

Metody výzkumu
patofyziologie volných
radikálů

Milan Číž

Metody detekce

- Chemiluminiscence
- Spektrofotometrie
 - NBT-test
 - redukce cytochromu C
- Elektronová spinová resonance
- Elektrochemie
 - stanovení spotřeby kyslíku
 - detekce NO
- Fluorimetrie (průtoková cytometrie)

Metody stanovení:

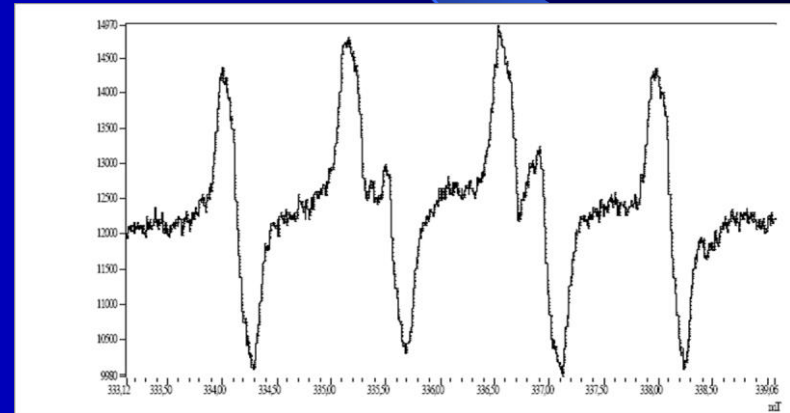
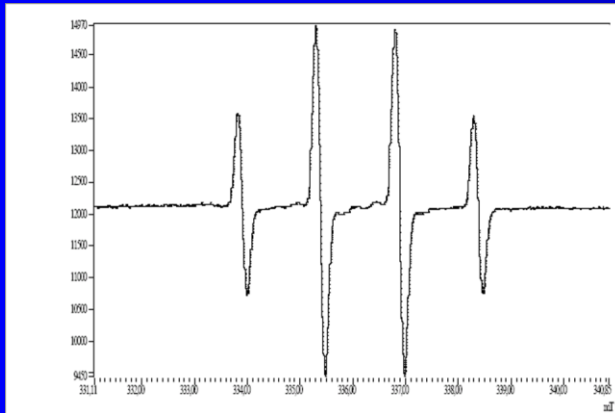
- **volných radikálů**
- aktivity zdrojů volných radikálů
- antioxidační aktivity biologických vzorků
- jednotlivých antioxidantů
- poškození biologických makromolekul

Spektrofotometrie

- **superoxidový aniont:**
cytochrom C assay
Princip metody je založen na redukci oxidovaného (Fe^{3+}) cyt C superoxidovým aniontem na Fe^{2+} cyt C
550 nm
- **NBT test:**
NBT je silný redoxní indikátor, který po redukci RKM tvoří nerozpustný diformazan, 605 nm
nespecifický
- **oxid dusnatý:**
Griessova reakce (nitrity, nitráty), detekční limit 100 nM, 548 nm.

Elektronová spinová resonance

- ESR (EPR) je spektroskopická metoda, která se zabývá mikrovlnnými přechody mezi energetickými stavy nepárových elektronů se spinem a orbitálním momentem hybnosti.



Elektrochemie

- **oxid dusnatý:**
selektivní elektroda pro NO
- **ostatní RKM**
- **stanovení spotřeby kyslíku**

Průtoková cytometrie

- **povrchové antigeny:**
MAb značené různými fluorescenčními značkami
- **tvorba RMK neutrofily a makrofágy:**
Dichlorodihydrofluorescein diacetate – peroxid vodíku, peroxynitrit
Dihydrorhodamine 123 - peroxid vodíku, peroxynitrit
Dihydroethidium bromide – superoxidový anion.
- **oxid dusnatý:**
1,2-diaminoanthroquinone
- **buněčný cyklus, buněčná viabilita:**
propidium iodide

Dichlorodihydrofluorescein diacetát

Detekce H_2O_2 ale i dalších intracelulárních oxidantů včetně oxidů dusíku

Výhody

- shodná vlnová délka s fluoresceinem
- používána nejdelší dobu (od roku 1983)

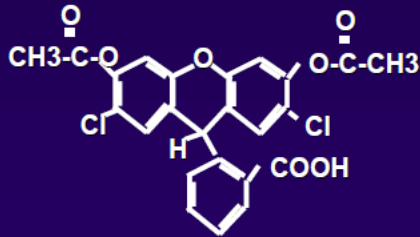
Nevýhody

- unikání z buněk \Rightarrow nelze fixovat
- vysoká citlivost vůči světlu
- toxicita
- nezbytná aktivita esteráz

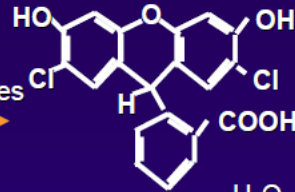
Dichlorodihydrofluorescein diacetát



2',7'-dichlorofluorescein diacetate



2',7'-dichlorofluorescein



Cellular Esterases
Hydrolysis

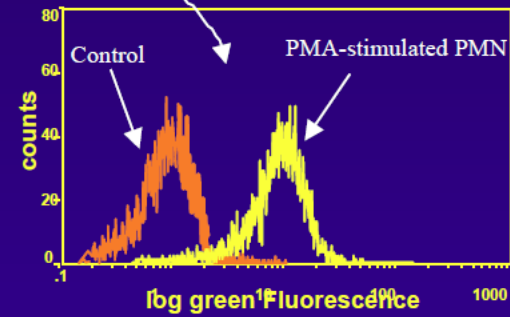
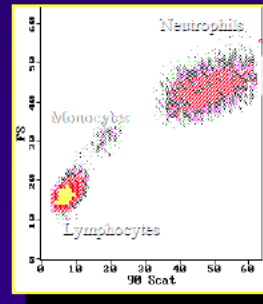
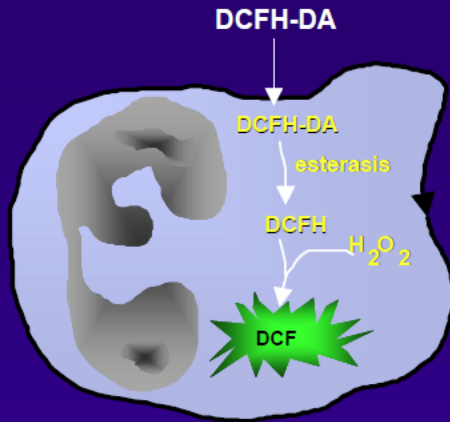
H₂O₂
Oxidation

2',7'-dichlorofluorescein



Fluorescent
Exc. 488
Em. 520

Example: Neutrophil Oxidative Burst



J.P. Robinson et al. 1998
<http://www.cyto.purdue.edu/>

Dihydrorhodamin

Detekce H_2O_2 ale i dalších intracelulárních oxidantů
včetně oxidů dusíku

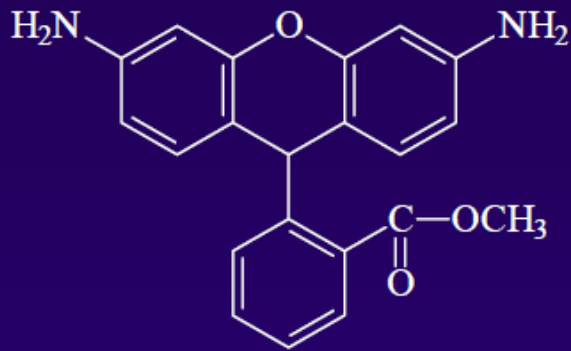
Výhody

- až 10x vyšší citlivost oproti DCFH-DA
- stabilita - možnost fixace

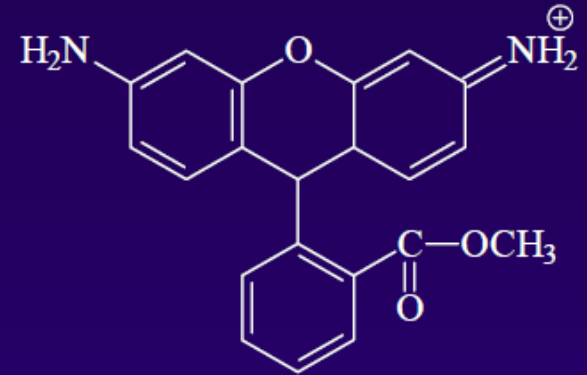
Nevýhody

- nespecifická detekce oxidantů
- závislost na mitochondriálním membránovém potenciálu?

Dihydrorhodamin



Dihydrhodamine 123



Rhodamine 123

Dihydroethidium bromid

Detekce O_2^-

Výhody

- dobrá specifická pro O_2^-
- stabilita - možnost fixace

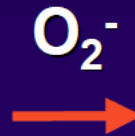
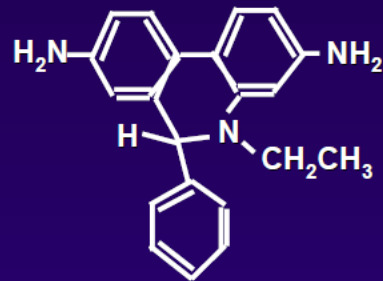
Nevýhody

- HE katalyzuje dismutaci O_2^-
- toxický
- nelze použít současně s PI

Dihydroethidium bromid

Hydroethidine

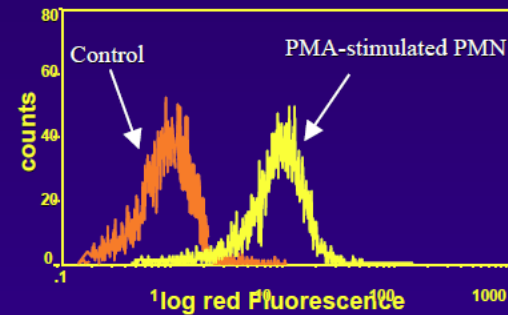
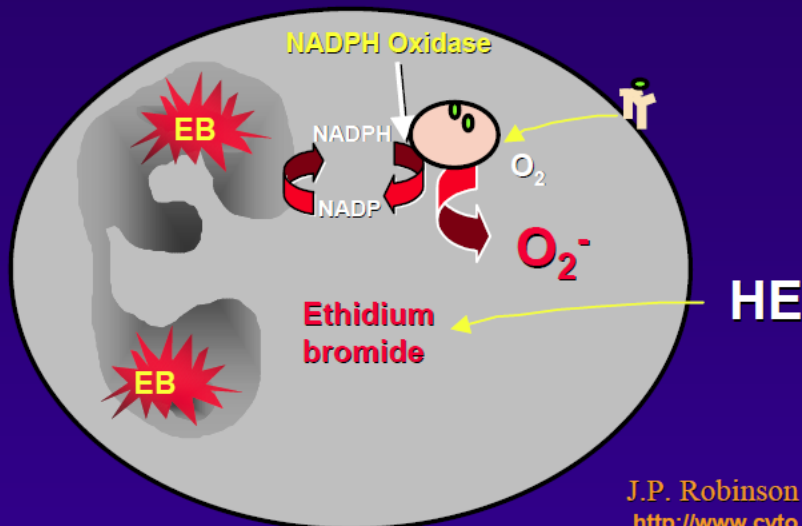
HE



EB



Fluorescent
Exc. 488
Em. 600



J.P. Robinson et al. 1998
<http://www.cyto.purdue.edu/>

Metody stanovení:

- volných radikálů
- **aktivity zdrojů volných radikálů**
- antioxidační aktivity biologických vzorků
- jednotlivých antioxidantů
- poškození biologických makromolekul

Luminometrické metody

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

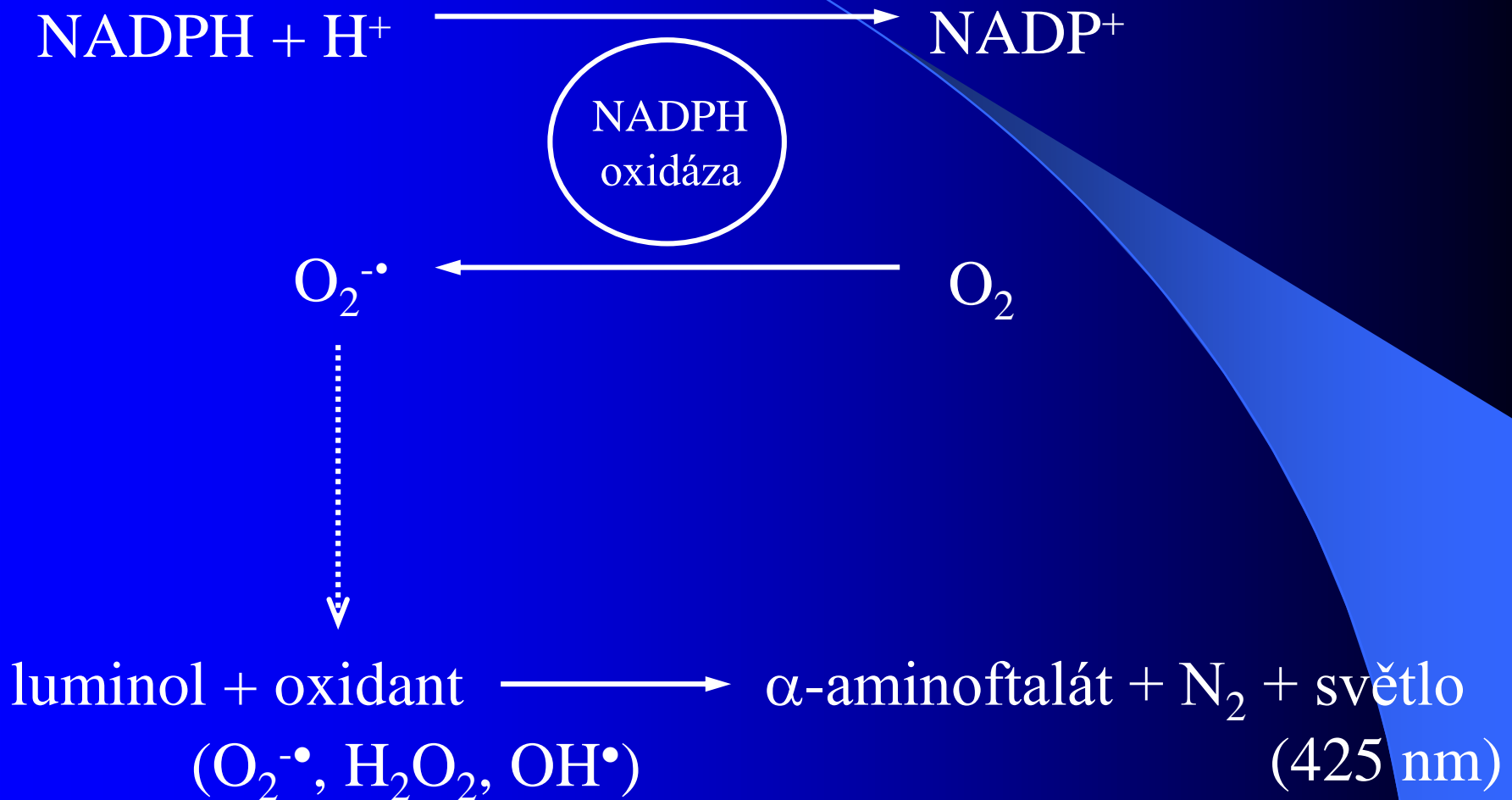
Nejčastěji používané luminofoxy:

- Luminol
- Lucigenin
- Izoluminol
- Pholasin

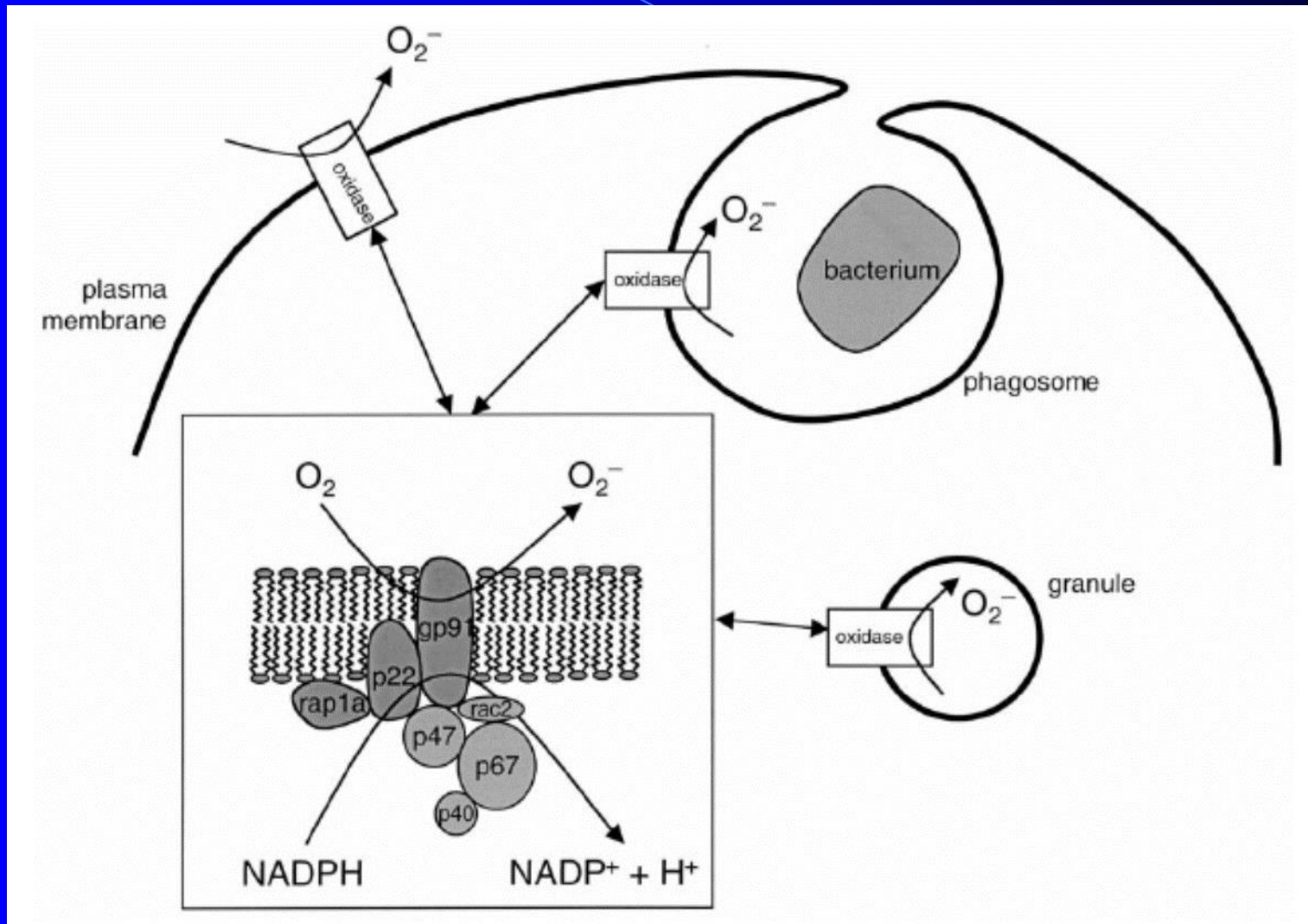
Luminometrické metody

- **aktivita MPO:**
bromid-dependentní chemiluminiscence v přítomnosti vzorku a peroxidu vodíku
- **buněčná proliferace a cytotoxicita:**
luciferin-luciferáza

Oxidativní vzplanutí fagocytů



Oxidativní vzplanutí fagocytů



Oxidativní vzplanutí fagocytů

Aktivátory fagocytů

osponizované částice (OZP)
fMLP
PMA
vápníkový ionofor A23187

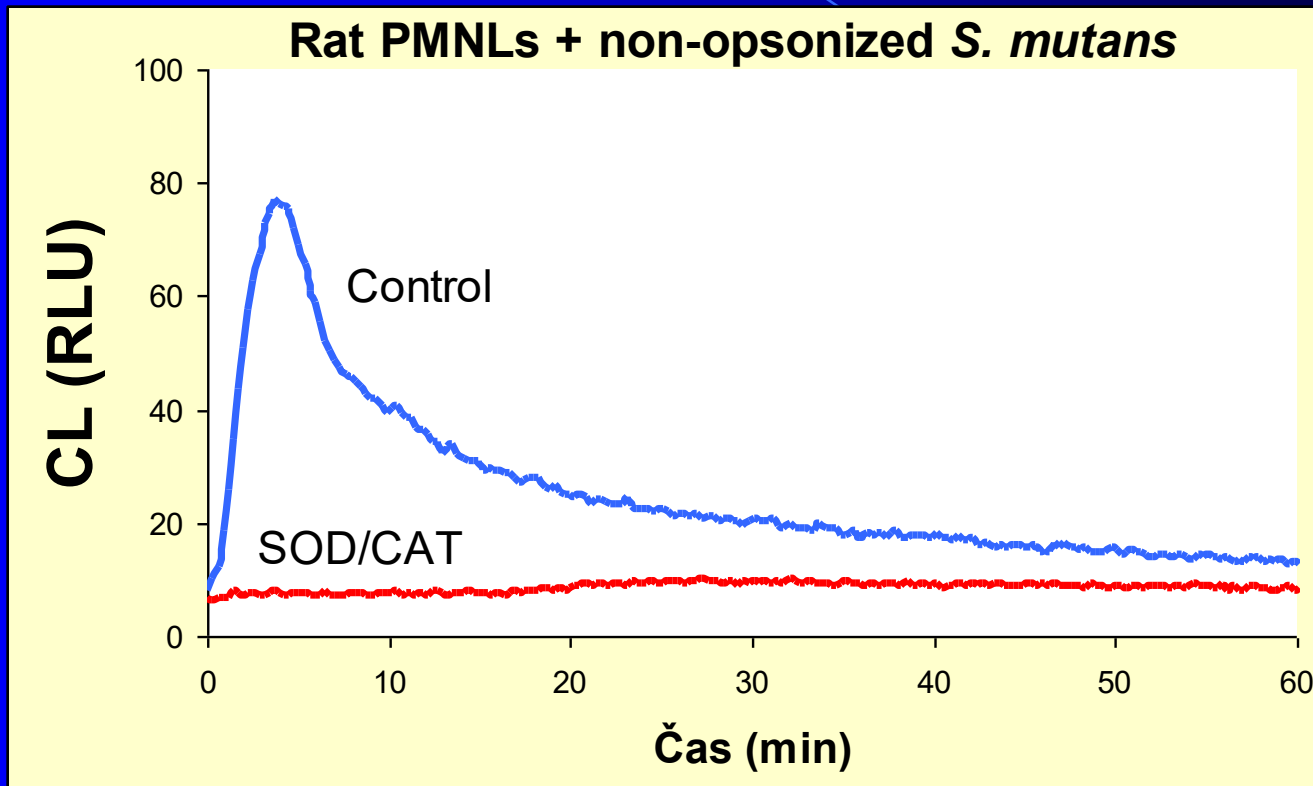
Místo působení

povrchové receptory
povrchové receptory
proteinkináza C
 $\text{Ca}^{2+} \longrightarrow \text{PKC}$

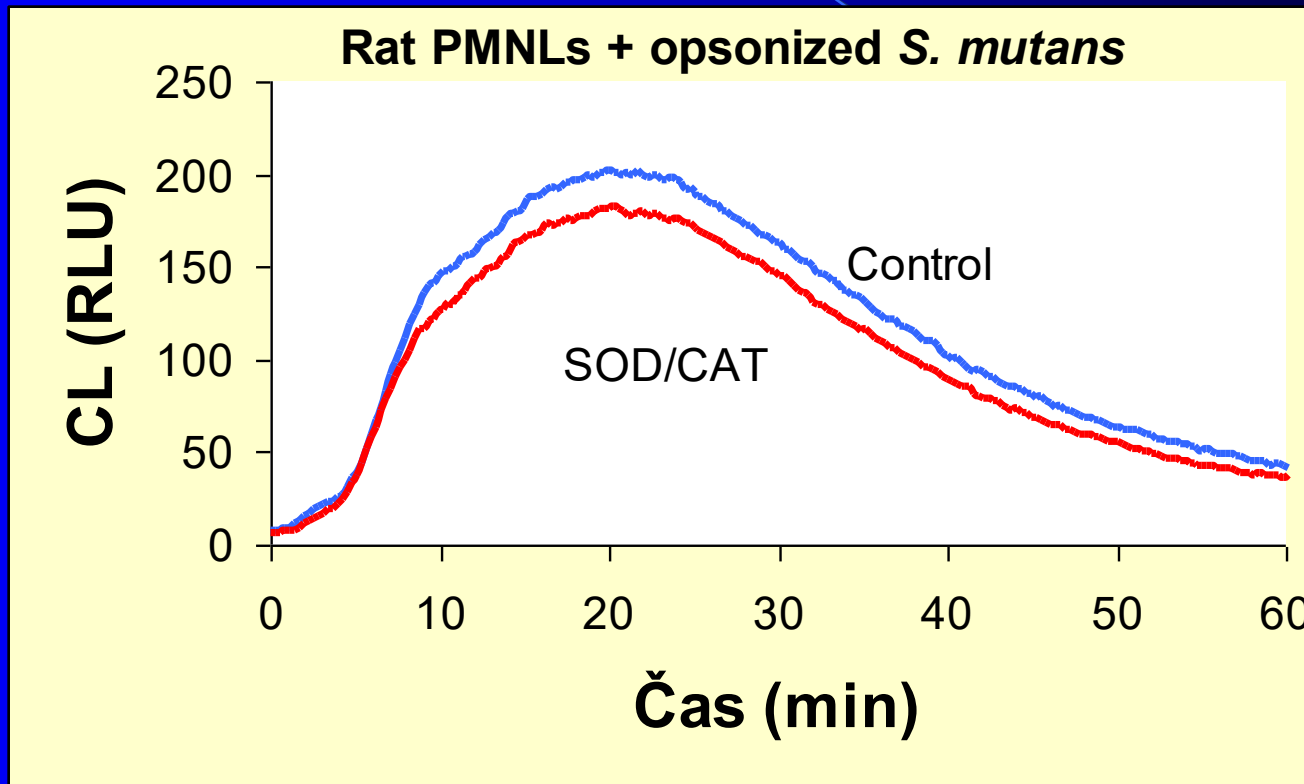
Intra- a extracelulární tvorba RMKD

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

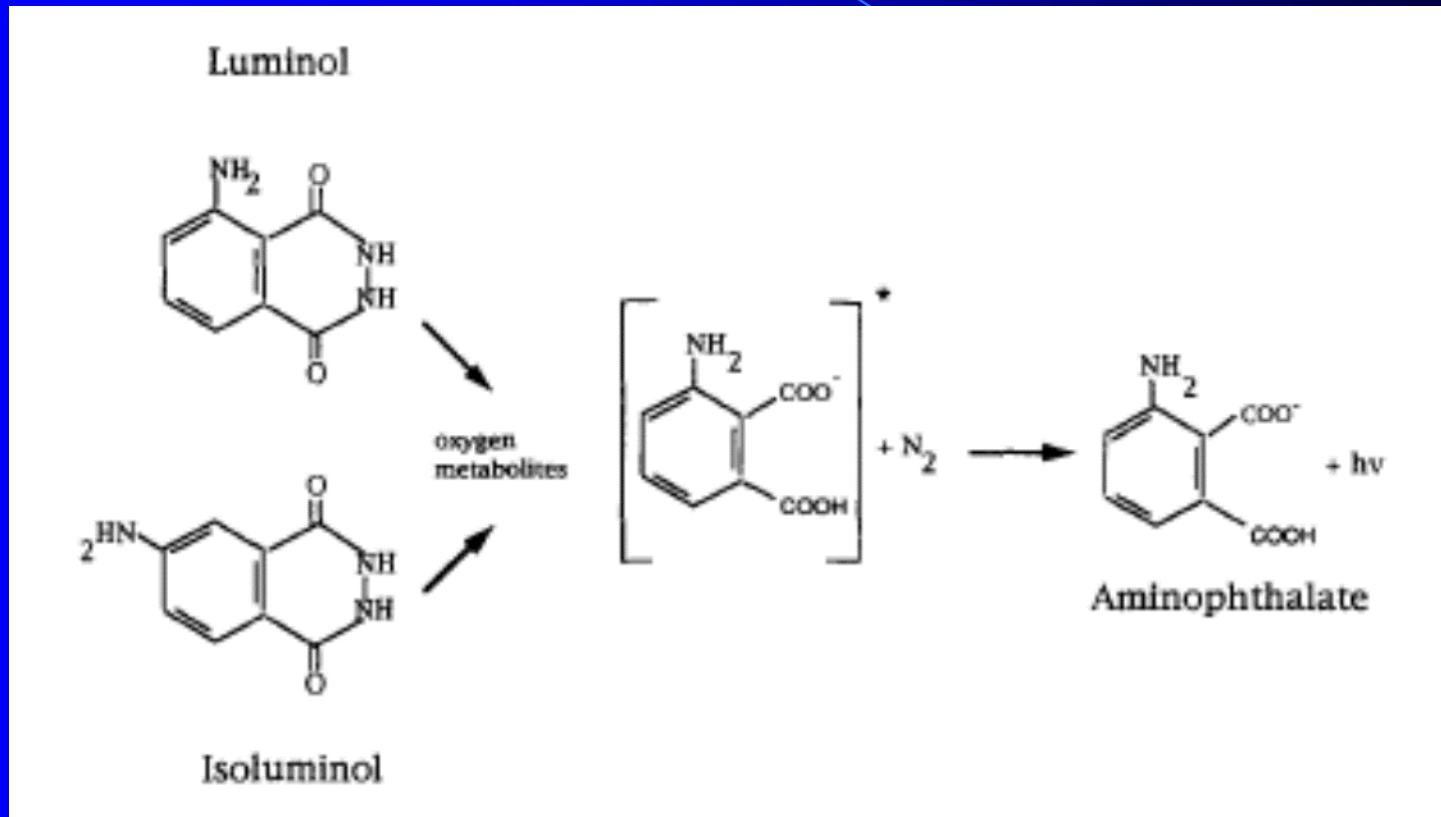
Intra- a extracelulární tvorba RMKD



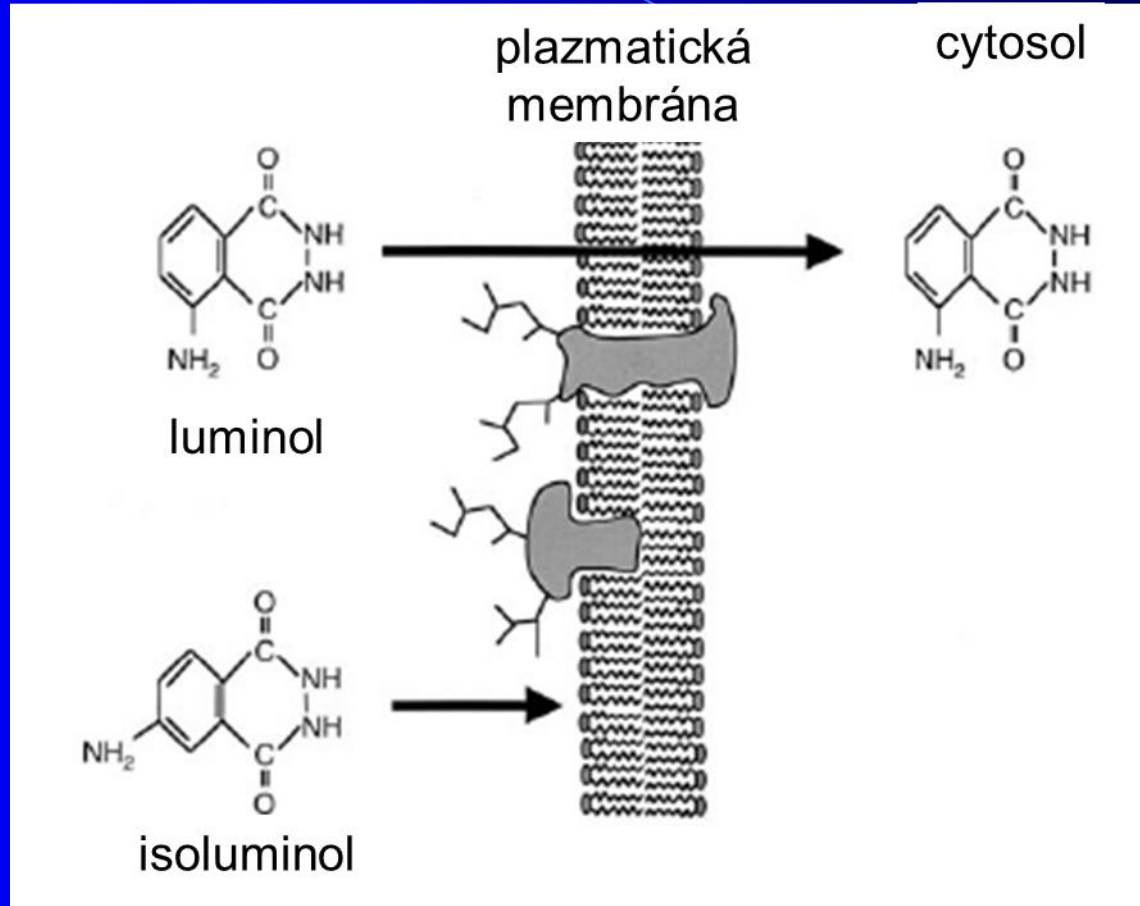
Intra- a extracelulární tvorba RMKD



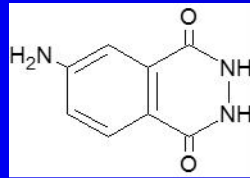
Intra- a extracelulární tvorba RMKD



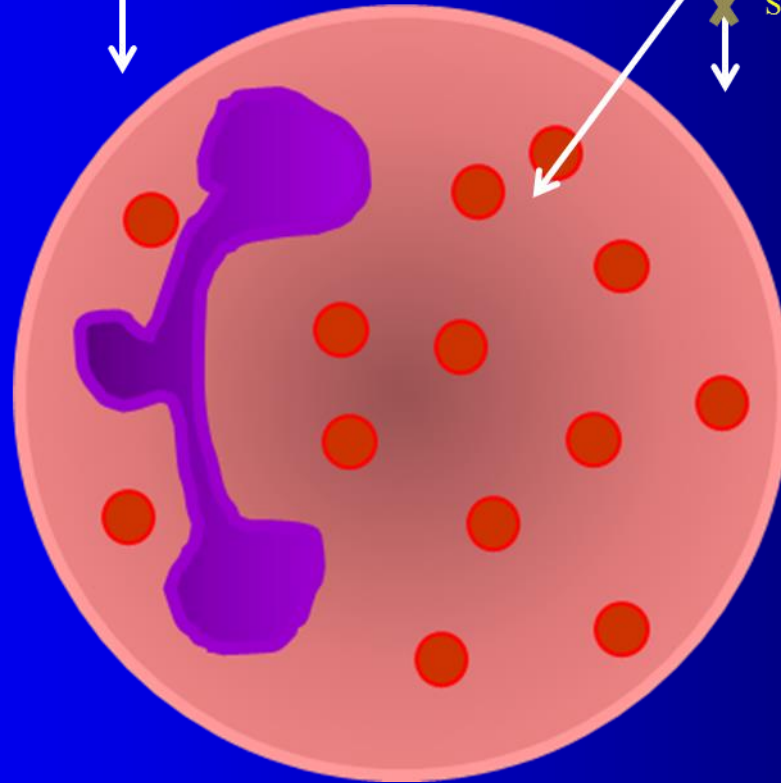
Intra- a extracelulární tvorba RMKD



Intra- a extracelulární tvorba RMKD



SOD/CAT



Intra- a extracelulární tvorba RMKD

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**

Rozlišení mezi RMK a RMD

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

Metody stanovení:

- volných radikálů
- aktivity zdrojů volných radikálů
- **antioxidační aktivity biologických vzorků**
- jednotlivých antioxidantů
- poškození biologických makromolekul

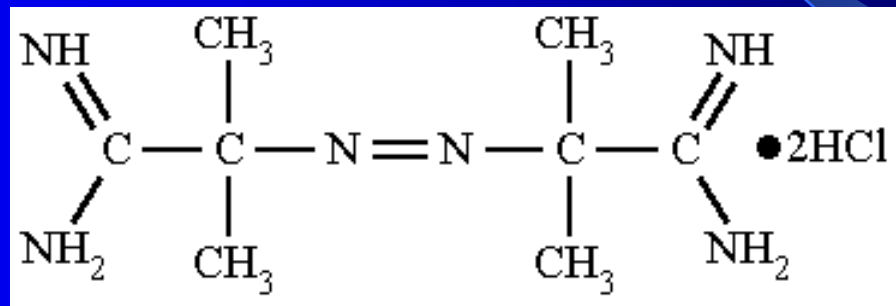
Systemy generující RMKD

- 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)

Metoda TRAP

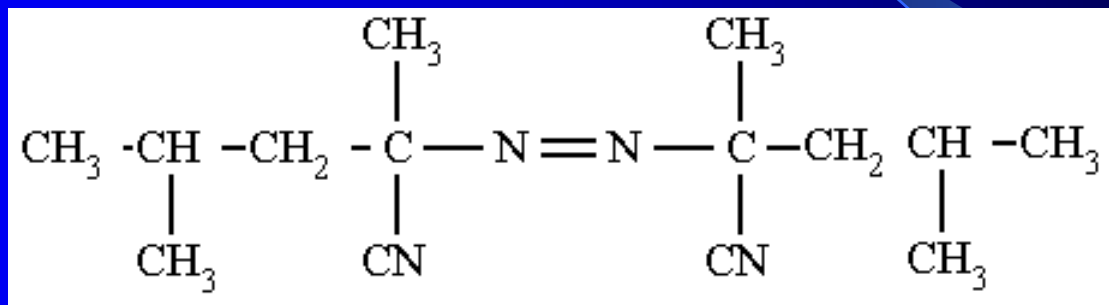
- Total (peroxyl) Radical-trapping Antioxidative Parameter
- stanovení celkové antioxidační kapacity ve vodě rozpustných antioxidantů
- referenční vzorek: trolox

Metoda TRAP



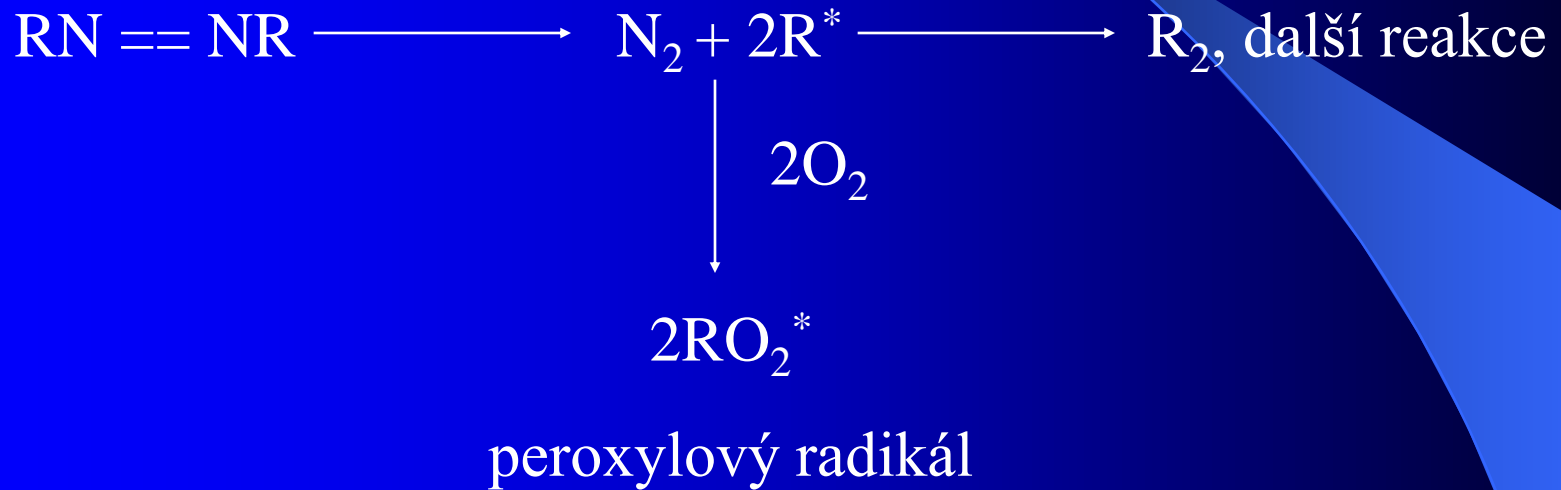
- 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride
- 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride

Metoda TRAP v lipidové fázi

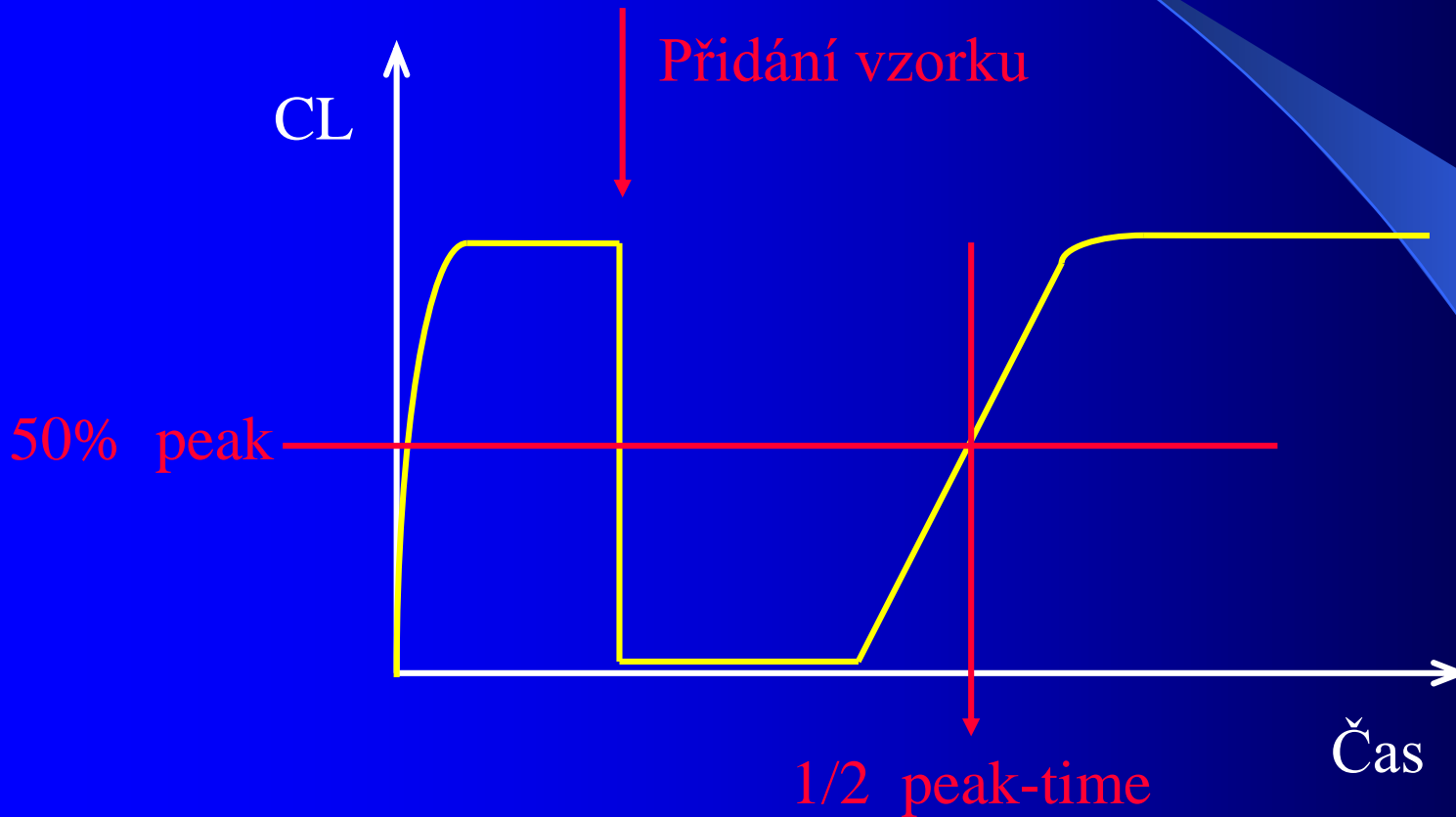


- 2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile)

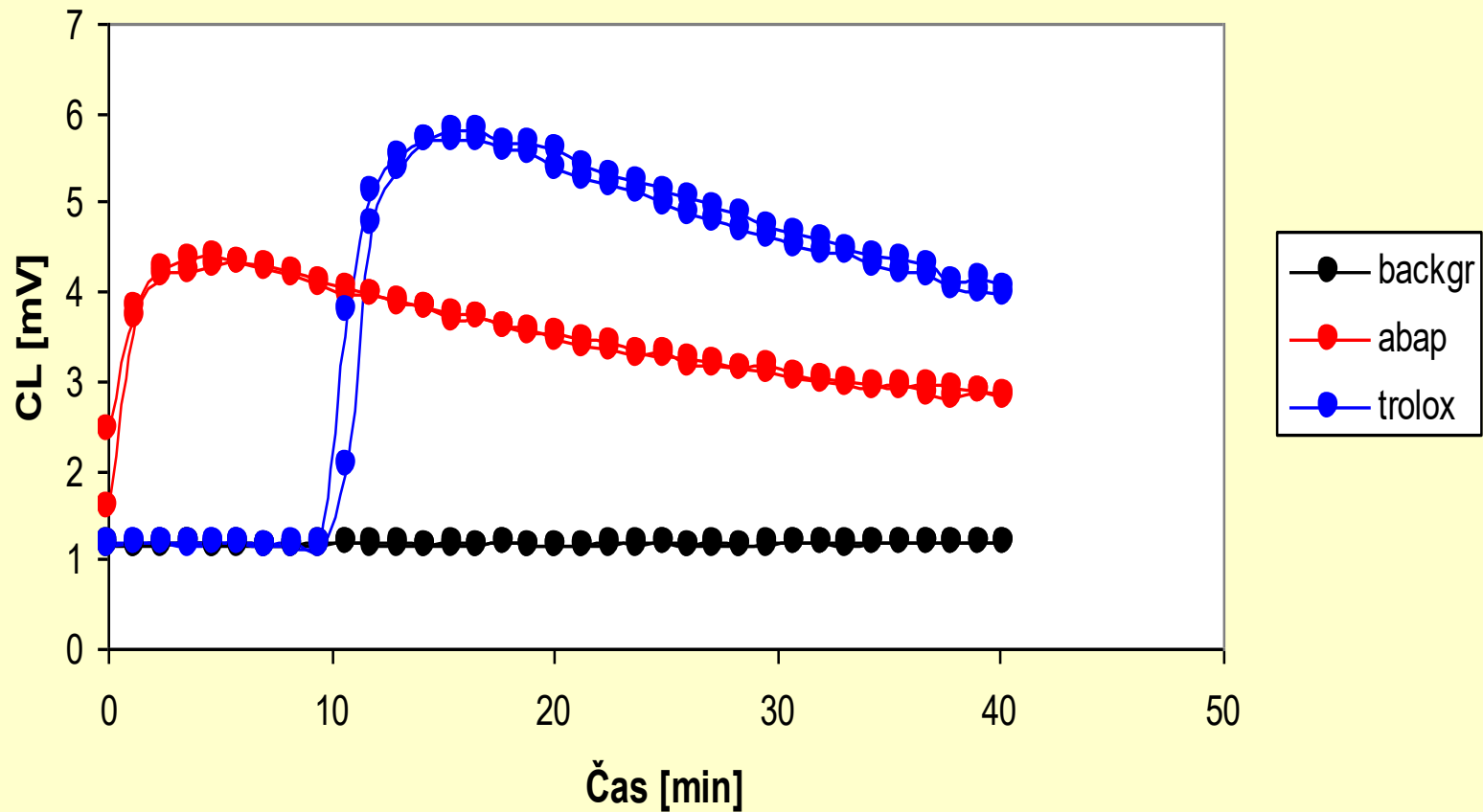
Metoda TRAP



Metoda TRAP



Metoda TRAP



Metody stanovení:

- volných radikálů
- aktivity zdrojů volných radikálů
- antioxidační aktivity biologických tekutin
- **jednotlivých antioxidantů**
- poškození biologických makromolekul

Spektrofotometrie

- **jednotlivé antioxidanty:**
 - kyselina močová
 - kyselina askorbová
 - albumin
 - bilirubin

Metody stanovení:

- volných radikálů
- aktivity zdrojů volných radikálů
- antioxidační aktivity biologických tekutin
- jednotlivých antioxidantů
- **poškození biologických makromolekul**

Poškození biologických makromolekul

- **Lipidová peroxidace**

Stanovení konjugovaných dienu pomocí CL

Stanovení MDA spektrofotometricky, HPLC

Stanovení 4-hydroxynonenalu (spektrometrie, GC-MS)

Poškození biologických makromolekul

- **Oxidativní poškození bílkovin**

Stanovení karbonylových skupin proteinů (HPLC, spektrometrie)

Stanovení proteinových hydroperoxidů

Poškození biologických makromolekul

- **Oxidativní poškození DNA**

Stanovení 8-hydroxy-deoxy-guanosinu (8-OHdG)

-HPLC, GC-MS