, jednak nie jest do końca jasne, czy na pewno uczestniczą w reakcjach prowadzących do powstania $\cdot\text{OH}$.

Wolne rodniki mogą powstawać w organizmie nie tylko wskutek reakcji metabolicznych, ale mogą być również wytwarzane w wyniku przemian substancji dostarczanych do organizmu (pożywienia, leków i działania czynników fizycznych, np. promieniowania jonizującego). Wszystkie wyżej wymienione RFT mogą reagować bezpośrednio bądź pośrednio, zapoczątkowując szereg reakcji wolnorodnikowych zarówno ze składnikami komórkowymi, jak i pozakomórkowymi – lipidami, białkami i DNA, tworząc obce dla organizmu kolejne wolne rodniki lub związki powstałe w wyniku rekombinacji rodników. Lipoproteiny osocza lub lipidy błon komórkowych są najbardziej narażone na utlenianie ze względu na najniższą wymaganą energię potrzebną do tej reakcji. Dlatego też są one celem intensywnych badań i w związku z tym są najlepiej poznane.

Enzymy i endogenne przeciwutleniacze

RFT mają zdolność do reagowania z prawie wszystkimi strukturami komórkowymi i dlatego w organiz-

mie istnieją specjalne układy nie dopuszczające do powstawania uszkodzeń ważnych dla życia biomolekuł. Wyróżnia się enzymy przeciwutleniające oraz przeciwutleniacze endogenne.

Do enzymów przeciwutleniających (katalizujących rozkład RFT) należą:

- dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) – katalizuje dysmutację anionorodnika ponadtlenkowego $\text{O}_2^{\cdot-}$ do wody utlenionej (H_2O_2) i tlenu (O_2);
- katalaza (KAT) – rozkłada wodę utlenioną (H_2O_2) do wody i tlenu;
- peroksydaza (GPX) i reduktaza glutationowa (GR) – peroksydaza katalizuje utlenianie glutationu GSH przez nadtlentki zarówno wodoru, jak i lipidowe do GSSG, pełniąc w ten sposób rolę naprawczą, reperuje uszkodzone lipidy; reduktaza glutationowa uczestniczy w redukcji utlenionego glutationu GSSG do formy zredukowanego glutationu GSH i reguluje stosunek stężeń zredukowanego i utlenionego glutationu.

Przeciwutleniacze endogenne są to związki obecne w organizmie i wykazujące zdolność znoszenia wolnych rodników lub niedopuszczające do ich powstawania, tworząc cząsteczki, które nie mogą już dalej uczestniczyć w reakcjach wolnorodnikowych. Można te związki podzielić na:

- rozpuszczalne w wodzie:
 - witamina C, która znosi $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HOCl , $\text{ROO}\cdot$ rozpuszczalny w wodzie, tlen singletowy,
 - kwas moczowy (szczególnie znosi ozon),
 - związki zawierające grupy tiolowe ($-\text{SH}$) – albumina, glutation zredukowany GSH (który może działać bezpośrednio jako przeciwutleniacz, znosząc wiele rodników lub jako główny substrat dla peroksydazy glutationowej);
- rozpuszczalne w tłuszczach:
 - witamina E – zapobiega utlenianiu lipidów w błonach komórkowych i lipoproteinach. Może być regenerowana przez przeciwutleniacze rozpuszczalne w wodzie lub glutation zredukowany,
 - β -karoten – szczególnie efektywnie znosi tlen singletowy, ale również rodniki nadtlenkowe $\text{ROO}\cdot$. Ponadto β -karoten jest prekursorem witaminy A, która też jest przeciwutleniaczem rozpuszczalnym w tłuszczach,
 - ubichinon-10 – zredukowana forma koenzymu Q-10.

W tab. 2 przedstawiono przykłady stężenia przeciwutleniaczy obecnych w osoczu.

Stężenie RFT i przeciwutleniaczy obecnych w organizmie oraz aktywność enzymów przeciwutleniających może być miarą stanu oksydo-redukcyjnego organizmu. Zaburzenia homeostazy prowadzące do podwyższenia stężenia RFT zostało określone jako stres oksydacyjny. Ocena stanu oksydo-redukcyjnego (red-ox) może dotyczyć zarówno stanu fizjologicznego, jak i patologicznego organizmu lub może być wykorzystana do badania wpływu związków przeciwutleniających podawanych w diecie na ten stan.

Tab. 2. Stężenie i mechanizm działania niektórych przeciwutleniaczy osocza

Przeciwutleniacz	Stężenie (µM)	Mechanizm działania
Rozpuszczalne w wodzie		
Witamina C	30-150	znoszenie wolnych rodników
Kwas moczowy	160-450	
Glutation	1-2	znoszenie wolnych rodników, substrat dla peroksydazy glutationowej
Bilirubina	5-20	znoszenie wolnych rodników
Albumina	530-830	wiązanie jonów metali przejściowych, znoszenie HOCl
Rozpuszczalne w tłuszczach		
α-tokoferol	15-40	znoszenie rodnika peroksylogowego
γ-tokoferol	3-5	
Ubichinon-10	0,4-1	

Metody oceny stanu red-ox organizmu i wpływu przeciwutleniaczy na ten stan

Ocena poprzez oznaczanie pojedynczych wskaźników. Biochemia RFT jest nauką trudną, a możliwości metodyczne i analityczne do badania tych związków bardzo ograniczone. Bezpośrednią metodą do oznaczania RFT jest spektrometria elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). Technika ta pozwala oznaczać związki, które posiadają niesparowane elektrony. Niestety, czułość tej metody jest bardzo niska i uniemożliwia pomiar stężenia wolnych rodników obecnych w żywych organizmach (komórkach). Modyfikacje metody pozwalają dokonać pewnych pomiarów, ale tylko dla rodników stosunkowo trwałych. „Pułapkowanie spinowe” (spin trapping) polega na wykorzystaniu związków, przede wszystkim azotowych, do tworzenia połączeń bardziej stabilnych z badanymi wolnymi rodnikami (addukty). Jednak większość adduktów przechodzi dosyć szybko w związki nieparamagnetyczne, których pomiar w EPR jest niemożliwy. Inną wadą EPR i „pułapkowania spinowego” jest to, że różne rodzaje wolnych rodników dają takie samo widmo. Inną metodą to chemiluminescencja (emisja światła związana z reakcją chemiczną). Metoda ta ma również wiele wad. Świecenie wywołane przez reakcje wolnorodnikowe (ze względu na zbyt niskie stężenie wolnych rodników) jest bardzo słabe. Można je wzmocnić, wykorzystując substancje takie, jak np. luminol czy lucygenina, które w reakcji z wolnymi rodnikami będą emitować silniejsze światło. Substancje te jednak nie są specyficzne dla określonych wolnych rodników. Jeszcze inną wadą chemiluminescencji jest to, że inne procesy zachodzące w układzie reakcyjnym, w których powstaje energia również będą emitowały światło. Ponieważ nie ma dobrych bezpośrednich metod oznaczania stężenia wolnych rodników, dlatego do ich detekcji wykorzystuje się przede wszystkim metody pośrednie polegające na ocenie spektro-

fotometrycznej (zmiana koloru, widma). Aktywność enzymów nie jest również oznaczana bezpośrednio. Dlatego reakcje red-ox zachodzące w organizmach ocenia się na podstawie pomiaru stężenia substratów lub produktów reakcji wolnorodnikowych. Najbardziej poznane są reakcje utleniania lipidów. Badane substraty to lipoproteiny osocza lub lipidy pochodzące z tkanek. Produktami utleniania lipidów przez reaktywne formy tlenu są dieny sprzężone, krótkołańcuchowe aldehydy (aldehyd dimalonowy, 4-hydroksynonenal), alkany, alkeny oraz różne nadtlenki i wodoronadtlenki. Zwykle oznacza się tylko jeden z tych wskaźników, dlatego otrzymane wyniki przedstawiane jako utlenianie lipidów w płynach ustrojowych znacznie się od siebie różnią. Na przykład aldehydy można oznaczać w reakcji z kwasem tiobarbiturowym (TBA). Reakcja ta jest czuła, ale nie specyficzna. Tą metodą oznacza się również wszystkie inne produkty reakcji utleniania dające barwny kompleks z TBA. Dienes sprzężone oznacza się przy określonej długości fali, która jest charakterystyczna dla pochodnych jednego kwasu tłuszczowego, a nie wszystkich występujących w organizmie. Obecnie coraz częściej wykorzystuje się oznaczanie F_2 -izoprostanów jako produktów utleniania kwasu arachidonowego. Oznaczenie to jednak wymaga specyficznej aparatury, a wyniki nie są dostatecznie wiarygodne.

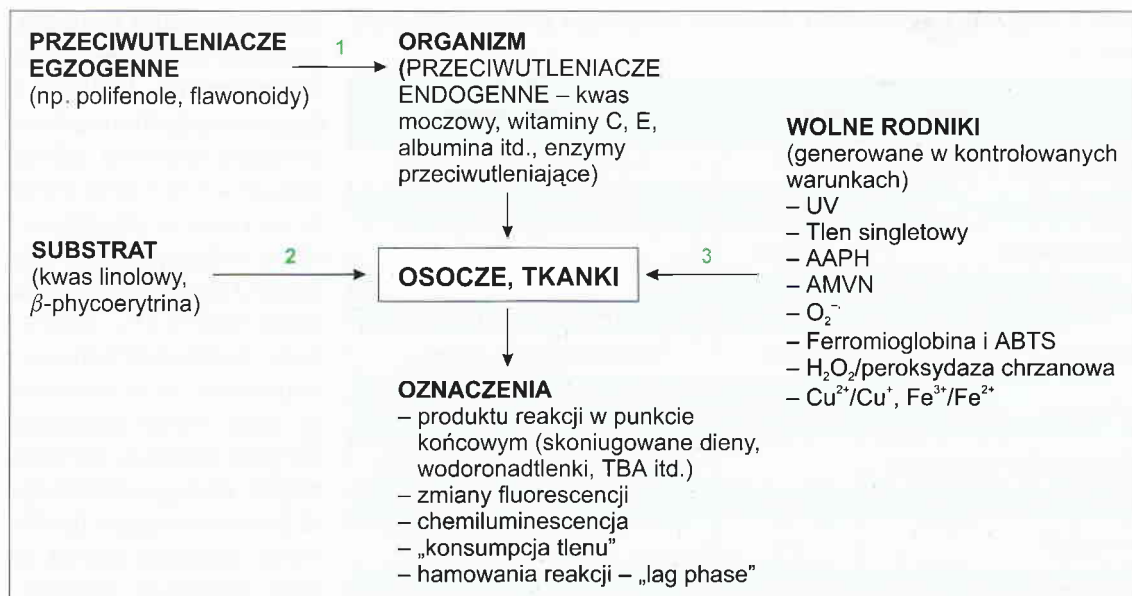
Podobnie jest przy utlenianiu białek i DNA. W reakcjach utleniania powstają różnorodne specyficzne produkty, które są wynikiem modyfikacji aminokwasów lub nukleotydów. Powstałe w tych reakcjach związki posiadające grupy karbonylowe wykorzystuje się do oceny stopnia utlenienia białek. Inne metody badania zmodyfikowanych białek obejmują reakcje RFT z grupami tiolowymi. W tym przypadku pomiar stężenia GSH oraz całkowitego stężenia glutationu i wyznaczenie stosunku GSH/GSSG jest miernikiem zmian, jakie zaszły w białkach w reakcji utleniania (1). Jeszcze inne metody mogą wykorzystywać reakcje grup aminowych z utlenionymi lipidami.

Innymi wskaźnikami mówiącymi o stanie red-ox organizmu może być pomiar stężenia witamin E, A, C w osoczu.

Całkowity potencjał przeciwutleniający (Total Antioxidant Status – TAS). Czynniki zewnętrzne mogą również modyfikować stan red-ox organizmów. Po wszechnie przyjmuje się, że stres oksydacyjny odgrywa istotną rolę w rozwoju wielu chorób, włączając w to miażdżycę oraz niektóre nowotwory, powoduje stany zapalne i starzenie się organizmów. W wielu przypadkach rzeczywiście obserwuje się w płynach ustrojowych wzrastającą ilość uszkodzonych przez wolne rodniki biomolekuł, szczególnie produktów utleniania lipidów. W większości przypadków jest to zjawisko wtórne i nie można bezpośrednio wykazać roli stresu

oksydacyjnego w tym procesie. Aby wykazać rolę stresu oksydacyjnego w określonym układzie (chorobie) należy wskazać na prawdopodobny mechanizm, przez który następuje wzrost „produkcji” wolnych rodników lub obniżenie aktywności enzymów biorących udział w reakcjach red-ox bądź zmniejszenie stężenia substancji przeciwutleniających w organizmie.

Podawanie przeciwutleniaczy powinno zapobiegać lub hamować rozwój choroby. Badania wpływu przeciwutleniaczy egzogennych na mechanizmy powstawania różnych chorób powodowały i nadal powodują rozwój nowych metod oceny stanu red-ox organizmów. W metodzie analitycznej łączy się na ogół stres oksydacyjny i działanie przeciwutleniaczy. Wszystkie te metody oparte są na bezpośrednim utlenianiu osocza lub tkanek, lub dodanego do osocza substratu (kwasów tłuszczowych, białka), wykorzystując różne inicjatory utleniania, a następnie dokonując pomiaru stężenia produktu utleniania w czasie, wyznaczając punkt, w którym przestają działać przeciwutleniacze (ryc. 1). Wynik wszystkich stosowanych metod na ogół przedstawia się w jednostkach umownych albo jako ekwiwalent Troloxu (pochodna witaminy E rozpuszczalna w wodzie) i ma on wskazywać całkowity status antyoksydacyjny. W 1985 r. Wayner i wsp. (8) pierwsi wprowadzili taką metodę pod nazwą TRAP (Total Peroksyl Radical-Trapping Antioxidant Potential). Podstawą oceny działania przeciwutleniającego badanego osocza jest „konsumpcja” tlenu zużywanego podczas reakcji. Wadą metody jest to, że można w niej oznaczać działanie przeciwutleniaczy albo rozpuszczalnych w wodzie, albo rozpuszczalnych w tłuszczach. Innym testem podobnym do TRAP jest metoda oparta na zdolności przeciwutleniaczy do redukcji żelaza związanego w kompleksie tripirydylotyrozyną – FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power) (2). Jeszcze inną metodą oceny stanu red-ox jest metoda ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) (3) oparta o prace Delange i Glazer (4, 5). W tej metodzie wyniki wyraża się w jednostkach ORAC lub jako ekwiwalent Troloxu. Jednak w przypadku, gdy jako inicjatora rodnika hydroksyloвого używa się Cu^{2+} , Trolox może być prooksydantem. Używanie go wówczas do wyrażania aktywności przeciwutleniającej jest dużym błędem. Prior i wsp.



Ryc. 1. Schemat oceny stanu oksydo-redukcyjnego żywych organizmów (drogi: 1, 2, 3 mogą być włączone w schemat oznaczenia pojedynczo lub w kombinacjach: 1-2-3 razem, 1-3 razem, 2-3 razem)

(7) używali AAPH jako źródła wolnych rodników i mierzyli stężenie dienów sprzężonych powstałych z kwasu linolowego dodanego do osocza jako substratu. Miller i wsp. (6) wprowadzili metodę TAA (Total Antioxidant Activity) opartą o pomiar absorbancji kationorodnika $\text{ABTS}^{+\cdot}$. Różne warunki (pH, nadmiar H_2O_2 , niewystarczająca ilość ABTS) mogą powodować powstawanie innych rodników absorbujących przy innej długości fali, odczyt pomiaru jest wówczas nieprawidłowy.

Podczas oznaczania właściwości przeciwutleniających osocza lub próbek bogatych w białko może pojawiać się też wpływ grup tiolowych. Zastosowanie odbiałczania badanych próbek może pomóc w uzyskaniu właściwego wyniku. Istnieje jeszcze wiele różnych metod i ich modyfikacji, które wykorzystywane są do oceny stanu oksydo-redukcyjnego organizmu. Nie jest jednak celem tego artykułu podanie wszystkich użytych metod, ale zwrócenie uwagi na różnorakie czynniki, które wpływają na otrzymane dane.

Interpretacja wyników

Porównując wyniki stanu red-ox organizmu uzyskane przez różnych badaczy można zauważyć, że znacznie się one między sobą różnią. Wynika to przede wszystkim z zastosowanego układu doświadczalnego. Dużą rolę w reakcjach red-ox odgrywają jony metali przejściowych. Występują one w układach red-ox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ i $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$, mają wysoki potencjał red-ox, mogą pobierać elektrony, katalizować wiele reakcji utleniania i redukcji. Ich obecność w układzie reakcyjnym może zmienić warunki reakcyjne tego układu, tzn. jeżeli są dwie substancje, które nie przereagowałyby ze sobą ze względu na zbyt małą różnicę potencjałów, to w obecności żelaza lub miedzi reakcja pomiędzy nimi jest możliwa. Wiele przeciwutleniaczy może reagować z jonami metali przejściowych, dając reaktywne

pochodne bądź inaktywować jony metali użyte do wywołania reakcji. Wówczas w metodzie, która zakładała stechiometrię reakcji przeciwutleniacz–inicjator wolnych rodników otrzymujemy błędne wyniki. Efektywność znoszenia wolnych rodników przez badany przeciwutleniacz zależy nie tylko od jego bezpośredniego działania. Na wynik reakcji wpływać będzie, oprócz jego stężenia, obecność innych substancji, które również mogą reagować z wolnymi rodnikami (np. w osoczu obecność albuminy, kwasu moczowego). Dostępność tego przeciwutleniacza, tzn. czy przeciwutleniacz znajduje się w bezpośrednim sąsiedztwie wolnych rodników, jest również istotna. Przy interpretacji wyników należy brać pod uwagę interakcje zachodzące pomiędzy przeciwutleniaczami obecnymi w układzie reakcyjnym, jakim jest np. osocze. Redukcja idzie zawsze w parze z utlenianiem, to znaczy, że jeden związek ulega utlenieniu (reduktor), a drugi musi się zredukować (utleniacz). Jeżeli w organizmie znajdują się obok siebie różne układy red-ox (substancje w stanie zredukowanym-utlenionym), może dojść do reakcji między nimi i to tym łatwiej, im różnica potencjałów między nimi jest większa. Istotnymi czynnikami są również: źródło wolnych rodników i substrat, z którym mają reagować. Na ogół produkty reakcji wolnych rodników nie są charakterystyczne dla określonego typu rodników. W podobny sposób mogą reagować wszystkie wolne rodniki i prowadzić do powstania związków trudnych bądź nawet niemożliwych do zidentyfikowania. Może to obniżać wydajność badanej reakcji i interpretacja wyników jest nieprawdziwa. Ważne są również metody analityczne, używane do oznaczenia postępu reakcji i punktu końcowego (produktu) utleniania. Niekiedy nawet przy użyciu tych samych technik analitycznych otrzymany wynik będzie nieprawdziwy ze względu na interakcje substratu, inicjatora i produktu końcowego reakcji.

Podsumowując, we wszystkich używanych metodach robi się pewne założenia, które nie zawsze są spełnione w żywym organizmie. Zakłada się liniowość otrzymanych wyników. Nie bierze się pod uwagę obecności innych składników w osoczu niż uznany przez nas jako substrat. A zatem interpretując wyniki całkowitego potencjału antyoksydacyjnego organizmu, należy wziąć pod uwagę wszystkie czynniki mogące ten potencjał kształtować, a także pamiętać, że jedną metodą trudno jest ten całkowity potencjał oznaczyć. Podejmując badania dotyczące roli przeciwutleniaczy i stresu oksydacyjnego w powstawaniu i rozwoju zmian chorobowych należy jeszcze zwrócić uwagę, że w niektórych przypadkach wyższy stan red-ox organizmu nie oznacza wpływu egzogennej przeciwutleniaczy, ale wzrost stężenia związków endogennych charakterystycznych dla określonej choroby (np. chroniczna niewydolność nerek u ludzi). W tym przypadku wzrastające stężenie kwasu moczowego podnosi status antyoksydacyjny osocza u chorych w porównaniu z osobnikami zdrowymi.

Na podkreślenie zasługuje również, że RFT odgrywa ważną rolę w transkrypcji i sygnalingu komórkowym. Podawanie przeciwutleniaczy może zakłócić równowagę red-ox w organizmie i zamiast oczekiwanego obniżenia ryzyka związanego ze szkodliwym działaniem RFT osiągniemy skutek odwrotny. To, co miało przynieść działanie korzystne dla zdrowia, może przyczynić się do jego pogorszenia.

Celem niniejszego opracowania nie jest zniechęcenie do podejmowania tego typu badań, ale zwrócenie uwagi na pewne, często pomijane zjawiska przy interpretacji wyników. Proponuje się również użycie kilku metod do oznaczania całkowitego potencjału przeciwutleniającego w tych samych próbkach, zanim wysnuje się wnioski na temat wpływu przeciwutleniaczy egzogennej na ten stan.

Piśmiennictwo:

1. Asensi M., Sastre J., Pallardo F. V., Lloret A., Lehner M., Garcia de la Asuncion J.: Ratio of reduced to oxidised glutathione as indicator of oxidative stress status and DNA damage. *Methods Enzymol.* 1999, 299, 267-76.
2. Benzi I. F. F., Strain J. J.: Ferric reducing (antioxidant) power as a measure of antioxidant capacity: the FRAP assay. *Methods Enzymol.* 1999, 299, 15-27.
3. Cao G., Prior R. L.: Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods Enzymol.* 1999, 299, 50-62.
4. Delange R. J., Glazer A. N.: Phycoerythrin fluorescence-based assay for peroxyl radicals: a screen for biologically relevant protective agents. *Anal. Biochem.* 1989, 177, 300-306.
5. Glazer A. N.: Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. *Methods Enzymol.* 1994, 234, 279-93.
6. Miller N. J., Rice-Evans C., Davies M. J., Gopinathan V., Milner A.: A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 1993, 84, 407-412.
7. Prior R. L., Cao G.: Antioxidant capacity and polyphenolic components of teas: implications for altering in vivo antioxidant status. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 1999, 220, 255-261.
8. Wayner D. D. M., Burton G. W., Ingold K. U., Locke S.: Quantitative measurement of the total, peroxyl radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. *FEBS Lett* 1985, 187, 33.

Adres autora: dr Bożena Bałasińska, ul. Nowoursynowska 159, 02-767 Warszawa

RODGERS J. D., MC CULLAGH J. J., MC NAMEE P. T., BELL C., BRICE N., SMYTH J. A., BALL H. J.: Izolacja patogennych *Staphylococcus aureus* z próbek powietrza wylęgarni brojlerów. (Recovery of pathogenic *Staphylococcus aureus* from broiler hatchery air samples). *Vet. Rec.* 153, 656-657, 2003 (21)

Higiena klujników odgrywa ważną rolę w produkcji drobiu. Zakażenie układu oddechowego przez *Staphylococcus aureus* występujący w powietrzu jest często przyczyną zapalenia płuc u indyczą i kurczą brojlerów. Badano powietrze klujników brojlerów w północnej Irlandii w czterech okresach, dwukrotnie w czasie wylęgu i dwukrotnie po zakończeniu cyklu produkcyjnego, oczyszczeniu i odkażeniu pomieszczeń. Badano m.in. powietrze z magazynu jaj, korytarzy, szaf klujnikowych, myjni. Próbkę powietrza posiewano na agar z krwią i na podłoża selektywne dla paciorkowców/gronkowców. Liczba bakterii była mniejsza w powietrzu z magazynu jaj i strefy łęgowej w porównaniu z pozostałymi badanymi strefami. W jednej wylęgarni występował *Staphylococcus aureus* biotyp drobiowy, w drugiej biotyp drobiowy i biotyp ludzki. Czyszczenie i odkażanie zmniejszało wybitnie liczbę bakterii w powietrzu, ale całkowicie nie eliminowało z niego potencjalnie patogennych bakterii.