

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Na principu luminofory zesíleného chemiluminiscenčního stanovení reaktivních kyslíkových metabolitů (RKM) je založeno měření oxidativního vzplanutí fagocytů a antioxidační kapacity biologických tekutin.

Další skupinu tvoří metody založené na reakci ATP s luciferinem katalyzované luciferázou.

Mikroorganismy produkující světlo jako součást svého základního metabolismu jsou využívány v toxikologii.

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Aplikace CL metod

- Hematologická a imunologická vyšetření
 - Fagocytóza (oxidativní vzplanutí, chemotaxe, exprese povrchových receptorů, opsonizace)
 - Antioxidační aktivita tělních tekutin
 - Blastická transformace lymfocytů
 - Imunodiagnostika - použití luminiscenčně značených protilátek
- Hygienický monitoring (mikrobiologická kontaminace)
- Toxikologické testy
- Molekulární biologie (reporterové geny)

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Luminometrické metody založené na stanovení RKM

Luminofory jsou oxidovány RKM. Při návratu do základního energetického stavu emitují fotony. Jejich detekce je možná pomocí luminometrů nebo scintilačních spektrofotometrů.

Nejčastěji používané luminofory:

- Luminol
- Lucigenin
- Izoluminol
- Pholasin



Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Luminometrické metody založené na stanovení RKM

Princip metody

luminol + oxidant \longrightarrow α - aminoftalát + N₂ + světlo (425 nm)

Využití metody

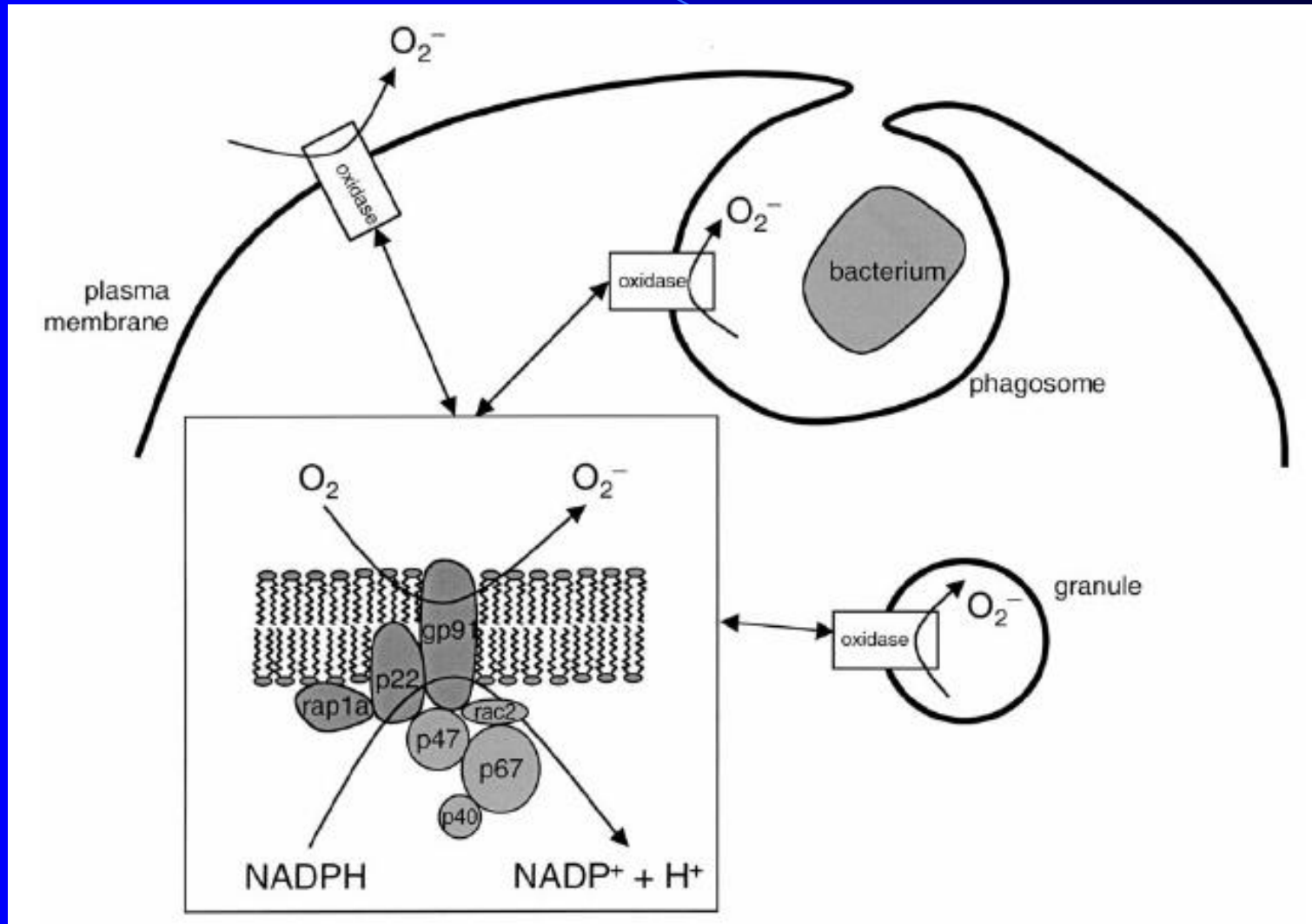
- studium fagocytózy
- měření antioxidačních vlastností (tělních) tekutin

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Studium fagocytózy pomocí chemiluminiscence

Chemiluminiscenční analýza je senzitivní technika, která měří produkci volných kyslíkových radikálů v malých objemech krve (mikrolitry). Použití různých luminoforů umožňuje odlišit jednotlivé radikály, jejich intracelulární a extracelulární tvorbu. Použitím různých aktivátorů a inhibitorů lze sledovat defekty procesu **opsonizace a chemotaxe**, funkčnost NADPH oxidázy a ostatních enzymů spojených s **oxidativním vzplanutím**, expresi a funkčnost různých **buněčných receptorů**.

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně



Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Studium fagocytózy pomocí chemiluminiscence

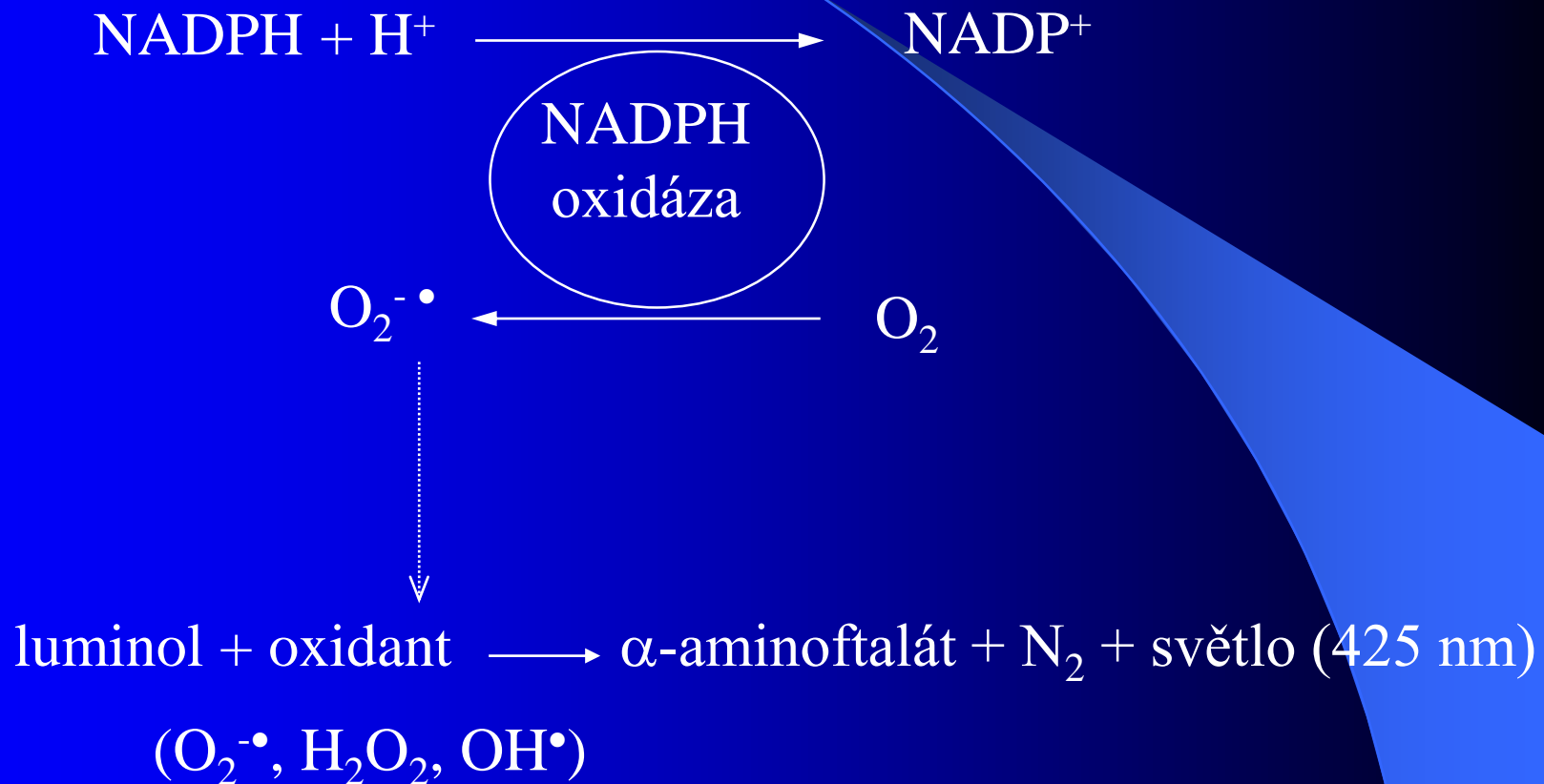
Materiál

- plná krev
- plasma obohacená o leukocyty (tzv. buffy coat)
- izolované PMNL

Indikace

- imunologie (chronická granulomatóza, nedostatečnost komplementu, defekty chemotaxe)
- hematologie a biochemie (neutropenie, aktivita myeloperoxidázy)
- fyziologie (poruchy opsonizace)
- mikrobiologie (vliv bakteriálních peptidů, buněčných stěn, endotoxinu)
- farmakologie a toxikologie (účinek léčiv a toxických látek)

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně



Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Rozlišení mezi RMK a RMD

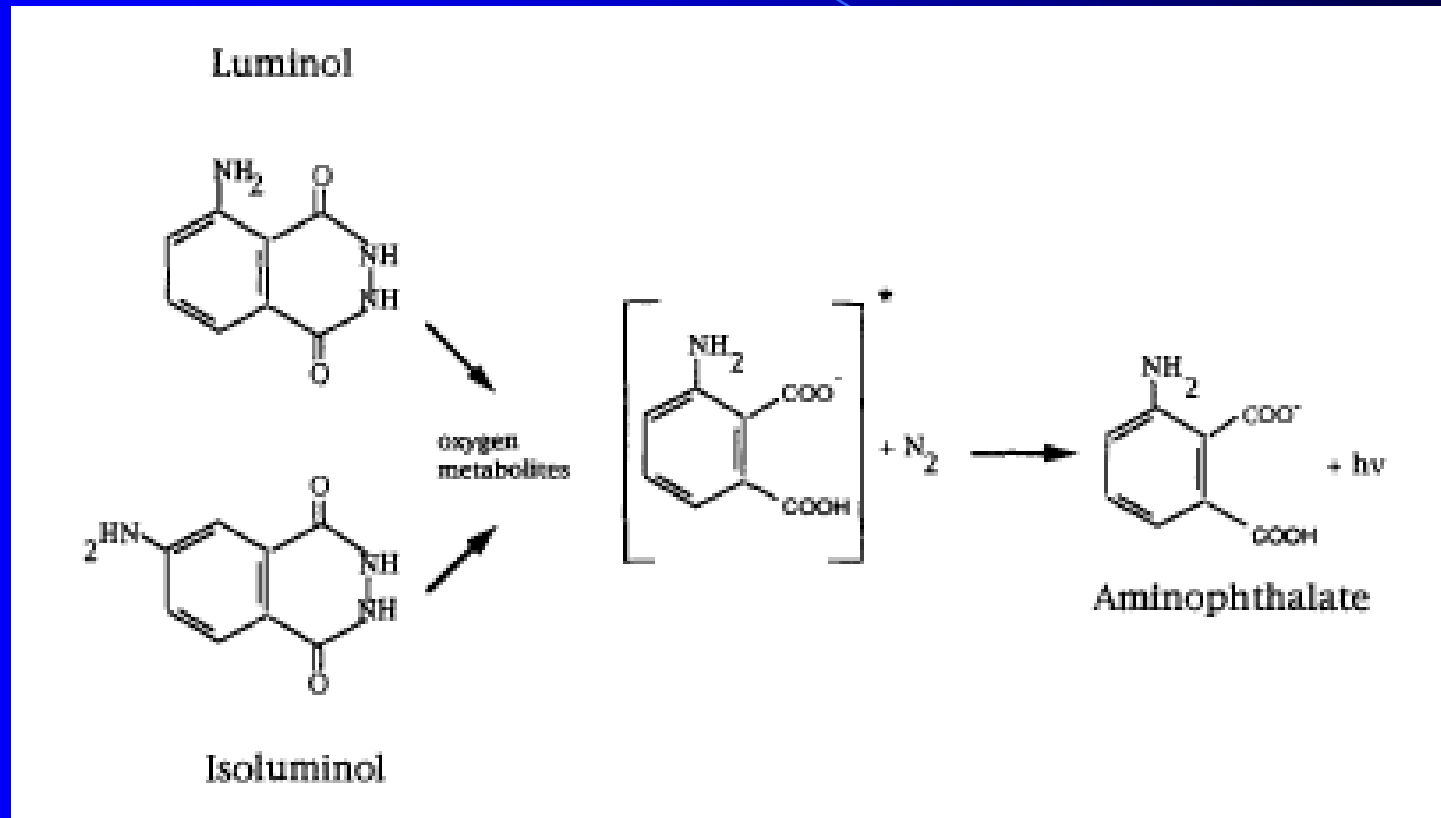
- antioxidanty
- NO donory (sodium nitropruside, SIN-1)
- analogy L-argininu (L-NMMA, L-NAME, L-NNA)

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Intra- a extracelulární tvorba RMKD

- SOD, kataláza, křenová peroxidáza, azid sodný
- luminol vs. isoluminol

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně



Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

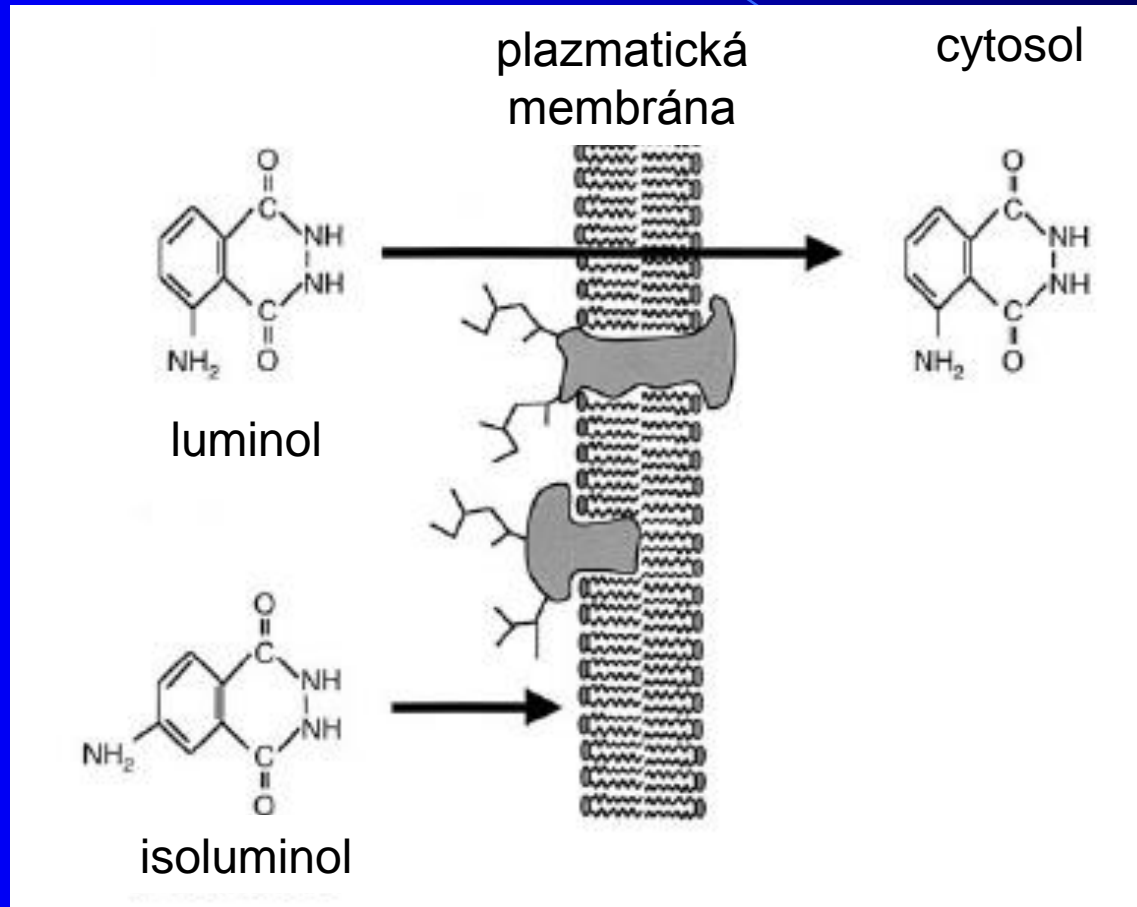
Isoluminol

- aminogroup more distant from the oxygen of phthalazine ring
- aminogroup less protonated (E = -148.40 kcal/mol)
- lower capacity to form intramolecular hydrogen bridges
- polar (DM = 3.38 D)
- hydrophilic nature ($R_M = -0.67$)
- chemiluminescence completely blocked by extracellular scavengers
- chemiluminescence essentially dependent on extracellular peroxidase
- accumulation outside cells
- **identifies extracellular oxidants**

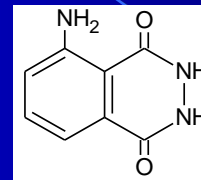
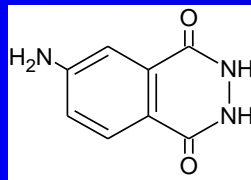
Luminol

- aminogroup closer to the oxygen of phthalazine ring
- aminogroup more protonated (E = -154.30 kcal/mol)
- higher capacity to form intramolecular hydrogen bridges
- less polar (DM = 2.86 D)
- lipo/hydrophilic nature, exists in several forms of dissociation ($R_M = 0.09$)
- chemiluminescence partially resistant to extracellular scavengers
- chemiluminescence partially dependent on extracellular peroxidase
- crossing of biological membranes
- **in the presence of extracellular scavengers SOD/CAT, identifies intracellular oxidants**

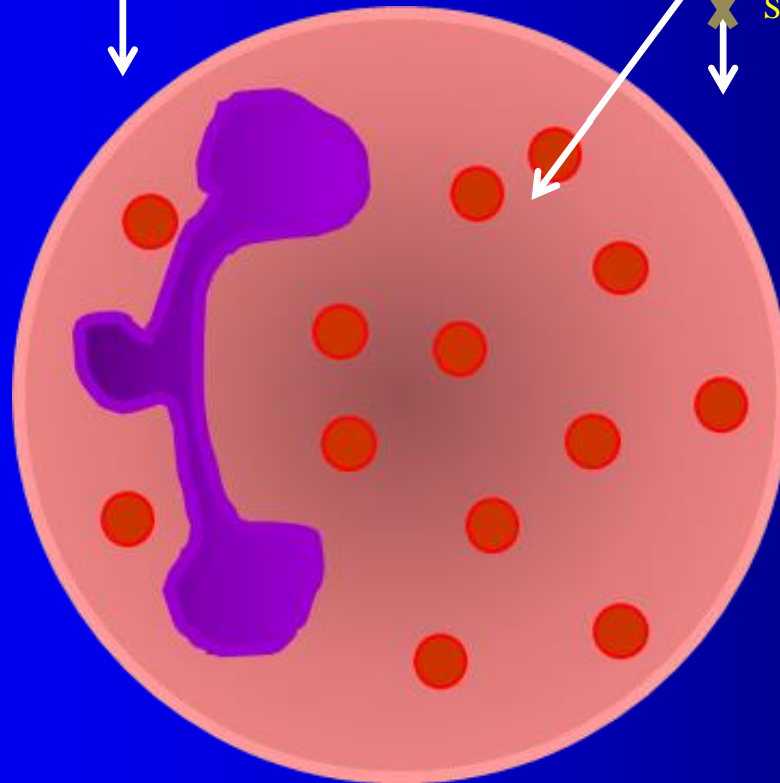
Luminometrické aplikace v biologii a medicíně



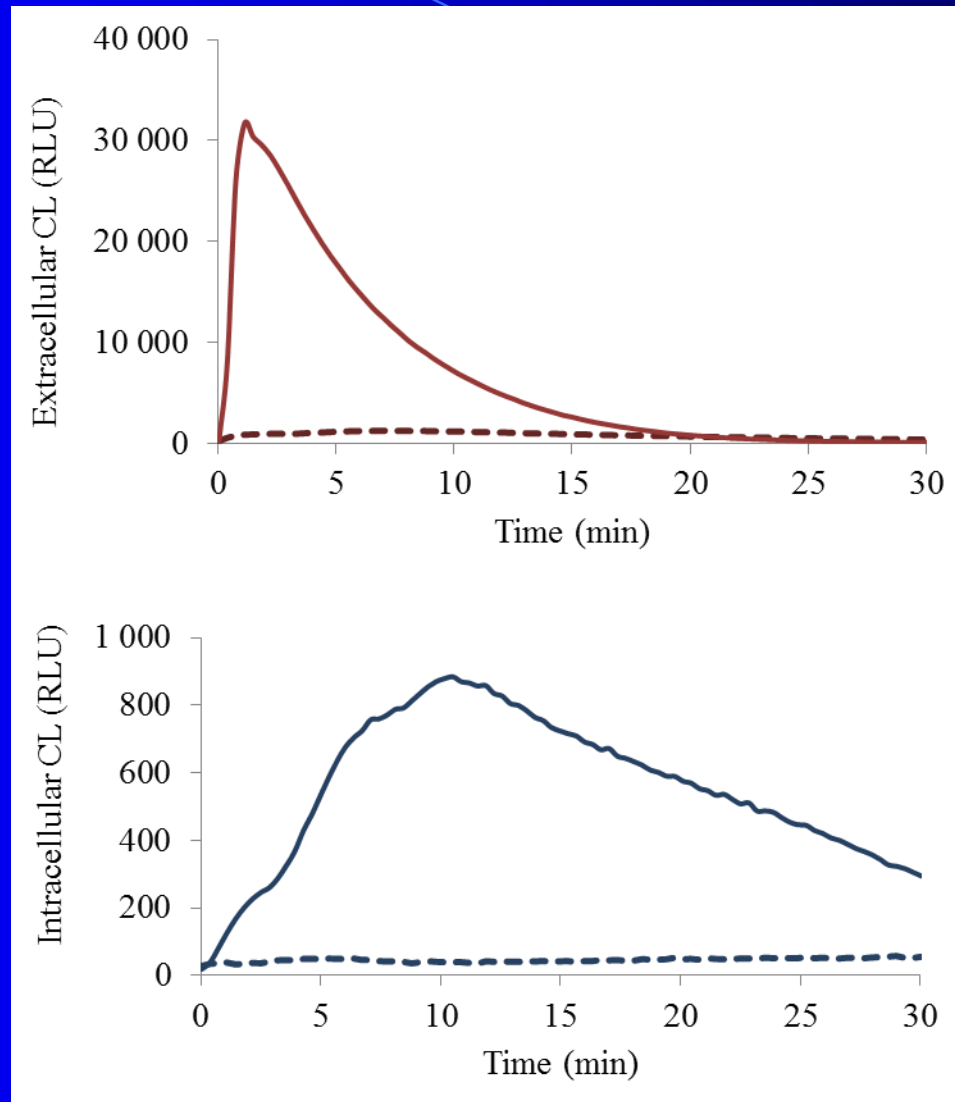
Luminometrické aplikace v biologii a medicíně



SOD/CAT



Luminometrické aplikace v biologii a medicíně



Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Systemy generující RMKD

- xanthin/xanthin oxidáza $O_2^{\cdot-}$
- peroxid vodíku + ionty přech.kovů $\cdot OH$
- peroxid vodíku H_2O_2
- ABAP $ROO\cdot$
- SIN-1 $ONOO^-$
- buněčné systémy (fagocyty)

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Měření antioxidační kapacity biologických tekutin

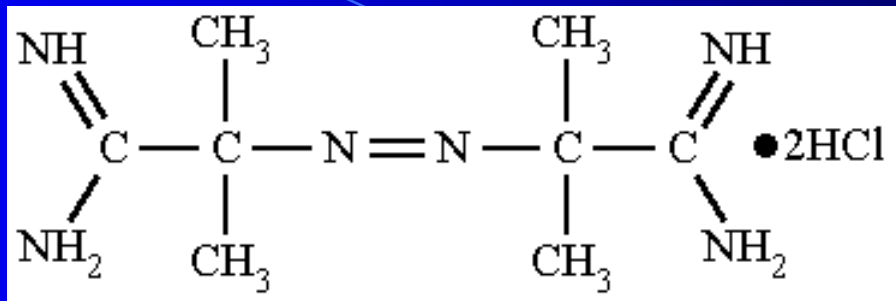
Reaktivní kyslíkové metabolity jsou tvořeny při tepelném rozkladu vybraných sloučenin. Po přidání vzorku obsahujícího antioxidanty CL signál vymizí, přičemž doba vymizení CL signálu je přímo úměrná antioxidační aktivitě vzorku.

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

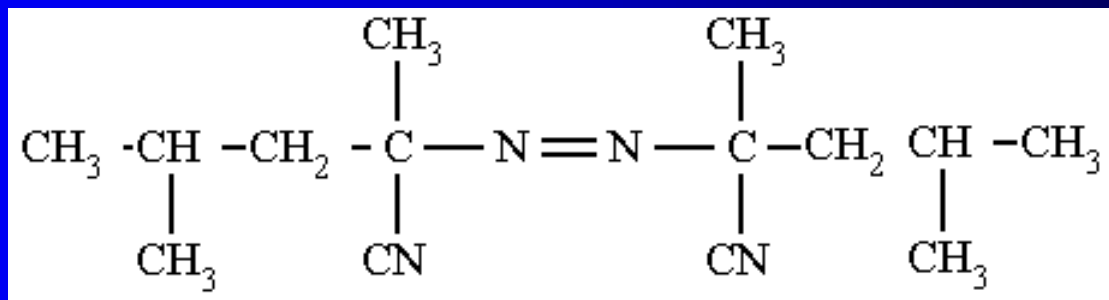
Metoda TRAP

- Total (peroxyl) Radical-trapping Antioxidative Parameter
- stanovení celkové antioxidační kapacity ve vodě rozpustných antioxidantů
- referenční vzorek: trolox

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně



- 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride
- 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride



- 2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile)

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Měření antioxidační kapacity biologických tekutin

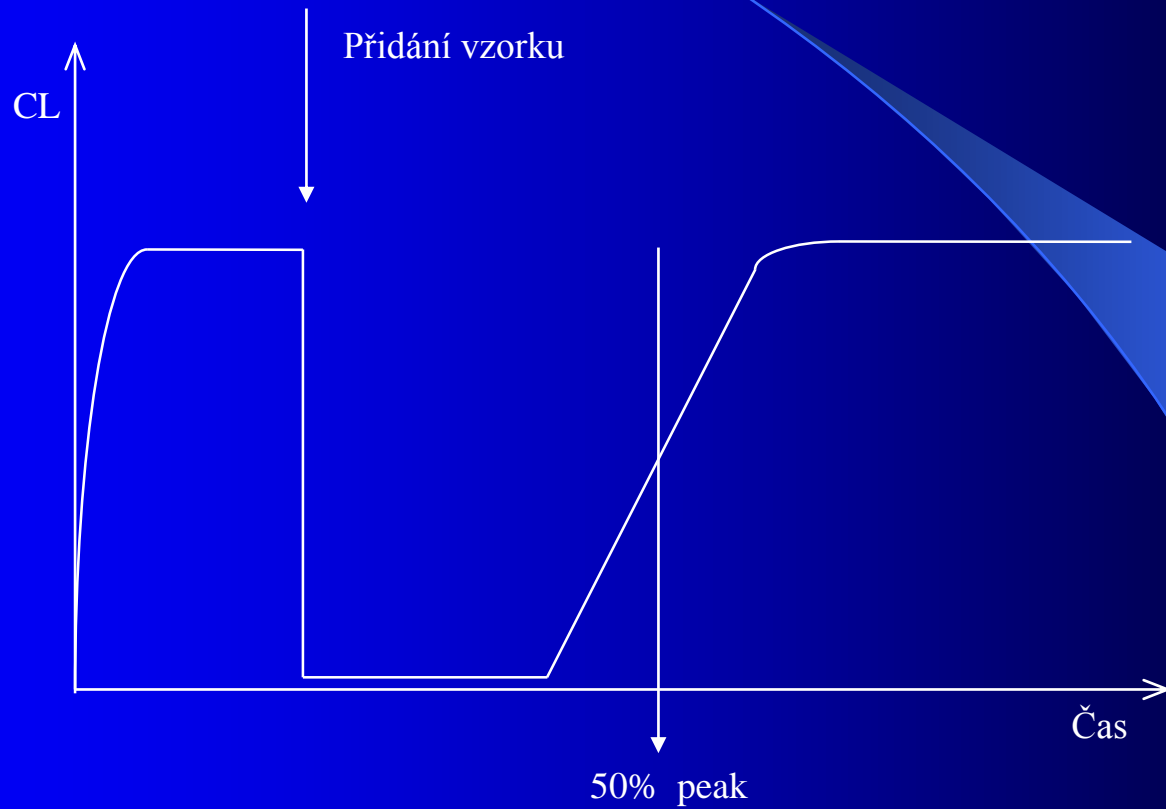
Materiál

- plasma
- sérum
- sliny
- semenná tekutina

Indikace

- riziko oxidativního poškození tkání
- riziko odvržení štěpu po transplantaci

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

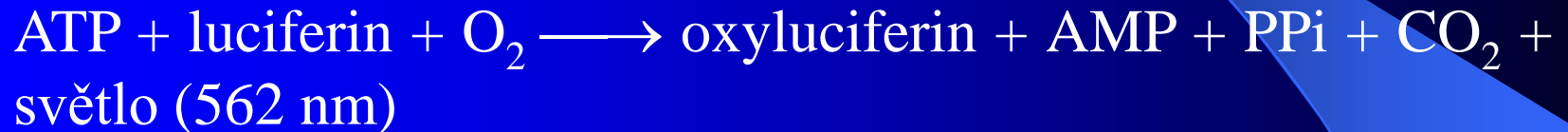


Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Luminometrické metody založené na měření ATP

Princip metody:

luciferáza



Touto metodou se stanovuje buď přímo množství ATP ve zkoumaném vzorku nebo aktivita enzymů nebo substrátů, které jsou spřaženy s tvorbou nebo spotřebou ATP (např. stanovení β -podjednotky kreatin kinázy používané v diagnostice akutního infarktu myokardu)

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Luminometrické metody založené na měření ATP

Využití metody:

- stanovení buněčné proliferace a cytotoxicity (např. sledování sensitivity bakterií k antibiotikům, sledování cytotoxicity protinádorových léčiv apod.)
- monitorování hygieny pracovního prostředí (např. potravinářství)
- měření biomasy mikroorganismů ve vodných roztocích a fermentorech
- měření ATP v bakteriálních, rostlinných a živočišných buňkách
- reporter gene assay (např. luciferáza)

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Monitorování hygieny pracovního prostředí a účinnosti čistících postupů pomocí bioluminiscence ATP

Výhody oproti konvenčním mikrobiologickým postupům: rychlost a jednoduchost, vysoká sensitivita a přesnost, stanovení celkové biologické kontaminace (ta může pocházet z reziduí výrobků, z kontaktu s lidskou pokožkou nebo z mikroorganismů).

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Monitorování hygieny pracovního prostředí a účinnosti čistících postupů pomocí bioluminiscence ATP

Materiál

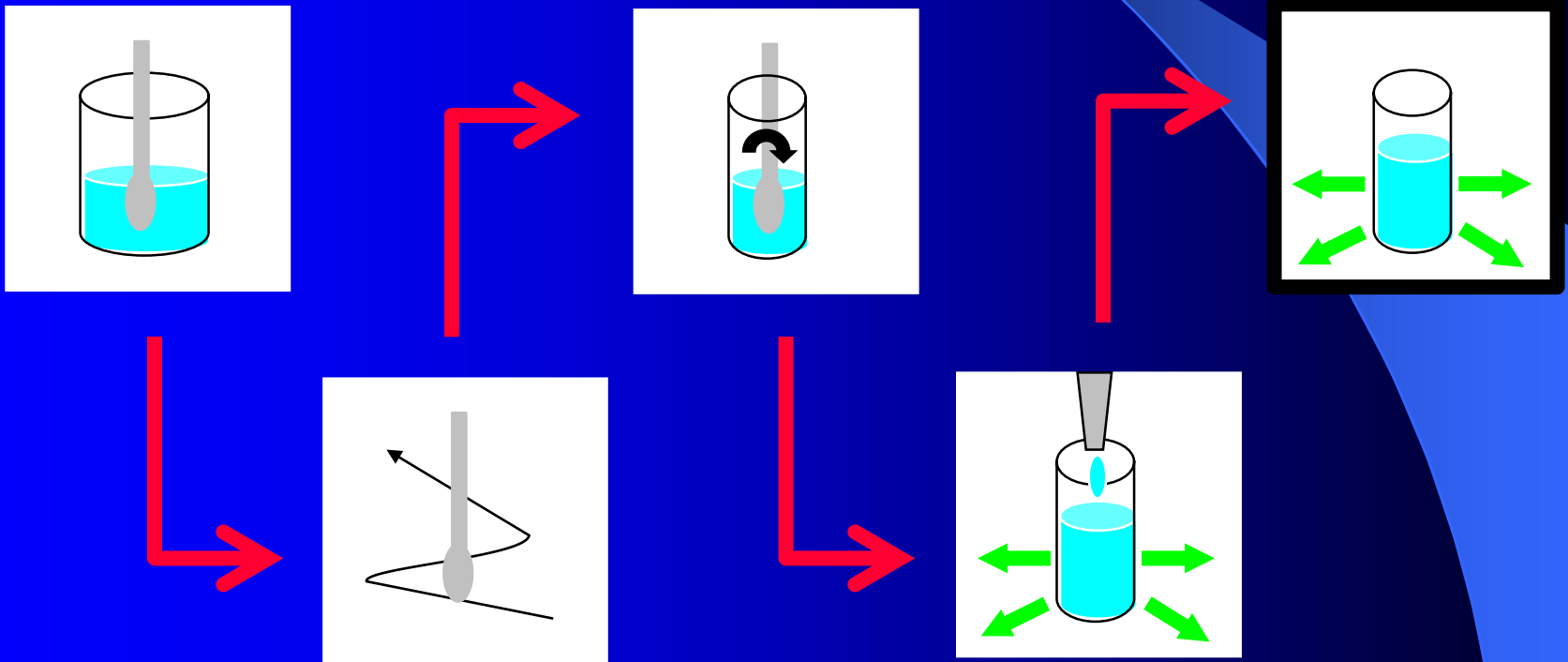
- stěr ze zkoumané plochy

Indikace

- mikrobiální znečištění pracovního prostředí

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Monitorování hygieny pracovního prostředí a účinnosti čistících postupů pomocí bioluminiscence ATP



Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Měření biomasy mikroorganismů ve vodných roztocích

Pomocí CL metody za využití luciferázy se stanovuje ATP, které je obsažené ve všech živých buňkách.

Materiál

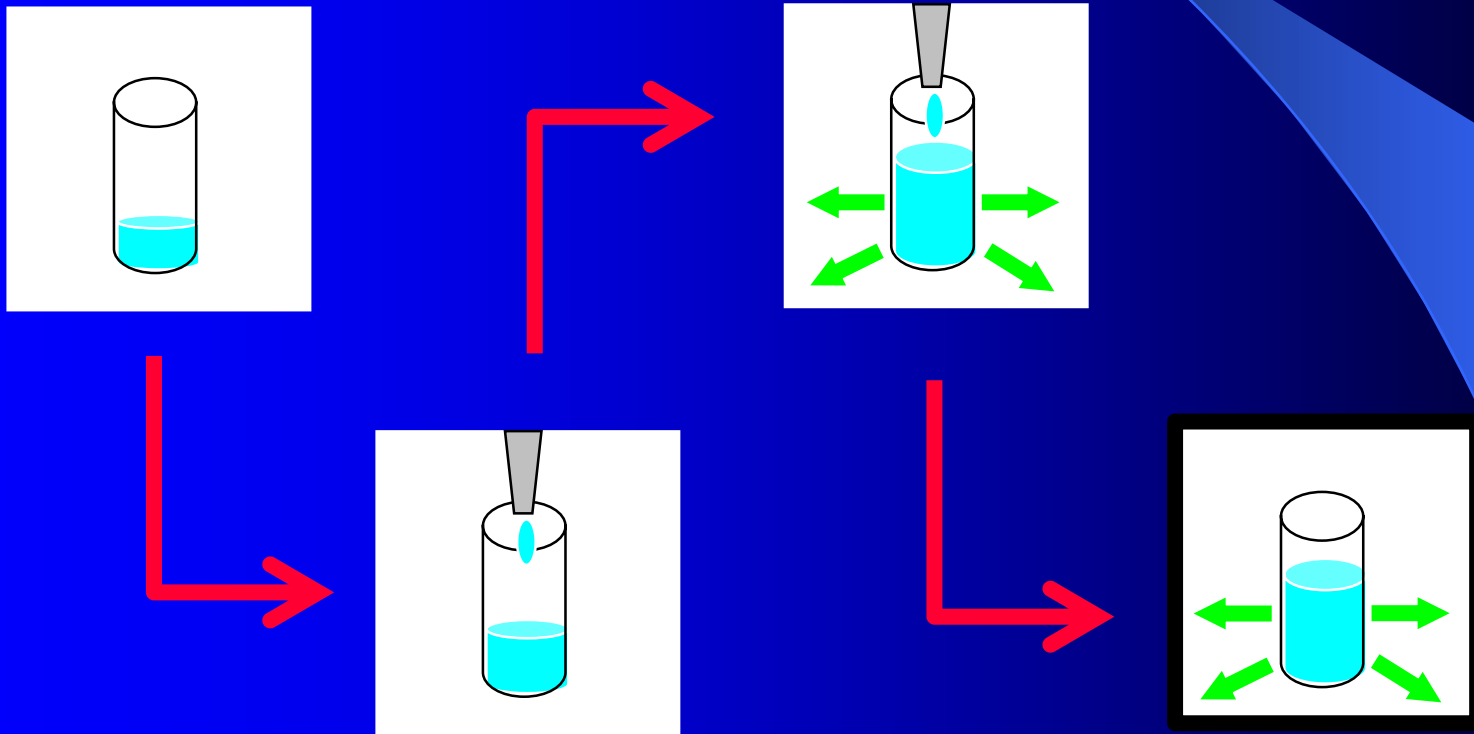
- vodné roztoky

Indikace

- mikrobiální znečištění pitných a užitkových vod
- mikrobiální znečištění potravinářských výrobků

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Měření biomasy mikroorganismů ve vodných roztocích



Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Stanovení blastické transformace lymfocytů a buněčné proliferace

Stanovení na základě měření obsahu ATP ve vzorku. Rychlá a sensitivní alternativa k metodám využívajícím radiaktivně značené prekursorů tvorby DNA (např. ^3H -tymidin).

Materiál

extrakty lymfocytárních kultur

Indikace

poruchy specifické buněčné imunity

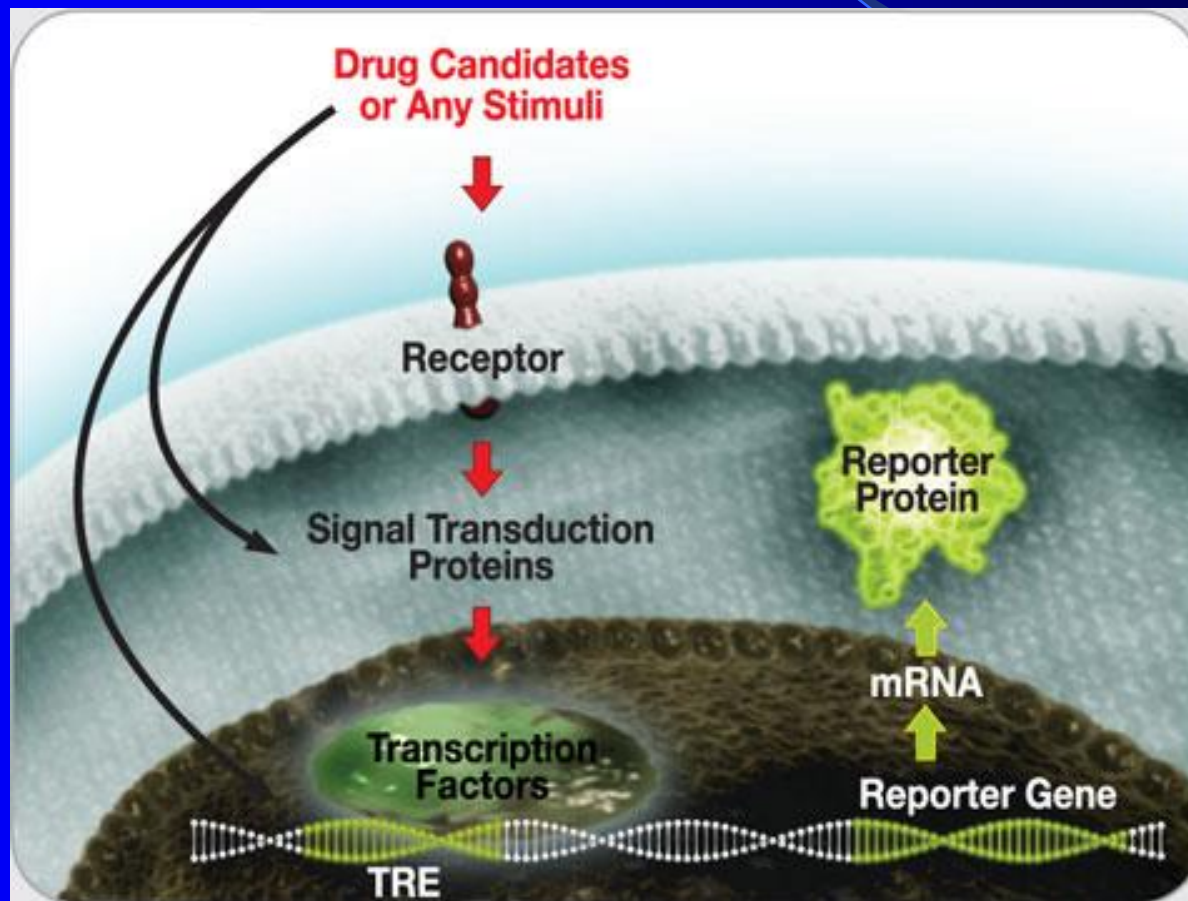
Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Reporter gene assay

Tato metoda představuje vysoce účinný nástroj v molekulární biologii. Její princip spočívá ve využití kódující sekvence luciferázy jako reporterového genu pro monitorování aktivity promotorů v kontrole genové exprese. Konstrukt DNA obsahující kódovací oblast pro luciferázu kombinovanou se sekvencí s testovanou schopností genové regulace se vnese do studovaných buněk. Po inkubaci se měří výsledek exprese daného reporterového genu jako ukazatel účinnosti testovaného promotoru.

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Reporter gene assay



Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Reporter gene assay

Materiál

- buněčné extrakty

Indikace

- účinnost promotorů v genové regulaci

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Luminiscenční metody založené na přirozené bioluminiscenci organismů

Stanovení toxicity

Materiál

sladké vody (povrchové i podzemní)

slané a brakické vody

vodovodní vody

odpadní vody

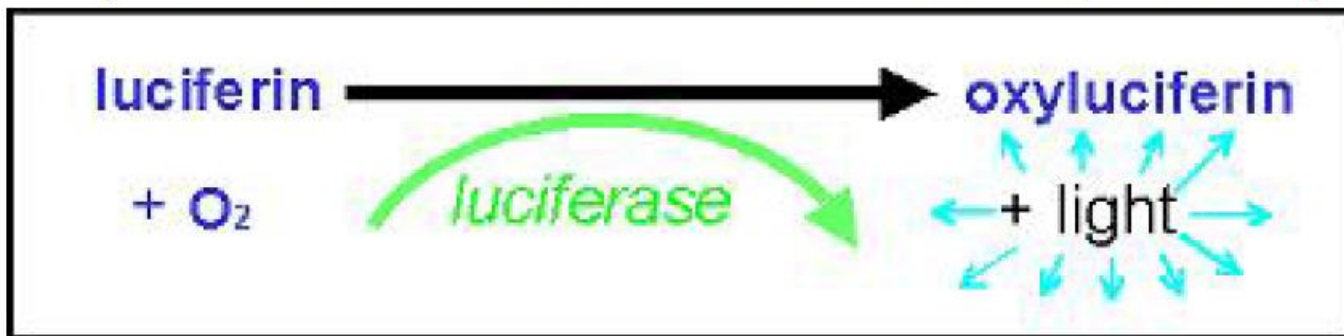
vodné roztoky a výluhy

Indikace

monitorování environmentálních toxinů

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

1. Probíhají pouze v přítomnosti kyslíku
2. Vždy jsou zapotřebí dva typy látek:
luciferin
luciferáza
(lucifer znamená přinášející světlo).
Struktura a vlastnosti luciferázy a luciferinů se liší u jednotlivých skupin lumineskujících organismů
3. Luciferin je základním substrátem reakce a produkuje světlo



Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

- > Gram(-)
- > Emisní vlnová délka: 490 nm
- > Nesou *lux* operon který kontroluje emisi světla

Bioluminescence bakterií je vyvolána reakcí molekulového kyslíku s redukovaným flavin mononukleotidem (FMNH₂) a aldehydem za vzniku FMN, vody a mastných kyselin.

Luminiscence je energeticky náročná (vysoká spotřeba ATP luciferázou), spotřebovává až 20% celkové buněčné energie (Nealson & Hastings 1979, Bassler & Silverman 1995). vlnová délka emitovaného modrozeleného světla je 490 nm.

Produkce luminiscence je těsně spjata s buněčným metabolismem a je tedy odrazem viability bakterií.

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Známe 11 druhů 4 rodů

Vibrio, Photobacterium, Shewanella (Alteromonas) a Xenorhabdus (Photorhabdus)

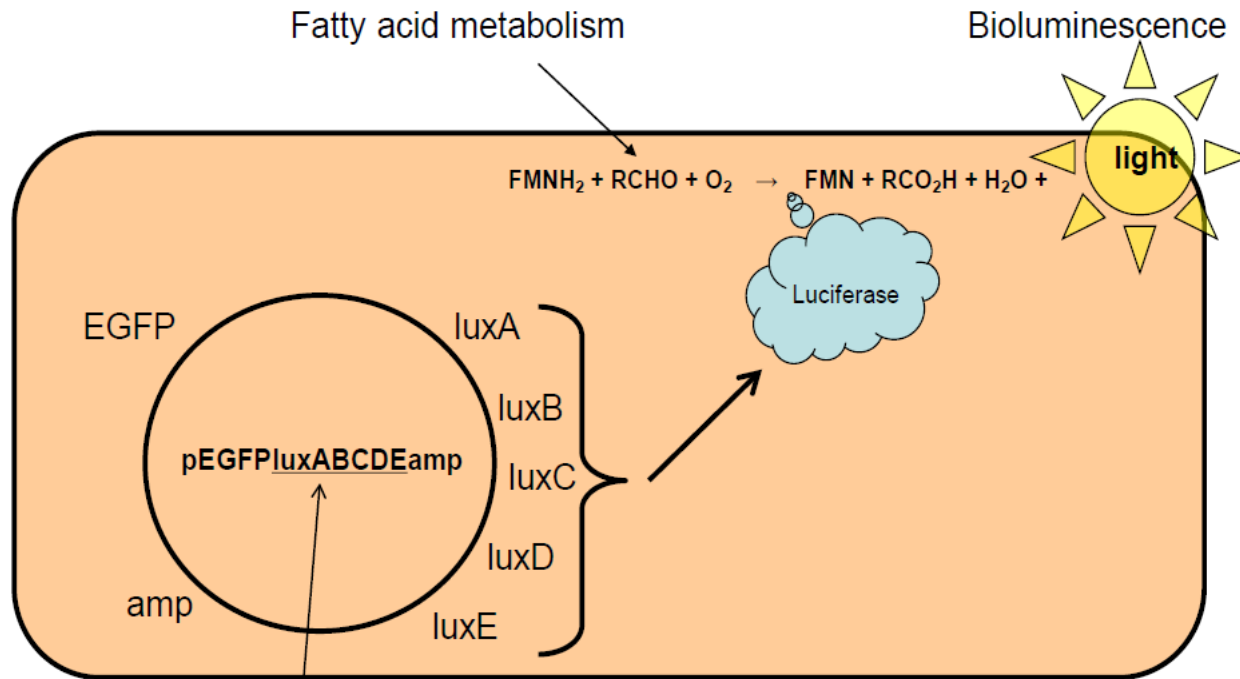
Produkují viditelnou BL

Jedná se především o bakterie v mořské vodě, některé jsou i terestrické (rod Photorhabdus)

Mohou se objevovat samostatně volně existující, jako saprofyté, komenzálové, parazité živočichů a symbionti ve světelných orgánech

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Escherichia coli K 12 (pEGFP_{lux}ABCDEamp) *E. coli-lux*



Photobacterium luminescens

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Imunodiagnostika

Využití chemiluminiscenčních značek (např. acridinium ester), schopných spontánně se vázat na bílkoviny, k přípravě CL značených protilátek.