

# 1 Metody stanovení antioxidantů

Antioxidanty nazýváme látky schopné i v relativně nízkých koncentracích konkurovat ostatním potenciálně oxidovatelným substrátům, a tím oddálit či zcela inhibovat jejich oxidační destrukci. **Antioxidanty** jsou tedy nezbytné pro udržení redoxní rovnováhy v organismu a zabraňují vzniku oxidačního stresu způsobeného kyslíkovými (ROS) či dusíkovými radikály (NOS) jejichž vznik je popsán v kapitole 4. Fagocytóza. Tyto látky lze rozdělit do dvou skupin – **enzymatické** a **neenzymatické**.

Mezi **primární** enzymatické antioxidanty (zabraňující tvorbě či přímo likvidující vzniklé volné radikály) patří především **superoxid dismutáza (SOD)**, **kataláza (CAT)** a **glutathion peroxidáza (GPX)**. SOD katalyzuje přeměnu superoxidu na peroxid vodíku a  $O_2$ . Takto vzniklý peroxid vodíku následně rozkládá CAT na  $H_2O$  a  $O_2$  (především při vysokých koncentracích  $H_2O_2$ ), nebo GPX za současné oxidace tripeptidu **glutathionu (GSH)** a vzniku  $H_2O$  (především při nízkých koncentracích  $H_2O_2$ ). Takto vzniklý oxidovaný GSH je následně redukován **sekundárními** enzymatickými antioxidanty mezi které patří především **glutathion reduktáza** nebo **glukóza-6-fosfát-dehydrogenáza**.

Mezi neenzymatické antioxidanty patří naopak velké množství látek, které lze rozdělit např. na vitamíny, kofaktory enzymů, dusíkaté sloučeniny či peptidy. Nejvýznamnějšími antioxidanty patřící mezi vitamíny jsou vitamíny A, E a C. Koenzym Q10 a jeho redukováná forma ubiquinol jsou antioxidanty patřící mezi kofaktory enzymů. Nejdůležitější dusíkatou sloučeninou s antioxidačním potenciálem je kyselina močová. Dalšími důležitými antioxidanty jsou již zmíněný GSH, melatonin, flavonoidy, karotenoidy či fenolové sloučeniny rostlin. Většina neenzymatických antioxidantů působí jako redukční činidlo proti většímu množství volných radikálů, nejčastěji proti superoxidovému anionu, peroxidu vodíku, hydroxylovému radikálu, singletovému kyslíku či oxidu dusnatému.

Oxidační stres je příčinou mnoha závažných onemocnění jako jsou nemoci kardiovaskulárního systému či rakovina. Tato onemocnění jsou jedním z nejčastějších příčin úmrtí ve vyspělých zemích a jejich prevence formou správné životosprávy či dostatečného přísunu pro člověka esenciálních antioxidantů je tedy klíčová.

## 1.1 METODY STANOVENÍ CELKOVÉ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY BIOLOGICKÝCH VZORKŮ

Existuje několik metod, jež se využívají pro měření celkové antioxidační kapacity (**Total Antioxidant Capacity, TAC**) nejrůznějších biologických vzorků TAC reflektuje aktivitu všech potenciálních antioxidantů obsažených ve vzorku. Vzhledem k tomu, že se *in vivo* mechanismy účinků jednotlivých antioxidačních molekul významně liší, není možné TAC zcela objektivně změřit jen jednou metodou, naopak je potřeba kombinovat metod více. Je tedy možné využít metod spektrofotometrických, fluorescenčních či luminometrických.

### 1.1.1 Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TAEC)

Jedná se o **spektrofotometrickou metodu** využívající tmavě modrý oxidant ABTS $\bullet^-$  vznikající oxidací kyseliny 2,2'-azinobis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonové) (ABTS $^{2-}$ ) persulfátem draselným. Vzniklý tmavě modrý roztok je naředěn etanolem či puftrem na  $OD_{734} = 0,7$  a následně je k němu přidán vzorek o různých koncentracích či **Trolox** (kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová) jako antioxidační standard. Koncentrace vzorku dávající stejnou procentuální změnu absorbance roztoku jako 1mM Trolox je považována za TAEC.

### 1.1.2 Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP)

Další **spektrofotometrickou metodou** využívanou ke stanovení antioxidačních vlastností biologických vzorků je tzv. **Ferric Reducing Ability of Plasma** tedy **FRAP**. Metoda využívá redukčního potenciálu antioxidačních látek na tripyridyltriazin železitý (FeIII-TPTZ), který je za nízkého pH redukován na svou železnatou formu spolu s intenzivním modrým zbarvením. Změna absorbance po přidání vzorku je měřena při 593 nm a výsledky jsou následně porovnávány proti změně absorbance standardního roztoku železnaté (Fe<sup>II</sup>) formy TPTZ. Jedna jednotka FRAP je tedy definovaná jako redukce 1 mol Fe<sup>III</sup> na Fe<sup>II</sup>.

### 1.1.3 Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

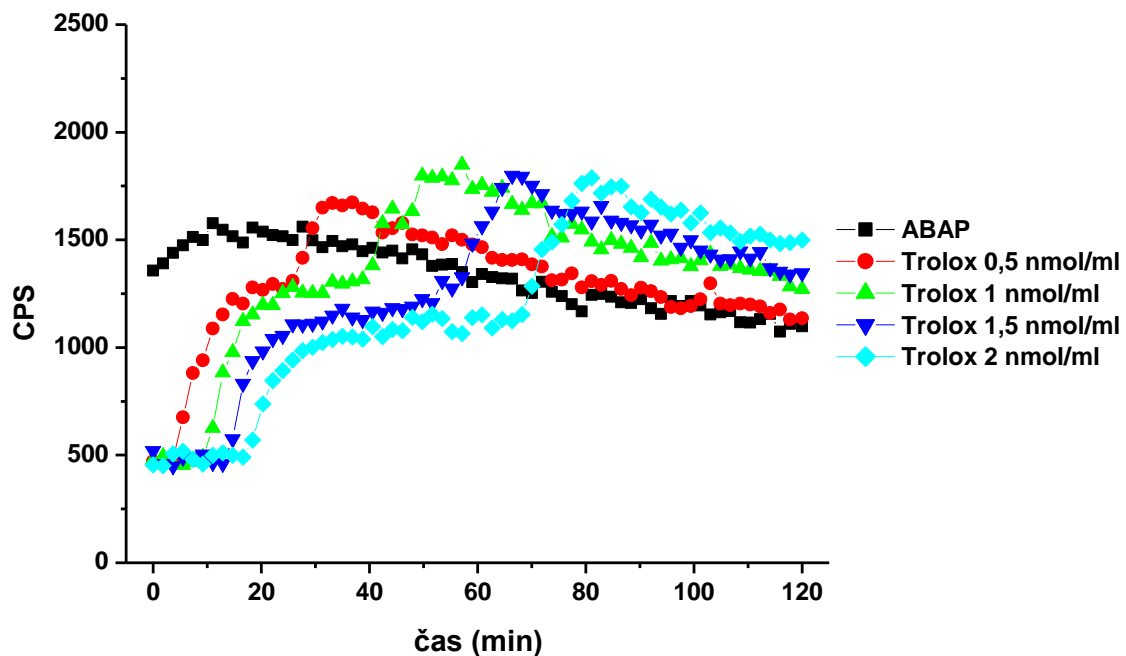
Významnou **fluorescenční** metodou měření TAC je **Oxygen Radical Absorbance Capacity - ORAC**. Metoda je založena na měření vychytávání peroxylového radikálu antioxidanty obsaženými ve vzorku. Peroxylový radikál je indukován 2,2-azobis-2-amidinopropan hydrochloridem (**ABAP**) při 37 °C. Zbylé peroxylové radikály, jež nejsou odstraněny antioxidanty, dále oxidují (ničí) fluorescenční próbu, např. fluorescein, což má za následek úbytek fluorescenčního signálu. K vyhodnocení celé metody se buď používá porovnání plochy pod křivkou fluorescenčního signálu, kdy plocha blanku je nižší než plocha vzorku obsahujícího antioxidanty, nebo se porovnávají křivky vzorků s křivkami standardu, např. Troloxu

## ÚLOHA X: Stanovení antioxidační kapacity metodou TRAP

Nejpoužívanější **luminometrickou** metodou, měřící TAC je **Total Radical-trapping Antioxidant Parameter (TRAP)**. Metodu TRAP lze využít pro stanovení antioxidační kapacity nejrůznějších biologických vzorků - např. krve/plasmy obratlovců, hemolymfy hmyzu, rostlinných extraktů a dalších.

### Princip

Metoda je stejně jako u ORAC založena na termální dekompozici **ABAPu**, jež produkuje stálou hladinu peroxylového radikálu. Ten oxiduje **luminol**, který produkuje chemiluminiscenční signál měřený luminometrem. Pokud je přidán vzorek obsahující antioxidant nebo **Trolox**, který se používá jako standard, peroxylové radikály jsou těmito látkami vychytávány až do doby, než jsou všechny antioxidanty vyčerpány a chemiluminiscenční signál tedy narůstá až po uplynutí této doby. Různé koncentrace Troloxu následně vytvoří kalibrační křivku a podle rovnice regrese této křivky je možné dopočítat antioxidační kapacitu vzorku vyjádřenou jako odpovídající antioxidační kapacita určité koncentrace Troloxu (nmol/ml). Pro získání výsledků se z křivek Troloxu i vzorků odečte poloviční čas potřebný k dosažení nejvyššího bodu křivky (píku).



### Chemikálie a roztoky:

- PBS (3,8 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  rozpuštěno ve 100 ml 0,85% roztoku NaCl); pH 7,4
- trolox (6-hydroxy-2,5,7,8,-tetraethyl-chroman-2-carboxylic acid;  $M_r = 250,29$ ) o koncentraci **1,996 nmol/ml**. Roztok troloxu o dané koncentraci je připraven dopředu a na cvičení ho stačí rozmrazit. **Jedna molekula troloxu vychytává dvě molekuly peroxylového radikálu.**
- ABAP (2,2-azobis(2-amidinopropane hydrochloride);  $M_r = 271,2$ ); 400 mM roztok v PBS:  
Rozpustíme 108,48 mg v 1 ml PBS a do použití uchováváme při  $-4^\circ\text{C}$ . ABAP je nutné připravit vždy čerstvý!
- luminol (3-aminophthalhydrazide;  $M_r = 177,16$ );  $10^{-2}$  M v borátovém pufru. Uchováváme v  $-20^\circ\text{C}$  chráněný před světlem. Před použitím je nutné rozmražený luminol promíchat.

## Měřený vzorek

- sérum nebo plazma obratlovců; hemolymfa hmyzu; jakékoli bezbarvé tekutiny, ve kterých předpokládáme přítomnost antioxidantů (např. zelený čaj)

## Přístroje a pomůcky

Luminometr, šablona s jednorázovými stripy (plastové mikrojamky).

## Postup

1. Do zkumavky, ve které máme navážen ABAP, napipetujeme 1 ml PBS a rozmícháme na vortexu. Rozpuštěný ABAP dáme do lednice a pipetujeme jej do jamek těsně před započítím měření na luminometru.
2. Podle následujícího schématu si připravíme čtyři ředění troloxu pro vytvoření kalibrační křivky: 1,996; 1,497; 0,998 a 0,499 nmol/ml.

Zkumavka	<b>zásobní</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Koncentrace troloxu (nmol/ml)	<b>1,996</b>	<b>1,497</b>	<b>0,998</b>	<b>0,499</b>
dH <sub>2</sub> O (μl)	0	25	100	100
Přidáváme (μl)	0	75 (ze zásobní)	100 (ze zásobní)	100 (ze zk. č. 2)

3. Připravíme si ředění vzorků: 5x, 10x, 100x, 1000x (k dispozici je pro vzorky celkem 19 jamek)
4. Pipetujeme do jamek v šabloně v pořadí:

<b>PBS</b>	<b>Luminol</b>	<b>vzorek/trolox/blank (dest. voda)</b>
160 μl	16,7 μl	20 μl

Schéma uspořádání jamek na destičce:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blank	trolox 0,499	trolox 0,998	trolox 1,497	trolox 1,996	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek
B	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek

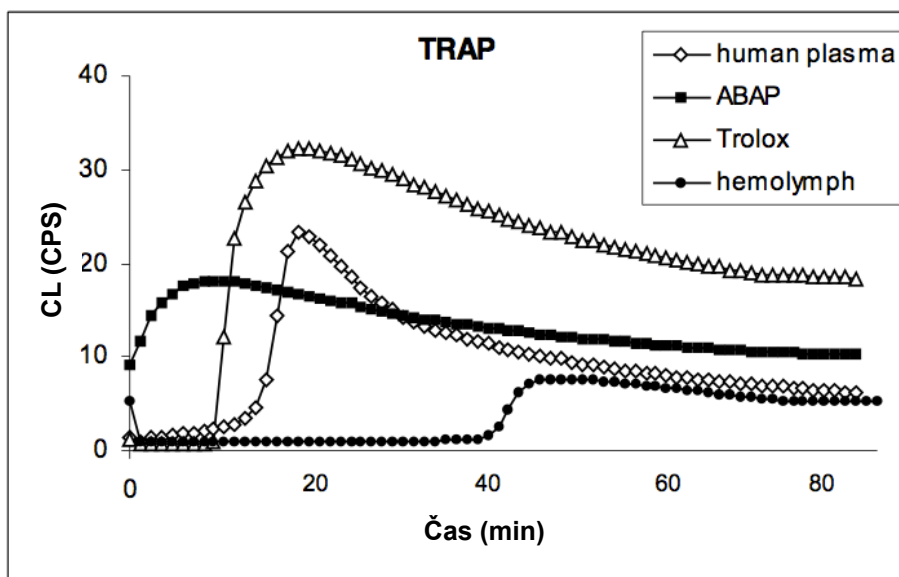
5. Destičku inkubujeme 10 min při teplotě 37 °C. Mezitím připravíme nastavení luminometru.
6. Zapneme a vytemperujeme luminometr na 37 °C (pozor: zahřátí trvá zhruba 20 min). Měření bude probíhat po dobu cca 2 hodin a před každým cyklem musí být destička protřepána. Nastavíme tedy následující parametry měření:

<b>Operation mode</b>	Range kinetics	<b>Shake time</b>	15
<b>Number of repeats</b>	120	<b>Shake amplitude</b>	3
<b>Interval time</b>	54	<b>Shake mode</b>	Ranges

7. Do všech jamek napipetujeme 16,7 μl roztoku ABAP a zapneme měření.

## Hodnocení

Pro každou známou hodnotu chemiluminiscence a její závislost na čase.



1. Vytvořte křivku závislosti CL na čase pro kalibraci troloxu, ABAP a všechna ředění vzorků.
2. Z křivek troloxu a vzorků odečtěte hodnotu maxima CL a čas, kdy tohoto maxima bylo dosaženo (pozor: určuje se pouze, pokud se peak v daném měření objevil; tj. pouze u některých ředění kalibrace a vzorků).
3. Z hodnot časů maxima jednotlivých koncentrací troloxu vytvořte kalibrační křivku (závislost času dosažení maxima CL na koncentraci troloxu).
4. Dosazením hodnot časů maxima CL vzorků do rovnice kalibrační křivky dopočtete množství antioxidantů v měřených vzorcích.

## Výstup

Do protokolu uveďte graf závislosti CL na čase a kalibrační křivku závislosti času dosažení maxima CL na koncentraci troloxu.

Podle kalibrace dopočtete koncentraci antioxidantů v měřených vzorcích a vyjádřete ji v nmol troloxu/ml. Vypočtené hodnoty uveďte do tabulky.