

Av **TIM HOFER**, PhD, MabCent-SFI, Universitetet i Tromsø og **RAGNAR LUDVIG OLSEN**, PhD, MabCent-SFI, Universitetet i Tromsø.
E-post: tim.hofer@uit.no

Cellebasert metode for måling av lipidperoksidasjon og antioksidantaktivitet

Introduksjon

Cellemembranene utsettes kontinuerlig for angrep fra frie radikaler som forårsaker lipidperoksidasjon (Figur 1). Lipidperoksidasjonen er forhøyet i degenerative sykdommer som Alzheimers, Parkinsons og multipel sklerose, i sykdommer som involverer jernoverskudd, og ved kronisk inflammasjon (1, 2). I tillegg kan eksponering for sollys skade hudcellenes lysosomer og frigjøre proteinbundet jern, som igjen kan indusere lipidperoksidasjon (3). Ved lipidperoksidasjon dannes reaktive produkter (Figur 1) som kan gi uønskede strukturelle endringer på molekylnivå og være mutagene, det vil si forandre DNA. Slike reaksjoner kan bidra til raskere aldring, celledød og kreftutvikling. Antioksidanter kan imidlertid motvirke slike prosesser (4, 5) og har derfor fått stor oppmerksomhet i mange forskningsprosjekter verden over.

Daglig inntak av frukt og grønnsaker kan redusere forekomsten av sykdommer som aterosklerose, demens, kreft og aldring. Dette kan skyldes at frukt og grønnsaker inneholder fyto-kjemikalier, blant annet potente antioksidanter. Svært få stoffer er imidlertid evaluert, og antioksidanter benyttes ikke i noen større grad i behandling av sykdom. Høye inntak av enkelte antioksidanter (vitamin E, β -karoten, med flere) kan være skadelig. Antioksidanter finnes i alle organismer og er godt karakterisert i terrestriske organismer, for eksempel i planter. Blant annet er mer enn 4 000 polyfenoler identifisert (5). Kunnskapen om antioksidanter i det marine miljø er imidlertid begrenset. Bare i norsk Arktis og subarktiske farvann finnes tusenvis av arter, for eksempel mikroorganismer, virvelløse dyr og planter (alger) som ennå ikke er kjemisk karak-

terisert. Innenfor marin bioprospektering forsøker vi å finne nye stoffer i marine organismer som kan nyttes til å forebygge og behandle sykdommer.

Identifisering av nye potente antioksidanter krever følsom metodikk som kan håndtere og teste et stort antall prøver av varierende kjemisk natur. Så langt har antioksidantaktivitet hovedsakelig blitt vurdert med kjemiske analyser, som metodene Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) (6, 7) og Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) (8). Analysebetingelsene er langt fra fysiologiske og de tar heller ikke hensyn til om stoffene blir opptatt i cellene. Dette gjør relevansen av resultatene uklare. FRAP gjennomføres for eksempel ved pH 3,6 og omfatter ikke dannelse av frie radikaler. Det er av betydning for bio-prospekteringen at antall falske positive treff i ekstrakter med ukjent

Sammendrag

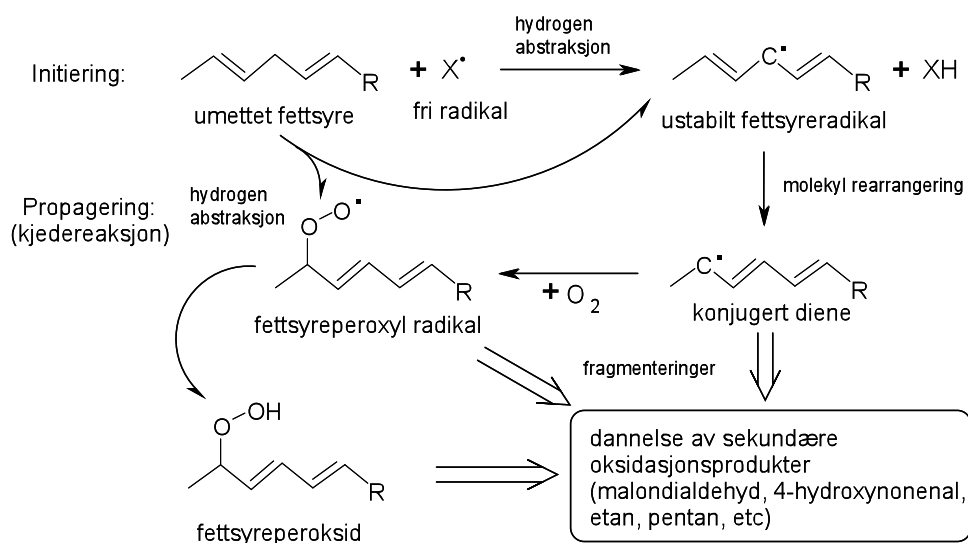
Bakgrunn: Flere sykdomsforhold involverer forhøyet lipidperoksidasjon hvor frie radikaler skader cellemembraner. Umettede fettsyrer oksiderer i nærvær av oksygen, for eksempel etter initiering av peroksid, og i nærvær av transisjonsmetaller som jern og kopper. Inntak av naturlige antioksidanter, inkludert metallbindere og radikalfangere, kan minske lipidperoksidasjonshastigheten.

Materiale og metode: For å studere og identifisere nye antioksidanter, har vi etablert en metode i 96-brønnsformat basert på leverceller (HepG2), hvor lipidperoksidasjonshastigheten blir målt. Metoden, forkortet CLPAA (Cellular Lipid Peroxidation Antioxidant Activity), er basert på den cellemembranløselige og svært oksidasjonsfølsomme fluorescerende røde proben C_{11} -BODIPY. Lipidperoksidasjonen induseres ved tilsetning av lipofil kumen hydroperoksid (cumOOH), og dannelse av grønne fluorescerende C_{11} -BODIPY oksidasjonsprodukter måles med plateleser.

Resultat og fortolkning: Resultatene viser at måling av hastigheten for dannelse av grønne C_{11} -BODIPY oksidasjonsprodukter fungerer bedre enn å måle tap av rød uoksidert C11-BODIPY. Fra doseresponstester av antioksidanter over store konsentrasjonsintervall, beregnes konsentrasjonen for 50 % hemmende effekt (IC_{50} -verdien) og en rekke antioksidanter kan sammenlignes. Metoden demonstreres med direkte sammenligning av jernbinderen desferrioxamine (DFO) og flavonoiden luteolin, som både kan binde metaller og nøytralisere frie radikaler. Etter en times inkubasjon ga luteolin større beskyttende antioksidativ effekt ($IC_{50} = 5,21 \mu M$) enn DFO ($IC_{50} = 784 \mu M$).

Nøkkelord: lipidperoksidasjon, antioksidant, C_{11} -BODIPY, jern, oksidativ stress.

Bioingeniøren er godkjent som vitenskapelig tidsskrift. Denne artikkelen er fagfellevurdert og godkjent etter Bioingeniørens retningslinjer.



Figur 1. Forenklet modell for lipidperoksidasjon i cellemembraner. Initiering kan skje ved at et fritt radikal X^\bullet (HO^\bullet , RO^\bullet , ROO^\bullet , med flere) stjeler et hydrogenatom fra en umettet fettsyre, og danner et fettsyreradikal. Reaksjon med oksygen igangsetter en termodynamisk fordelaktig kjedereaksjon med dannelse av reaktive stoffer (sekundære oksidasjonsprodukter) som malondialdehyd (MDA) og 4-hydroxynonenal (4-HNE). Disse kan reagere med biologiske makromolekyler som nukleinsyrer og proteiner, og danne addukter som bl.a. kan forårsake mutasjoner i DNA. Nærvær av katalytiske transisjonsmetaller (redoxsyklende jern- og kopperioner) kan drastisk øke lipidperoksidasjonshastigheten, noe som kan ha betydning da jern akkumuleres i menneskelige organer med økt alder (18).

sammensetning begrenses.

I denne artikkelen beskriver vi en cellebasert mikroplatemetode (Cellular Lipid Peroxidation Antioxidant Activity; CLPAA, vårt akronym) for å

måle lipofile antioksidanter og naturlige ekstrakter (skjema 1). Metoden er basert på den cellemembranløselige og oksidasjonsfølsomme lipofile proben C_{11} -BODIPY (9-11) som har lav celletoksisitet (11, 12). Prinsipper for CLPAA-metoden er beskrevet i figur 2.

For demonstrasjon av metoden sammenlignes jernbinderen desferrioxamine (DFO - en bakteriell siderofor) med flavonoiden luteolin, en polyfenol som finnes naturlig i mange terrestriske planter, inkludert grønnsaker og te. Spesielt te fra gule krysantemumblomster har høy luteolinkonsentrasjon, og teen har interessant nok tradisjonelt vært anvendt som folke-medisin i Asia. DFO er en hydrofil sterk Fe^{3+} -binder ($k_m \sim 10^{30.6}$) men med langsomt celleopptak hovedsakelig ved endocytose. DFO er mye brukt for behandling (klinisk kjent som Desferal® som administreres gjennom injeksjon) av jernrelaterte sykdommer, som hemokromatose. På grunn av flavonoidenes hydrofobe karakter kan de binde jernioner, nøytralisere radikaler og passere cellemembraner (13, 14).

Metode

Humane leverceller fra karsinom (HepG2) dyrkes i medium (MEM Earle's, Biochrom F0325, Berlin, Tysk-

Abstract

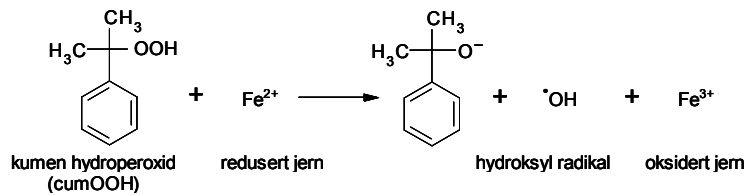
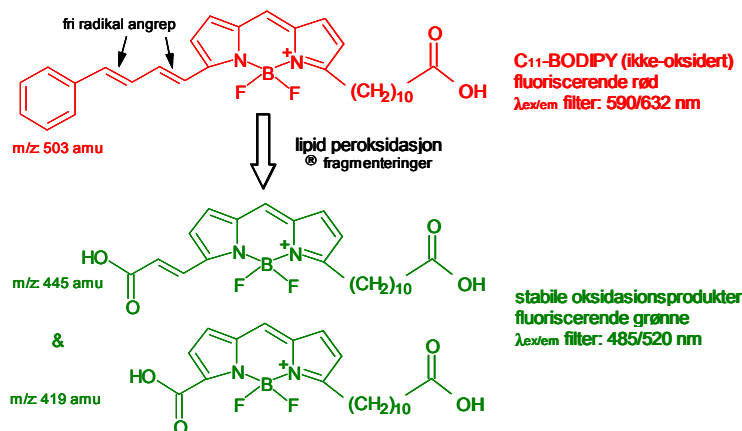
Background: Several medical conditions involve increased lipid peroxidation where free radicals damage cellular membranes. Unsaturated fatty acids oxidize in presence of oxygen after initiation by peroxides in presence of transition metals such as iron and copper. Intake of natural antioxidants, including metal chelators and radical scavengers, can decrease the rate of lipid peroxidation.

Materials and Methods: In order to study and identify novel antioxidants, we have established a liver cell (HepG2) based method in 96-well microplates, in which the lipid peroxidation rate is measured. The method, abbreviated CLPAA (Cellular Lipid Peroxidation Antioxidant Activity), is based on the cellmembrane soluble and highly oxidation sensitive red fluorescent probe C_{11} -BODIPY. Lipid peroxidation is induced by adding lipophilic cumene hydroperoxide (cumOOH), and green fluorescent C_{11} -BODIPY oxidation products are monitored using a plate reader.

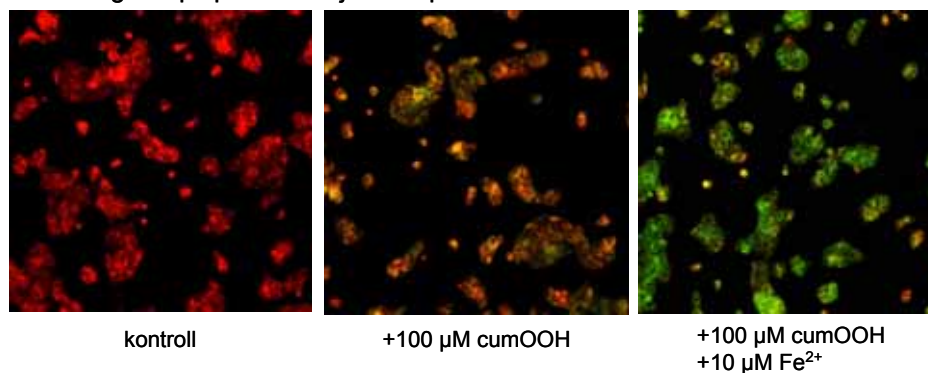
Results and interpretation: The results show that measurement of the formation rate of green C_{11} -BODIPY oxidation products works better than measuring losses of red non-oxidized C_{11} -BODIPY. From dose-response tests of antioxidants over broad concentration ranges, half maximal inhibitory concentrations (called IC_{50} -values) are calculated for comparison of antioxidant efficiency. The method is demonstrated with direct comparison of the iron-binder desferrioxamine (DFO) with the flavonoid luteolin, capable of both binding metals and neutralizing free radicals. Following one hour of incubation, luteolin offered greater protective antioxidant effect ($IC_{50} = 5,21 \mu M$) than DFO ($IC_{50} = 784 \mu M$).

Keywords: lipid peroxidation, antioxidant, C_{11} -BODIPY, iron, oxidative stress

A Induksjon av lipidperoksidasjon

B C₁₁-BODIPY oksidasjon i cellemembraner

C Måling av lipidperoksidasjon i HepG2 celler



Figur 2. Prinsipper for lipidperoksidasjonsmetoden CLPAA. Cellene blir tilsatt C₁₁-BODIPY og eventuelt antioksidanter, og deretter oksidant (se skjema 1).

A. I CLPAA-metoden tillsettes den lipofile oksidanten cumOOH som i nærvær av redusert jern kan danne hydroksylradikaler ($\cdot\text{OH}$), som vil initiere lipidperoksidasjon (se figur 1) i cellemembraner (9).

B. Den oksidasjonsfølsomme lipofile proben C₁₁-BODIPY er naturlig fluorescerende rød. Ved angrep fra frie radikaler under lipidperoksidasjonen oksideres proben og spaltes ved konjugerte diener (piler), og danner to stabile fluorescerende grønne oksidasjonsprodukter som har mistet en fenylgruppe (19). Fragmenteringen korrelerer til graden av lipidperoksidasjon og måles med fluorescens.

C. Fluorescens-mikroskopi av grønn og rød C₁₁-BODIPY-fluorescens under lipidperoksidasjon i HepG2 celler. Bildene ble tatt cirka en time etter tilsetning av cumOOH og Fe²⁺. Før eksponering hadde cellene tatt opp 5 μM C₁₁-BODIPY i 30 min. Inkubasjonstemperaturen var 37°C.

land) supplert med 10 % fetal bovine serum (FBS), ikke-essensielle aminosyrer, L-glutamin, natriumpyruvat og gentamycin, i 175 cm² flasker som holdes i vannmettet 5 % CO₂-atmosfære ved 37°C. Etter vask av celler med fosfatbufret saltvann (PBS, Mg²⁺- og Ca²⁺-fri), trypsineres cellene i 5 min og resuspenderes i cellekulturmediet. Cellekonsentrasjonen bestemmes

med telling i Bürkers tellekammer, og om lag 80 000 celler (per 100 μl) blir sådd i svarte 96-brønns polystyrenmikroplater med gjennomsiktig bunn (se skjema 1). Ved å la cellene sette seg på bunnen ved romtemperatur (~30 min) før inkubasjon ved 37°C, minimeres artefakter (15). Etter 24 timer blir eksperimentet utført.

Cellene vaskes med PBS og inkuberes med 5 μM C_{11} -BODIPY (invitrogen D3861, Eugene, OR) i 30 min ved 37°C. Etter skifte til behandlingsmedium (FBS-fri MEM Earle's supplert som ovenfor) tilsettes antioksidanter, og cellene inkuberes ved 37°C i 60 min. Etter en rask PBS-vask tilsettes Hanks salt buffer (Biochrome L2035), supplert med glukose og 50 μM kumen-hydroperoksid (cumOOH, Sigma-Aldrich) som initierer lipidperoksidasjonen. Grønn og rød fluorescens måles i løpet av en time inne i en plateleser (Wallac VICTOR3, Perkin Elmer) ved 37°C. De brukte lys-filtrene var 485/14 nm (eksitasjons) og 520/10 nm (utslipp) for grønn fluorescens, og 590/7 nm og 632/45 nm for rød. Med innstilling av eksitasjonsbølglengde > 580 nm for rød fluorescens, unngås lysabsorpsjon av C_{11} -BODIPY oksidasjonsprodukter som dannes i løpet av eksperimentet (9).

Kontrollbrønner med og uten cumOOH og med kjente antioksidanter (ved screening av fraksjonerte ekstrakter), inkluderes i alle platene. Inkubasjonstider og vaskeprosedyrer kan justeres for å studere effektene av en forbindelse mer detaljert. Antioksidanter kan sammenlignes parallelt ved identiske konsentrasjoner, eller ved å sammenligne IC_{50} -verdier, konsentrasjonen for 50 % hemmende effekt (half maximal inhibitory concentration). Siden antioksidanter kan ha sterkt varierende effekter, gir sammenligning av antioksidanter ved en bestemt konsentrasjon begrenset informasjon. IC_{50} er et mål på effektiviteten av et stoff, jo lavere verdi jo bedre, og kan bestemmes fra dose-responstester av antioksidanter over store konsentrasjonsintervaller, med tilpassing av sigmoidale dose-responsekurver. Slike kan i tillegg gi informasjon om hvor raskt konsentrasjonsøkningen gir effekt ("Hill slope"). Vanligvis ses en sterk konsentrasjonsavhengighet for potente antioksidanter i μM - mM intervallet (-6 til -3 på en logskala). Selv om full beskyttelse ikke kan oppnås, kan approksimative IC_{50} -verdier fås gjennom å ekstrapolere kurven. Kurveberegninger, hvor bunnplataet settes til $y = 0$ (som reflekter en perfekt antioksidant), ble utført med programmet Prism 5 (GraphPad Software), ved bruk av sigmoidal kurvetilpasning av data med fire parameters logistisk ligning. Absolutte IC_{50} -verdier er avhengige av celletetthet og andre eksperimentelle forhold. Antioksidanter er følsomme for oksidative modifikasjoner, spesielt ved lave konsentrasjoner. Gjentatte tester av preparater med separate utveininger og fortynninger bør utføres for å bekrefte resultatene.

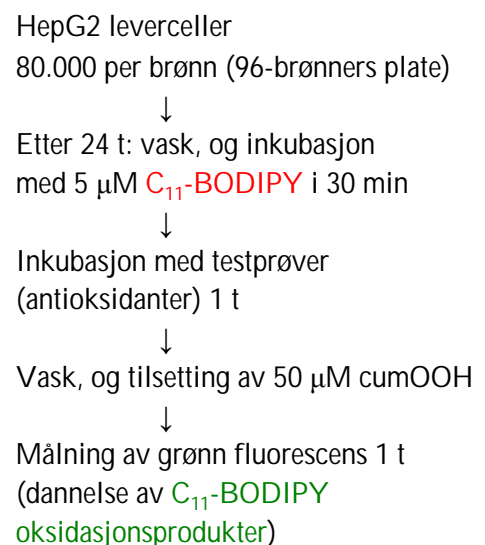
C_{11} -BODIPY løses i dimetyl sulfokside (Sigma-

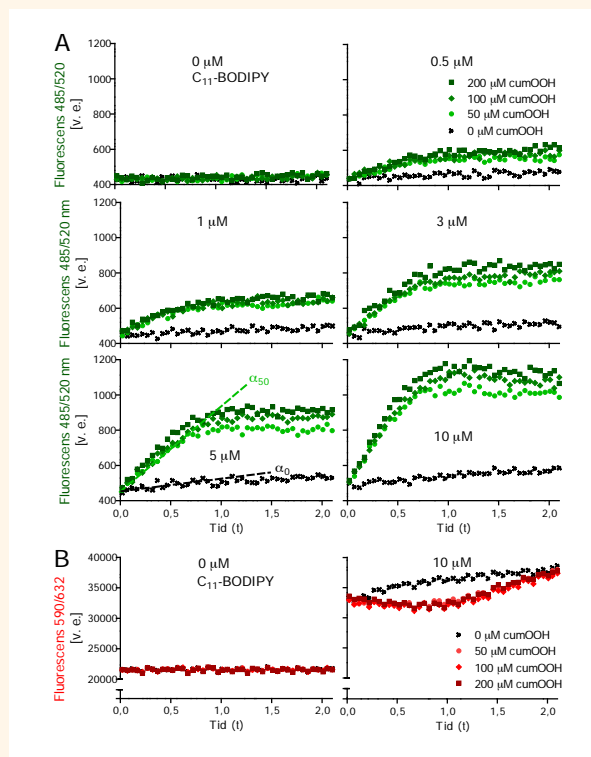
Aldrich) til 6 mM, porsjoneres og lagres frosset for senere tining og umiddelbar fortynning i nevnte behandlingsmedium. DFO (Sigma-Aldrich) og luteolin (Cayman Europe, Tallinn, Estonia) blir de som oftest løst i vann og etanol og fortynnet i behandlingsmedium. Ved testing av sterkt lipofile prøver og antioksidanter (som carotenoider) blir de løst i DMSO, og serielt fortynnet i ren DMSO. Til slutt blir 1 μl DMSO tilsatt alle brønner som inneholder 99 μl medium for å gi 1 % DMSO. DMSO og etanol opp til 1 % (v/v) har ikke noen signifikant effekt på lipidperoksidasjonshastigheten, og blir dessuten vasket vekk før tilsetning av cumOOH (skjema 1). CumOOH (88%) oppbevares i kjøleskap og fortynnes umiddelbart for bruk.

Resultater

Fluorescensmikroskopering av C_{11} -BODIPY-inkuberte HepG2 celler viste at lipidperoksidasjonen i fravær av oksidant nesten er ikke-eksisterende (Figur 2C, venstre). Kun rød (og ikke grønn) fluorescens ble påvist etter en times inkubasjon ved 37°C. Tilsetning av oksidanten cumOOH reduserte den røde og økte den grønne fluorescensen noe som tyder på betydelig lipidperoksidasjon. Ved tidligere studier med C_{11} -BODIPY har både nedgangen i rød og økningen i grønn fluorescens blitt brukt til å anslå lipidperoksidasjonen (9, 11). Vi fant at med dyrkede HepG2-celler i 96-brønnsplater, fungerte måling av økningen i grønn fluorescens bedre enn måling av nedgang i rød

Skjema 1. CLPAA-metoden





(Figur 3). Nedgang i rød fluorescens var relativt lav i forhold til økningen i grønn fluorescens, og høye bakgrunnssignaler fra platen gir det røde fluorescensområdet lavere følsomhet enn det grønne. Vi undersøkte også om forholdet grønn/rød fluorescens ved endepunktet kunne brukes, men fant ut at visse forbindelser påvirker (absorberer) grønne og røde lyssignaler forskjellig. Dette gir en uønsket ikke-lineær effekt som er spesielt tydelig ved høyere konsentrasjoner.

Tilsetning av jern (Fe^{2+}) økte den cumOOH-induserte lipidperoksidasjonshastigheten i HepG2 cellene (Figur 2C, høyre). Celler dyrket i medium og supplert med serum, har vanligvis tilstrekkelige mengder labilt jern (om lag $5 \mu\text{M}$ i cytosolen hos hepatocytter (16)-mitokondrier og lysosomer har høyere innhold). Siden tilsetning av katalyserende jern vil kreve høyere konsentrasjoner av antioksidanter for samme beskyttelse og gi mindre naturlige forhold, undersøkte vi om tilsetning av ekstra jern var nødvendig for cumOOH induert lipidperoksidasjon.

Hvor mye cumOOH og C_{11} -BODIPY man skal bruke, avhenger blant annet av cellekonsentrasjon, inkubasjonstiden og instrumentets følsomhet. Konsentrasjonstester med C_{11} -BODIPY (Figur 3) viste stabil initial lineær økning av grønn fluorescens etter cumOOH

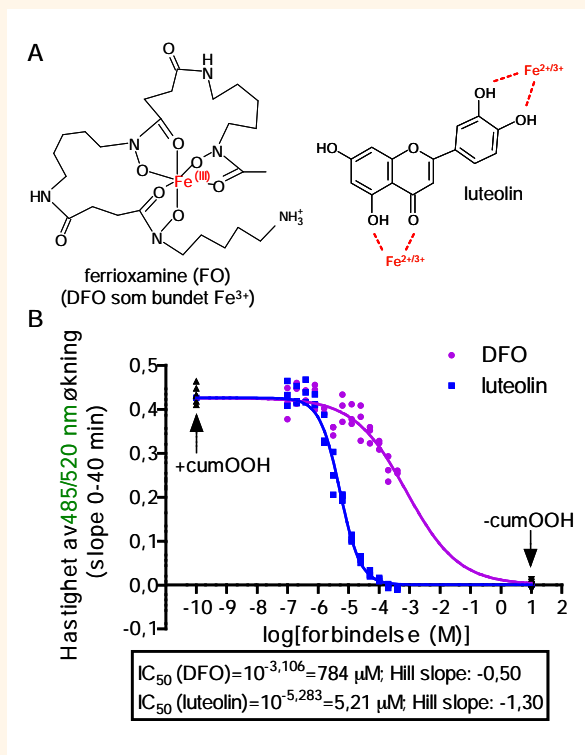
Figur 3. Optimalisering av C_{11} -BODIPY og cumOOH konsentrasjoner for den cellebaserte lipidperoksidasjonsmetoden CLPAA. HepG2-celler (80 000 per brønn, 24 timer etter utsåing) tok opp C_{11} -BODIPY i indikerte konsentrasjoner (0-10 μM) i løpet av 30 min ved 37°C . Etter vask med PBS ble det tilsatt cumOOH og (A) grønn og (B) rød fluorescens ble målt. Gode signaler fra dannelse av grønne C_{11} -BODIPY oksidasjonsprodukter ble målt mellom 3-10 μM C_{11} -BODIPY. CumOOH-konsentrasjon over $50 \mu\text{M}$ ga bare liten økning i peroksidasjonen. For rød fluorescens viste det seg at platen på 96-brønnsplattene (Costar 3603) ga sterkt signal allerede uten tilsetning av C_{11} -BODIPY ved samme lysintensitet som for grønn fluorescens (kun resultatene for 0 og 10 μM C_{11} -BODIPY vises). Tilsetning av C_{11} -BODIPY økte det røde signalet signifikant. Fra dette eksperimentet ble $5 \mu\text{M}$ C_{11} -BODIPY og $50 \mu\text{M}$ cumOOH valgt for rutinemessig test av antioksidanter. Stigningskoeffisienter (indikert med α_0 og α_{50}) fra lineær regresjon for økningen i grønn fluorescens i det initiale lineære tidsintervallet 0-40 min brukes som mål på lipidperoksidasjonshastigheten. Data er fra avlesning hvert tredje minutt der punkter motsvarer gjennomsnittverdien av $N = 4$ avlesninger.

tilsetning ved 3-10 μM C_{11} -BODIPY (80 000 HepG2 celler per brønn), men 10 μM ga ingen betydelige fordeler over $5 \mu\text{M}$, og ved konsentrasjoner $\leq 1 \mu\text{M}$ C_{11} -BODIPY blir det, ut fra våre erfaringer, vanskelig å skille de røde og grønne signalene fra bakgrunnen (celler, plast). Konsentrasjonstester med cumOOH viste videre at peroksidasjonshastigheten ikke nødvendigvis er relatert til konsentrasjonen av cumOOH, men i større grad kan være avhengig av innholdet av lipidassosierte, katalytiske metaller, mest sannsynlig assosierte jernioner. Inkubasjon med $5 \mu\text{M}$ C_{11} -BODIPY i 30 min for inkubasjon med antioksidanter og eksponering for $50 \mu\text{M}$ cumOOH ble valgt som standard forhold (skjema 1).

Ved direkte sammenligning mellom DFO og luteolin, ga luteolin sterkest antioksidativ beskyttelse, med fullstendig stopp av lipidperoksidasjonen ved høye konsentrasjoner (Figur 4). Andre kommersielle antioksidanter og ekstrakter (HPLC fraksjonerte) fra marine organismer har blitt testet i CLPAA-metoden med tilfredsstillende reproducerbare resultater.

Diskusjon

Tradisjonelt har lipidperoksidasjon blitt studert i biologiske systemer *in vitro* ved å bruke preparerte mikrosomer fra rottelever, hvor dannet malondialdehyd (reaktivt oksidasjonsprodukt) reagerer med



Figur 4. Redusert lipidperoksidasjonshastighet ved tilsetning av antioksidanter.

A. Kjemiske strukturer for testede stoffer i CLPAA analysen. Når DFO, som er et lineært hydrofilt positivt (+1) ladet molekyl ved pH 7,4, binder Fe^{3+} erstattes tre protoner og ferrioxamine (FO, +1 ladet ved pH 7,4) dannes (venstre). Luteolin, en hydrofob uladet flavonoid, kan binde fritt Fe^{2+} eller Fe^{3+} på forskjellige plasser (høyre) (4, 13), og kan i tillegg nøytralisere frie radikaler gjennom å donere et hydrogenatom (H^{\cdot}) eller et elektron (e^{-}) (13). Blant annet kan et uladet luteolin- Fe(II) kompleks dannes (uladete molekyler passerer celledemembraner lettere).

B. Dose-responstester av DFO og luteolin i CLPAA-metoden. HepG2-celler (80 000 per brønn, 24 timer etter utsåing) tok opp $5 \mu\text{M}$ C_{11} -BODIPY i 30 min, fulgt av én time inkubasjon med DFO og luteolin. Etter en PBS-vask ble $50 \mu\text{M}$ cumOOH tilsatt for å indukere lipidperoksidasjon. Dannelseshastigheten av fluorescerende grønne C_{11} -BODIPY oksidasjonsprodukter (y-akse) i det lineære intervallet 0-40 min, ble redusert med økt innhold av antioksidantene (x-aksen er logaritmisk). Hver konsentrasjon (0-400 μM) ble testet i triplikat ($N = 6$ for kontrollene) og hele eksperimentet kunne utføres i en 96-brønnplate. Sammenligningen viser at luteolin ($\text{IC}_{50} = 5,21 \mu\text{M}$) var mye bedre til å forhindre lipidperoksidasjon enn DFO ($\text{IC}_{50} = 784 \mu\text{M}$).

thiobarbitursyre (17). Denne prosedyren har ofte fått kritikk for å være uspesifikk og ukomplett, og kan vanskelig brukes for studier av lipidperoksidasjon hos celler dyrket i mikroplater. CLPAA-metoden benytter den oksidasjonsfølsomme proben C_{11} -BODIPY, som er godt egnet til studier av oksidasjonstilstanden i intakte membraner hos levende celler dyrket i mikropateformatet. CLPAA-metoden er beskrevet for leverceller, men kan sannsynligvis brukes også på andre celletyper.

Det bør noteres at antioksidanter kan påvirke fluorescensen gjennom lysabsorpsjon, men ved måling av endring av lipidperoksidasjonshastighet som i CLPAA, trenger man ikke å korrigere for antioksidantens egen lysabsorbans.

Våre celler beskytter seg mot høye frie transisjonsmetallnivåer. Tilsetning av ekstra jern i metoden er ikke nødvendig, noe som innebærer eksperimentelle forhold nærmere de fysiologiske. Vi har funnet at metoden også kan brukes for å påvise stoffer som øker lipidperoksidasjonshastigheten (prooksidanter), men vi viser ikke disse dataene i denne artikkelen.

Oppsummering

En følsom metode for testing av antioksidanter i en cellebasert lipidperoksidasjonsmodell har blitt utviklet. Metoden måler hastigheten for dannelse av

fluorescerende grønne C_{11} -BODIPY oksidasjonsprodukter. Ved at hastigheten reduseres ved tilsetning av antioksidanter, kan virkningsgraden (antioksidativ kapasitet) til antioksidanter bestemmes. Denne beskrevne CLPAA-metoden vil være et godt supplement til eksisterende metoder (de kjemiske metodene FRAP og ORAC, samt de cellebaserte CAA og Comet-metodene) vi bruker for å finne ukjente antioksidanter ved vår pågående screening av ekstrakter fra marine organismer. Ved CLPAA-basert screening har vi funnet flere stoffer med høy aktivitet i fraksjonerte marine ekstrakter. Stoffene blir nå opprenset og kjemisk karakterisert, og kan forhåpentligvis komme til nytte.

Takk til

Norges forskningsråd og vår samarbeidspartner ABC Bioscience for finansiell støtte av prosjektet. Fluorescensmikroskopibilder ble tatt ved Universitetet i Tromsøs kjernefasilitet Bioimaging.

Referanser

1. Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21: 172-88.
2. Hazen SL. Oxidized phospholipids as endogenous pattern recognition ligands in innate immunity. *J Biol Chem*, 2008, 283: 15527-31.

3. Reelfs O, Tyrrell RM, Pourzand C. Ultraviolet A radiation-induced immediate iron release is a key modulator of the activation of NF-kappaB in human skin fibroblasts. *J Invest Dermatol*, 2004, 122: 1440-7.
4. Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Prog Lipid Res*, 2007, 46: 244-82.
5. Beliveau R, Gingras D. *Mat mot kreft*. Oslo: Kagge Forlag, 2008.
6. Halvorsen BL, Holte K, Myhrstad MC et al. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *J Nutr*, 2002, 132: 461-71.
7. Pellegrini N, Serafini M, Colombi B et al. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr*, 2003, 133: 2812-9.
8. Davalos A, Gomez-Cordoves C, Bartolome B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *J Agric Food Chem*, 2004, 52: 48-54.
9. Pap EH, Drummen GP, Winter VJ et al. Ratio-fluorescence microscopy of lipid oxidation in living cells using C11-BODIPY(581/591). *FEBS Lett*, 1999, 453: 278-82.
10. Naguib YM. A fluorometric method for measurement of peroxyl radical scavenging activities of lipophilic antioxidants. *Anal Biochem*, 1998, 265: 290-8.
11. Drummen GP, Makkinje M, Verkleij AJ et al. Attenuation of lipid peroxidation by antioxidants in rat-1 fibroblasts: comparison of the lipid peroxidation reporter molecules cis-parinaric acid and C11-BODIPY(581/591) in a biological setting. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1636: 136-50.
12. Drummen GP, van Liebergen LC, Op den Kamp JA et al. C11-BODIPY(581/591), an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. *Free Radic Biol Med*, 2002, 33: 473-90.
13. van Acker SA, van den Berg DJ, Tromp MN et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med*, 1996, 20: 331-42.
14. Melidou M, Riganakos K, Galaris D. Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: the role of iron chelation. *Free Radic Biol Med*, 2005, 39: 1591-600.
15. Lundholt BK, Scudder KM, Pagliaro L. A simple technique for reducing edge effect in cell-based assays. *J Biomol Screen*, 2003, 8: 566-70.
16. Ma Y, de Groot H, Liu Z et al. Chelation and determination of labile iron in primary hepatocytes by pyridinone fluorescent probes. *Biochem J*, 2006, 395: 49-55.
17. Searle AJ, Willson RL. Stimulation of microsomal lipid peroxidation by iron and cysteine. Characterization and the role of free radicals. *Biochem J*, 1983, 212: 549-54.
18. Zecca L, Youdim MB, Riederer P et al. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*, 2004, 5: 863-73.
19. Drummen GP, Gadella BM, Post JA et al. Mass spectrometric characterization of the oxidation of the fluorescent lipid peroxidation reporter molecule C11-BODIPY(581/591). *Free Radic Biol Med*, 2004, 36: 1635-44.