

Der indirekte elektrochemische Nachweis von Radikalen und Radikalfängern in biologischen Matrices

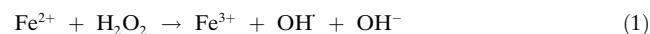
Fritz Scholz,* Gabriela López de Lara González, Leandro Machado de Carvalho, Maurício Hilgemann, Khenia Z. Brainina, Heike Kahlert, Robert Smail Jack und Dang Truong Minh

Freie Radikale wie das Hydroxylradikal OH^\cdot und das Superoxidradikal O_2^\cdot gehören zu den reaktivsten chemischen Spezies. Organische Gewebe enthalten eine Reihe von Enzymen wie die Superoxid-Dismutases zum katalytischen Abbau dieser zelltoxischen Spezies, die als Nebenprodukte des Zellmetabolismus entstehen und für ihre krebserregende Wirkung bekannt sind.^[1,2] Andererseits spielen Radikale aber auch eine wichtige Rolle bei der natürlichen Immunabwehr. Freie Sauerstoffradikale werden durch zirkulierende Monozyten und Neutrophile als Antwort auf die Lipopolysaccharide (LPS) der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien gebildet. Die Radikalbildung ist für die Zerstörung von Bakterien bei der Phagozytose von Bedeutung. Die Aktivierung dieser Zellen muss sorgfältig reguliert werden, da ein Überschuss an Radikalen das Gewebe des Wirts zerstören und zu einem septischen Schock beitragen kann.

Antioxidantien^[3,4] sind Verbindungen, die unter anderem mit freien Radikalen reagieren und diese zellschädigenden Spezies inaktivieren können. Wegen der großen Bedeutung freier Radikale und Antioxidantien besteht ein beträchtliches Bedürfnis an Techniken zur Detektion und Quantifizierung dieser beiden Verbindungsklassen. Für die Detektion von Radikalen steht die Elektronenspinresonanz-Spektroskopie an erster Stelle,^[5] da mit dieser Methode paramagnetische Spezies selektiv bestimmt werden können. In einigen Fällen kann auch die UV/Vis-Spektroskopie zur Detektion bestimmter freier Radikale verwendet werden.^[6] Auf der anderen Seite werden Antioxidantien gewöhnlich über ihre Reaktion mit freien Radikalen quantifiziert. Spektroskopische

Techniken können für einige Radikale hoch selektiv und empfindlich sein, doch häufig ist es schwierig, sie *in situ* in chemischen oder biologischen Systemen anzuwenden. Eine Vielzahl von hoch empfindlichen elektrochemischen Biosensoren für freie Sauerstoffradikale und Antioxidantien^[7–11] verwendet immobilisierte Redoxproteine, vor allem Cytochrome C, das leicht durch die freien Sauerstoffradikale reduziert wird, und es können typische katalytische Ströme gemessen werden. Die Nachteile von Biosensoren auf der Basis von Proteinen liegen in der begrenzten Stabilität und der zeitaufwändigen Präparation.

Hier berichten wir über einen neuen Ansatz zum Nachweis freier Radikale. Dabei wird die Zerstörung definierter Molekülschichten auf Elektrodenoberflächen durch freie Radikale elektrochemisch verfolgt. Mit Alkylthiolen lassen sich leicht selbstorganisierte Monoschichten (self-assembled monolayers, SAMs) auf Quecksilber- oder Goldelektroden erzeugen. Bei Verwendung geeigneter Verbindungen kann die Belegung der Elektrodenoberfläche dazu führen, dass das elektrochemische Signal einer redoxaktiven Substanz, z. B. des Hexamminruthenium(III)-Komplexes, in einer Elektrolytlösung vollständig unterdrückt wird.^[12,13] Solche SAMs sind bekanntermaßen sehr stabil, wir haben jedoch beobachtet, dass sie durch freie Radikale angegriffen werden. Wird eine Elektrode, die mit einer SAM belegt ist, in eine Lösung getaucht, in der freie Radikale erzeugt werden, etwa durch die Fenton-Reaktion [Gl. (1), siehe z. B. Lit. [14–16]]], so zerstören die freien Radikale die SAM, und das elektrochemische Signal der redoxaktiven Substanz lässt sich wieder detektieren. Die Signalhöhe ist dabei abhängig vom Grad der Auflösung der SAM.



In Abbildung 1 sind Voltammogramme von Quecksilber- und Goldelektroden in einer $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ -Lösung vor und nach der Modifizierung der Elektrodenoberfläche mit einer Hexanthiol-SAM sowie nach dem Angriff von OH^\cdot -Radikalen abgebildet, die in einer Fenton-Lösung über einen Zeitraum von 1 bzw. 5 Minuten erzeugt wurden. Abbildung 2 zeigt die Abhängigkeit der Peakströme von der Reaktionszeit der SAM mit den OH^\cdot -Radikalen der Fenton-Lösung. Kontrollexperimente haben gezeigt, dass die SAM weder durch Wasserstoffperoxid noch durch Eisen(II) oder Eisen(III) angegriffen wird. Experimente mit Hexacyanoferrat(II)-Ionen als redoxaktiver Spezies und einer Hexanthiol-SAM sowie einer Hexadecanthiol-SAM auf einer Goldelektrode machten

[*] Prof. Dr. F. Scholz, G. López de Lara González, Dr. H. Kahlert

Institut für Biochemie, Universität Greifswald
Felix-Hausdorff-Straße 4, 17487 Greifswald (Deutschland)

Fax: (+49) 3834-864-451

E-Mail: fscholz@uni-greifswald.de

Prof. Dr. L. Machado de Carvalho, M. Hilgemann
Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria
Caixa Postal 5051, Santa Maria—RS (Brasilien)

Prof. Dr. K. Z. Brainina
Urals State Economic University, Department of Chemistry
8th of March St. 62, Jekaterinburg 620219 (Russland)

Prof. Dr. R. S. Jack, D. T. Minh

Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin
Universität Greifswald
Sauerbruchstraße, 17487 Greifswald (Deutschland)

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

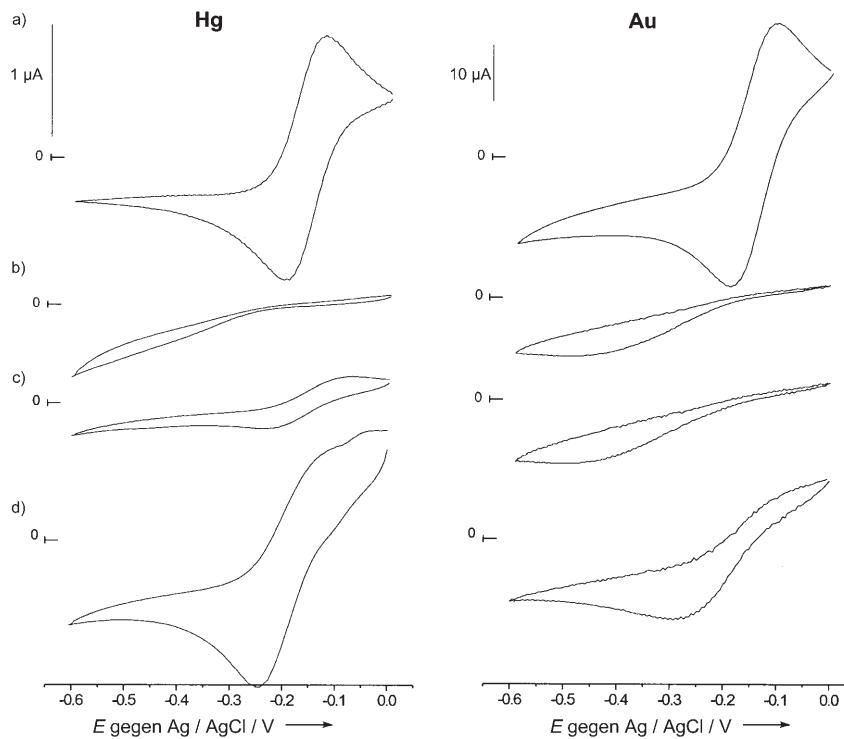


Abbildung 1. Cyclovoltammogramme einer $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ -Lösung ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) an nichtmodifizierten Elektroden (a), Hexanthiol-SAM-modifizierten Elektroden (b) sowie den SAM-modifizierten Elektroden nach der Einwirkung einer Fenton-Lösung für 1 min (c) und für 5 min (d). Die Cyclovoltammogramme wurden in $1 \times 10^{-3} \text{ M} [\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ in 0.01 M Acetatpuffer aufgenommen. Potentialvorschubgeschwindigkeit 500 mVs^{-1} .

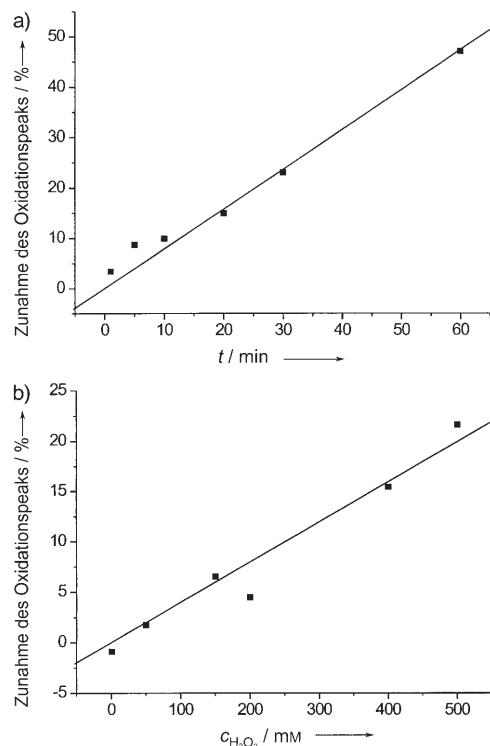


Abbildung 2. Abhängigkeit der Zunahme des Oxidationspeaks a) von der Reaktionszeit der Hexanthiol-SAM-modifizierten Elektrode mit der Fenton-Lösung und b) von der Konzentration an Wasserstoffperoxid bei konstanter Reaktionszeit (5 min). Zusammensetzung der Fenton-Lösung für (a): $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$ und $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$, pH 4.7; für (b): Das molare Verhältnis von Fe^{2+} zu H_2O_2 war jeweils 1:1. Die Aufnahme der Cyclovoltammogramme erfolgte wie bei Abbildung 1.

deutlich, dass auch Hexadecanthiol durch OH^\cdot -Radikale angegriffen wird. Eine komplett Ablösung der SAM konnte dabei jedoch nicht erreicht werden. SAMs können auch durch Einwirkung starker Oxidationsmittel wie Permanganat in saurer Lösung von Elektrodenoberflächen abgelöst werden. Solche Reaktionen finden jedoch nicht unter physiologischen Bedingungen statt, sodass sie in Versuchen mit biologischem Bezug nicht berücksichtigt werden müssen. Interessanterweise ist die Ablösung der Monoschichten immobilisierter Redoxproteine bei den oben beschriebenen Biosensoren durch Sauerstoffradikale nicht beobachtet worden. Das kann mit der Verwendung sehr stabiler SAMs (z. B. aus 11-Mercaptoundecansäure) und mit den sehr niedrigen Radikalkonzentrationen zusammenhängen. Zweifellos entscheidet die Auswahl der SAM über das Ausmaß der Zerstörung durch freie Sauerstoffradikale.

Dieser neue Ansatz zur Quantifizierung freier Radikale anhand ihrer Wirkung – der Ablösung einer SAM von einer Elektrodenoberfläche – kann auch zur Quantifizierung von Antioxidantien, d. h. Radikalfängern, verwendet werden. Bei-

spielsweise senkt die Zugabe von Ascorbinsäure die Zerstörungskraft einer Fenton-Lösung deutlich (Abbildung 3).

Schließlich haben wir versucht, freie Radikale nachzuweisen, die produziert werden, wenn humane mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) mit Lipopolysacchariden (LPS) von Gram-negativen Bakterien versetzt werden, um die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies anzuregen („oxygen burst“). Die PBMCs wurden dazu in einer Zelldichte von $3 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ in einem Kulturmedium aus RPMI 1640, Penicillin, Streptomycin und 10% fötalem Kalbsserum suspendiert. Aus *Salmonella typhimurium* isolierte LPS wurden in einer Gesamtkonzentration von 20, 200

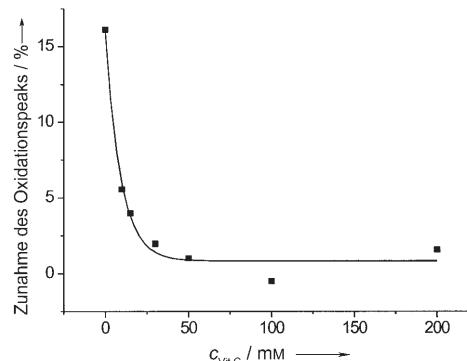


Abbildung 3. Abhängigkeit der Zunahme des Oxidationspeaks von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ nach 5 min Reaktionszeit in einer Fenton-Lösung ($c_{\text{Fe}^{2+}}$ und $c_{\text{H}_2\text{O}_2} = 0.2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4.7) von der Ascorbinsäure-Konzentration c_{VitC} in der Fenton-Lösung. Die Aufnahme der Cyclovoltammogramme erfolgte wie bei Abbildung 1.

oder 1000 ng mL^{-1} zugesetzt. Die Elektroden wurden den aktivierte Zellen dann 5 bis 30 Minuten ausgesetzt. Die relative Zunahme des Rutheniumsignals betrug zwischen 0.4% (5 min in 200 ng mL^{-1} LPS) und 9.6% (20 min in 200 ng mL^{-1} LPS). Für eine nichtfraktionierte Gesamtblutprobe und 200 ng mL^{-1} LPS stieg die relative Zunahme des Signals von 0.2% (5 min) über 0.7% (10 min) schließlich auf 0.9% (20 min). Bei einer konstanten Reaktionszeit von 5 min stieg die relative Zunahme von 0.2% (200 ng mL^{-1} LPS) auf 1.4% (1000 ng mL^{-1} LPS). Die relative Zunahme des Rutheniumsignals war vergleichbar mit jener, die durch die Einwirkung einer Fenton-Lösung mit einer millimolaren Wasserstoffperoxid-Konzentration beobachtet worden ist. Der Effekt von 20 ng mL^{-1} LPS auf PBMC bei einer Reaktionszeit von 5 min war demnach genauso groß wie derjenige einer Fenton-Lösung mit einer Wasserstoffperoxid-Konzentration von 4 mmol L^{-1} . Kontrollexperimente haben gezeigt, dass die relative Zunahme des Signals allein in Experimenten mit lebenden Blutzellen auftritt.

Die hier beschriebenen Experimente zeigen, dass irreversibel auf Elektrodenoberflächen adsorbierte Schichten zur Untersuchung freier Radikale und zur Quantifizierung der Radikalfängereigenschaften von Antioxidantien verwendet werden können. Mit unserem System konnten wir eine 3σ -Nachweisgrenze von $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ für die Bestimmung von Wasserstoffperoxid bei einer Reaktionszeit von 5 min erreichen. Bedenkt man die kurze Lebensdauer der OH^\cdot -Radikale, kann man davon ausgehen, dass deren Konzentration beträchtlich kleiner ist.

Es ist zu erwarten, dass eine Reihe anderer Schichten, die man durch die Immobilisierung von Farbstoffen, Arzneistoffen, Polymeren usw. erzeugen kann, in den vorgeschlagenen Studien Anwendung finden kann. Erste Experimente mit adsorbiertem Riboflavin verliefen vielversprechend, auch im Hinblick auf wesentlich niedrigere Nachweisgrenzen. Adsorbiertes Riboflavin ist überdies selbst elektrochemisch aktiv, sodass kein zusätzliches Redoxsystem notwendig ist. Mithilfe von modifizierten Goldelektroden könnten sogar Radikalaktivitäten in lebendem Gewebe *in situ* bestimmt werden.

Experimentelles

Eine Goldscheibenelektrode (3 mm Durchmesser) und eine Quecksilber-Multimode-Elektrode (beide von Metrohm, Herisau) wurden als Arbeitselektroden verwendet. Die Hilfselektrode bestand aus einem dicken Platindraht. Eine Ag/AgCl-Elektrode mit 3 M KCl wurde als Referenzelektrode eingesetzt. Alle Messungen wurden mit einem μ -AUTOLAB III durchgeführt (Eco-Chemie, Utrecht). Hexanthon und Hexadecanthon wurden von Aldrich bezogen. Die Fenton-Lösungen wurden jeweils frisch aus Ammoniumeisen(II)-hexahydrat (Merck), Eisen(II)-chlorid-tetrahydrat oder Eisen(II)-sulfat-heptahydrat (Merck), einem 0.01 M Acetatpuffer (pH 4.7) und einer Wasserstoffperoxidlösung hergestellt. Die Konzentrationen an Fe^{2+} und an H_2O_2 variierten dabei von 0 bis 500 mmol L^{-1} . Wenn nicht anders angegeben, betrug das molare Verhältnis zwischen Fe^{2+} und H_2O_2 1:1. Die Goldelektrode wurde vor den Experimenten nach einer in Lit. [17] beschriebenen Prozedur poliert. Die Erzeugung der SAMs auf der Elektrode erfolgte aus Ethanollösung des Alkanthiols mit einem Gehalt von 20 Vol.-% entsprechend den Angaben in Lit. [18,19] nach der „soaking procedure“. Die Elektrode wurde für kurze Zeit (15 s bis 2 min im Fall der Quecksilbertropfelektrode,

5 min im Fall der Goldelektrode) in die Lösung des Alkanthiols getaucht. Die mit dem Thiol belegte Elektrode wurde mit Ethanol und Wasser gewaschen und dann in die $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ -Lösung ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, ACROS) getaucht. In dieser Lösung wurde ein Cyclovoltammogramm aufgezeichnet. Anschließend wurde die Elektrode gewaschen und 1 bis 60 min in eine frisch hergestellte Fenton-Lösung getaucht. Die Reaktion der Fenton-Lösung mit der SAM-modifizierten Elektrode wurde durch das Entfernen der Elektrode aus der Fenton-Lösung und Waschen mit Wasser und Ethanol beendet. Im Anschluss wurde mit dieser Elektrode erneut ein Cyclovoltammogramm in einer $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ - oder Hexacyanoferrat(II)-Lösung aufgezeichnet, um das Ausmaß der Reaktion der Fenton-Lösung mit dem Film zu ermitteln. Humane mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) wurden durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation mit Ficoll (1.077 g mL^{-1}) wie bereits beschrieben isoliert.^[20] RPMI-1640-Kulturmedium, Penicillin-Streptomycin-Lösung und fetales Kalbsserum wurden von Gibco-Invitrogen, gereinigtes Lipoplysaccharid aus *Salmonella typhimurium* von Sigma-Aldrich bezogen.

Eingegangen am 19. Juni 2007,
veränderte Fassung am 10. Juli 2007
Online veröffentlicht am 17. September 2007

Stichwörter: Analytische Methoden · Antioxidantien · Elektrochemie · Radikale · Ruthenium

- [1] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3. Aufl., Oxford University Press, Oxford, **1999**.
- [2] H. S. Black, *Integr. Cancer Ther.* **2004**, *3*, 279–293.
- [3] *Handbook of Antioxidants*, 2. Aufl. (Hrsg.: E. Cadenas, L. Packet), Dekker, New York, **2002**.
- [4] Kh. Z. Brainina, A. V. Ivanova, E. N. Sharafutdinova, E. L. Lozovskaya, E. I. Shkarina, *Talanta* **2007**, *71*, 13–18.
- [5] F. Gerson, W. Huber, *Electron Spin Resonance Spectroscopy of Organic Radicals*, Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
- [6] I. Janik, D. M. Bartels, C. D. Jonah, *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 1835–1843.
- [7] W. Scheller, W. Jin, E. Ehrentreich-Förster, B. Ge, F. Lisdat, R. Büttemeier, U. Wollenberger, F. W. Scheller, *Electroanalysis* **1999**, *11*, 703–706.
- [8] A. V. Krylov, M. Beissenhirtz, H. Adamzig, F. W. Scheller, F. Lisdat, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 1327–1330.
- [9] M. K. Beissenhirtz, F. W. Scheller, M. S. Viezzoli, F. Lisdat, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 928–935.
- [10] M. Yuasa, K. Oyaizu, *Curr. Org. Chem.* **2005**, *9*, 1685–1697.
- [11] M. Beissenhirtz, F. Scheller, F. Lisdat, *Electroanalysis* **2003**, *15*, 1425–1435.
- [12] U. Akiba, M. Fujihira in *Encyclopedia of Electrochemistry*, Vol. 10 (Hrsg.: A. J. Bard, M. Stratmann, M. Fujihira, J. F. Rusling, I. Rubinstein), Wiley-VCH, Weinheim, **2007**, S. 30.
- [13] R. Guidelli in *Encyclopedia of Electrochemistry*, Vol. 10 (Hrsg.: A. J. Bard, M. Stratmann, M. Fujihira, J. F. Rusling, I. Rubinstein), Wiley-VCH, Weinheim, **2007**, S. 105.
- [14] A. Georgi, A. Schierz, U. Trommler, C. P. Horwitz, T. J. Collins, F.-D. Kopinke, *Appl. Catal. B* **2007**, *72*, 26–36.
- [15] M. S. Lucas, J. A. Peres, *Dyes Pigm.* **2007**, *74*, 622–629.
- [16] I. Yamazaki, L. H. Piette, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 13589–13594.
- [17] R. F. Carvalhal, R. Sanches Freire, L. T. Kubota, *Electroanalysis* **2005**, *17*, 1251–1259.
- [18] F. Tadini-Buoninsegni, R. Herrero, M. R. Moncelli, *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *452*, 33–42.
- [19] P. Krysinski, M. R. Moncelli, F. Tadini-Buoninsegni, *Electrochim. Acta* **2000**, *45*, 1885–1892.
- [20] G. Wiegand, K. Selleng, M. Gründling, R. S. Jack, *Clin. Chem. Lab. Med.* **1999**, *37*, 369–372.