

Metody výzkumu patofyziologie volných radikálů

Milan Číž

Oxidativní stres



- redoxní rovnováha
- poškození biologických makromolekul

Oxidativní stres

FYZIOL. FUNKCE

ZDROJ

POŠKOZENÍ

oxidace
xenobiotik

Cyt. P-450

regulace
hladkého
svalstva

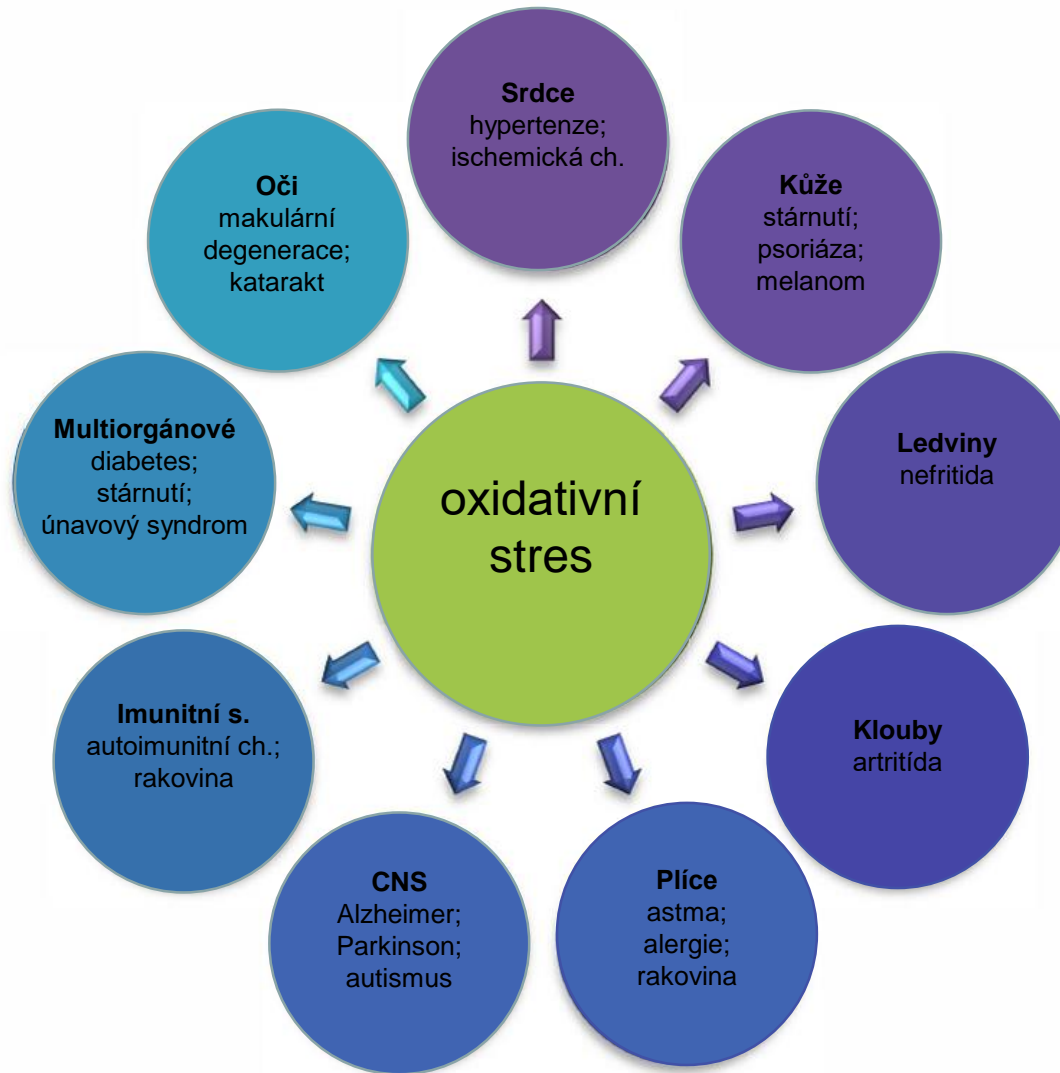
Endotel. buňky

destrukce
patogenů

Fagocyty

DNA
proteiny
lipidy
sacharidy

Oxidativní stres



Metody stanovení

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

Metody detekce

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

Chemiluminescence

Chemiluminescence (1)

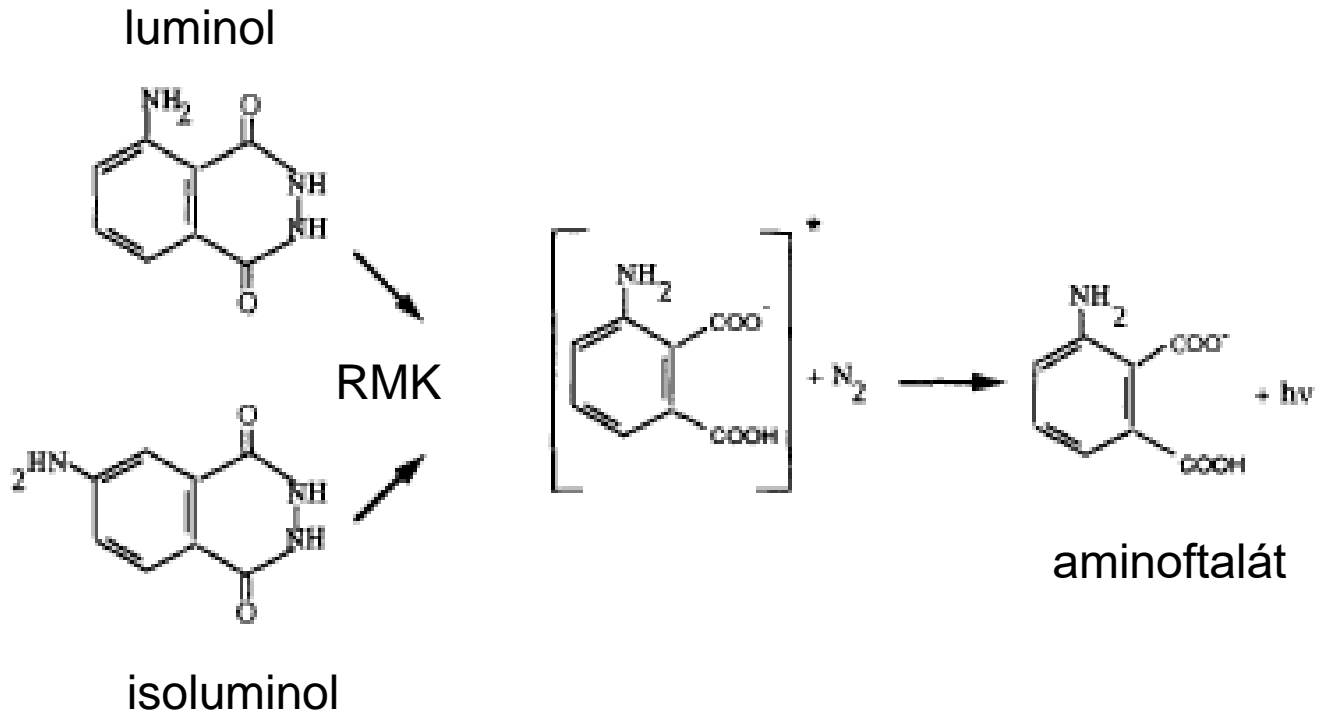
Luminofory jsou oxidovány RMKD. Při návratu do základního energetického stavu emitují fotony. Jejich detekce je možná pomocí luminometrů nebo scintilačních spektrofotometrů.

Nejčastěji používané luminofory:

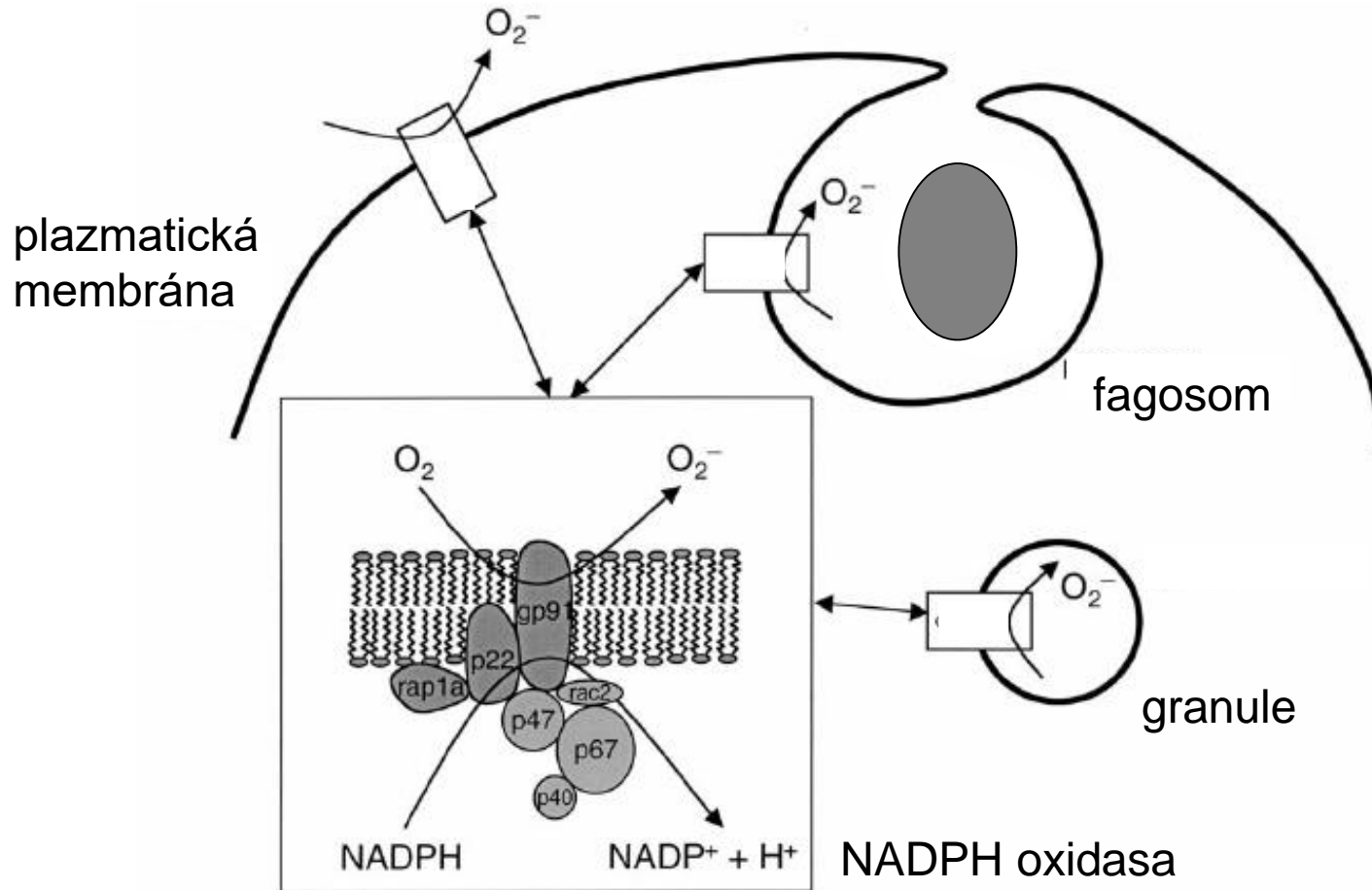
- Luminol
- Lucigenin
- Izoluminol
- Pholasin



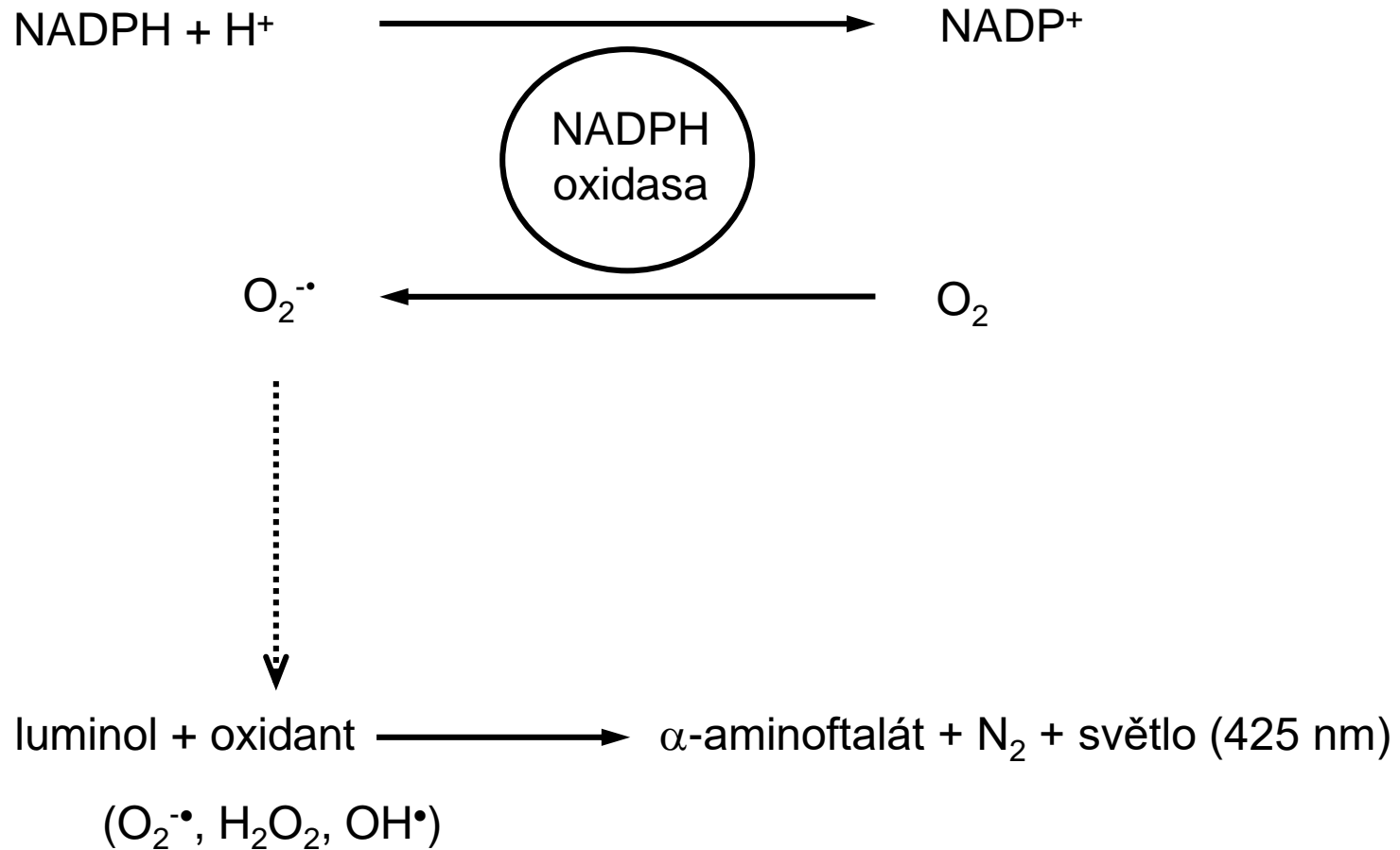
Chemiluminescence



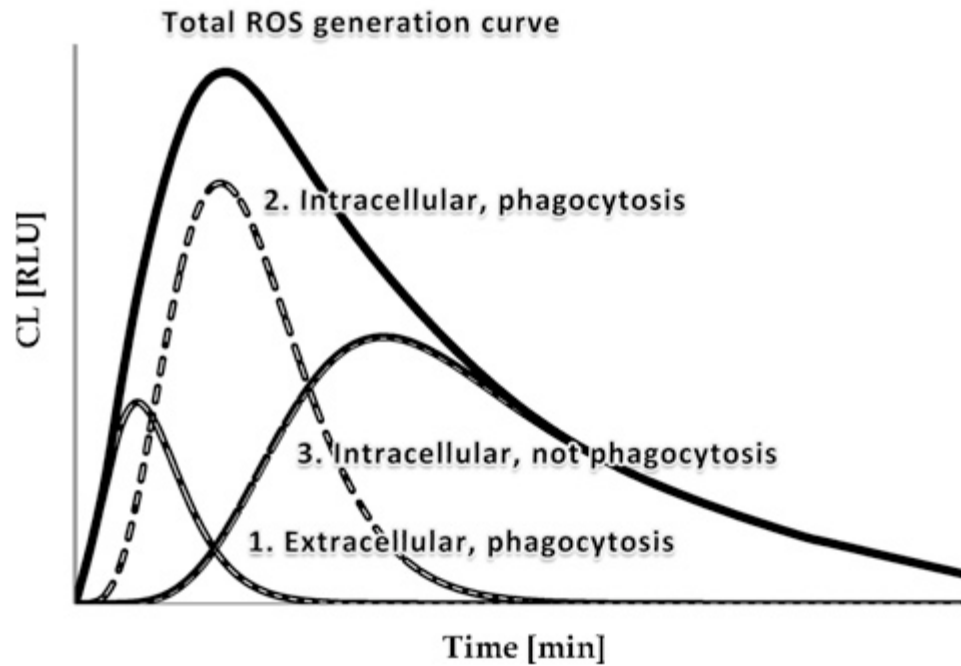
CL fagocytů



CL fagocytů



CL fagocytů

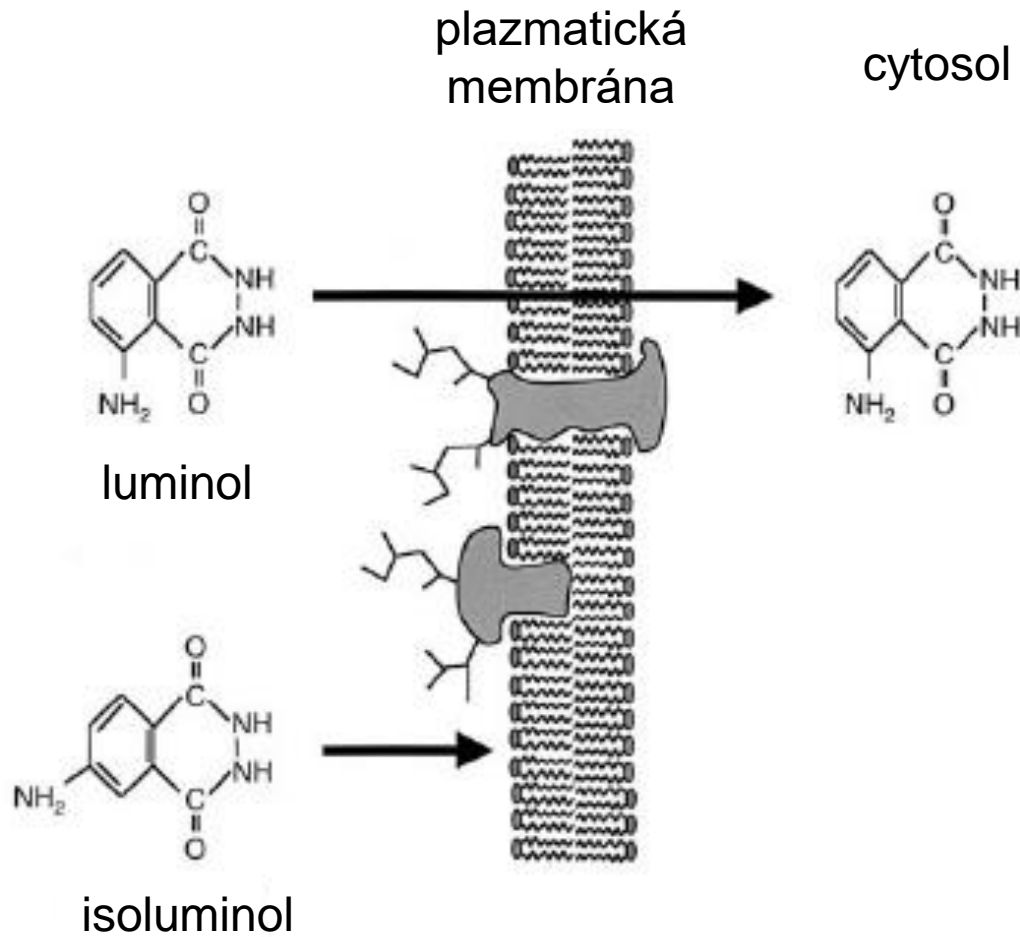


CL fagocytů

Rozlišení intra- a extracelulární CL

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

CL fagocytů



CL fagocytů

Aktivátory fagocytů

opsonizované částice (OZP)
fMLP
PMA
vápníkový ionofor A23187

Místo působení

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

CL fagocytů

Rozlišení mezi RMK a RMD

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

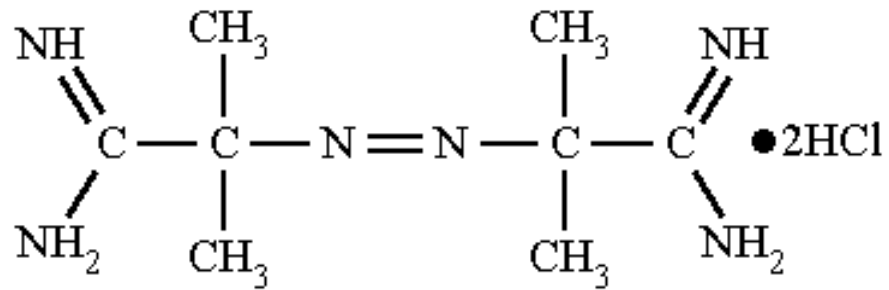
Systemy generující RMKD

- 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

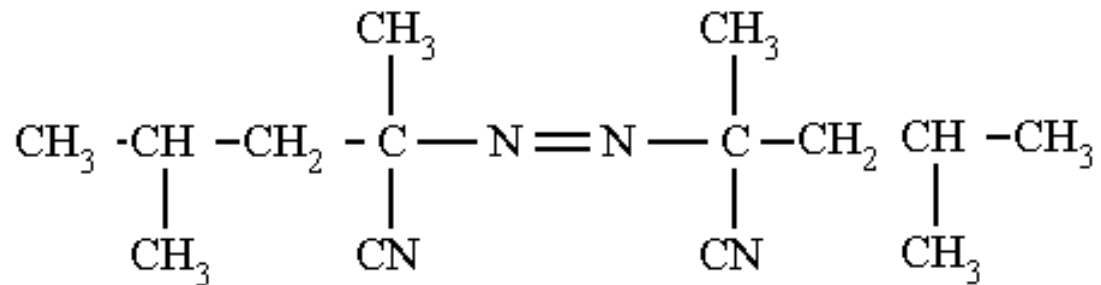
- **Total (peroxyl) Radical-trapping Antioxidative Parameter**
- stanovení celkové antioxidační kapacity ve vodě rozpustných antioxidantů
- referenční vzorek: trolox

Metoda TRAP



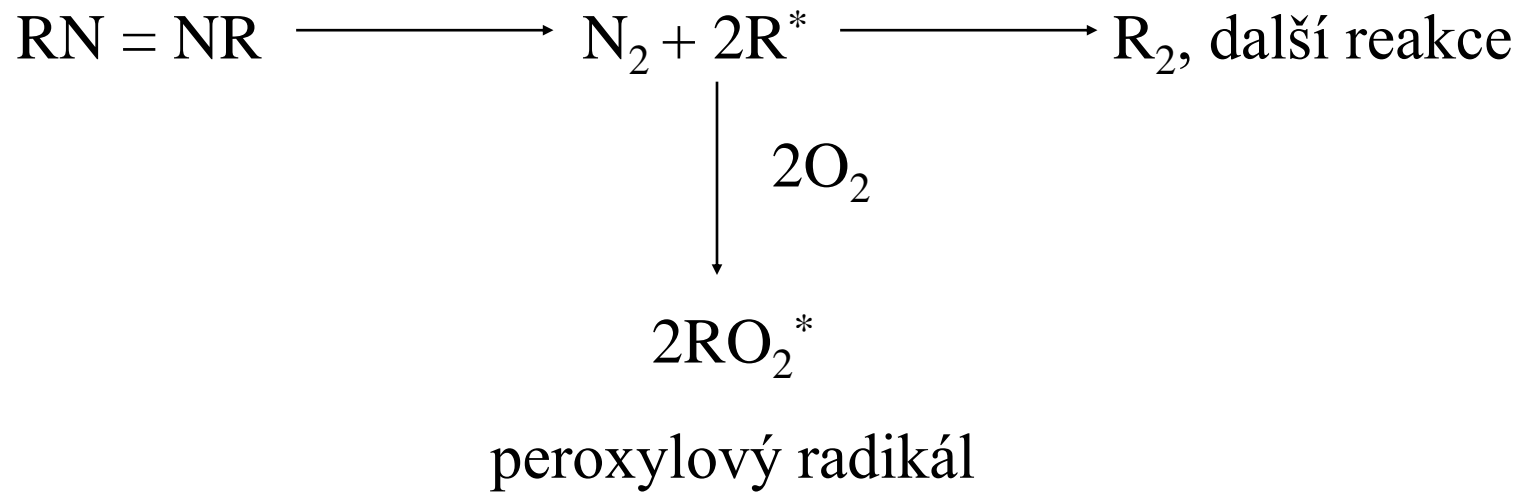
- 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride
- 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride

Metoda TRAP v lipidové fázi

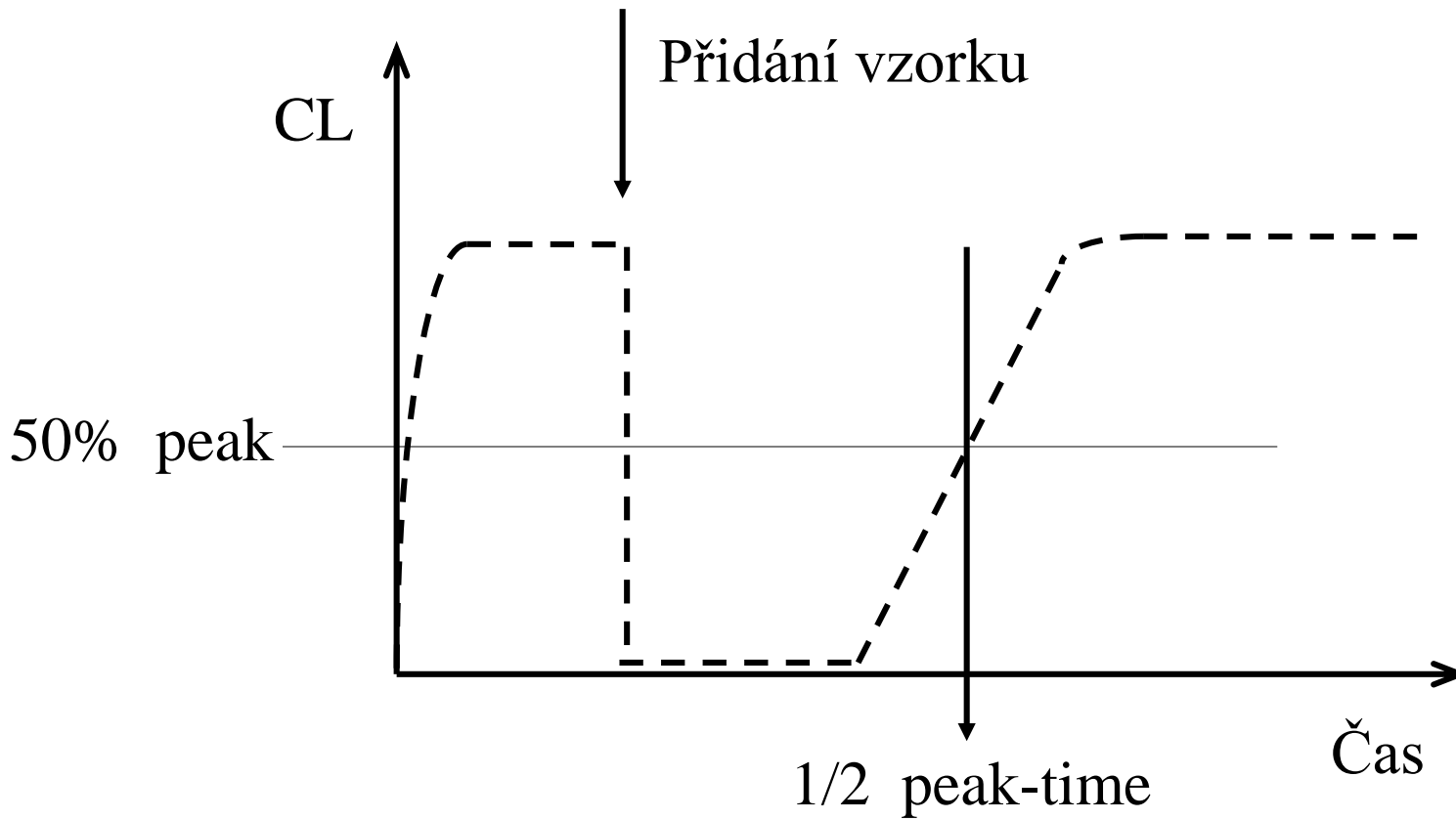


- 2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile)

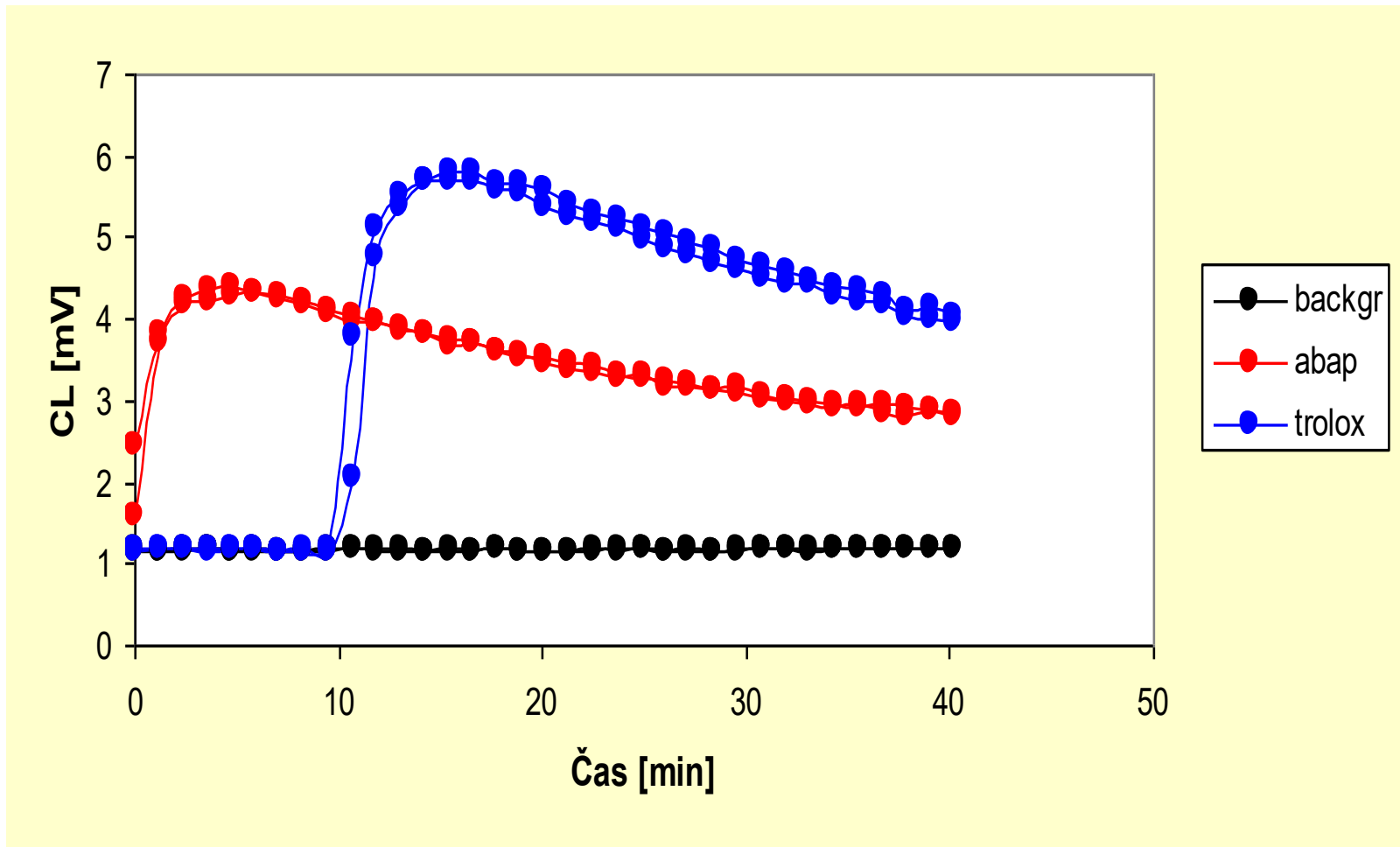
Metoda TRAP



Metoda TRAP



Metoda TRAP



Chemiluminescence

Chemiluminescence (2)

- **aktivita MPO:**
bromid-dependentní chemiluminescence v přítomnosti vzorku a peroxidu vodíku
- **buněčná proliferace a cytotoxicita:**
luciferin-luciferáza
závislé na ATP
- **regulace exprese genů**
reporter gene assay

Průtoková cytometrie

- **tvorba RMK neutrofily a makrofágy:**
Dichlorodihydrofluorescein diacetate – peroxid vodíku, peroxynitrit
Dihydrorhodamine 123 - peroxid vodíku, peroxynitrit
Dihydroethidium bromide – superoxidový anion.
- **oxid dusnatý:**
1,2-diaminoanthroquinone



Průtoková cytometrie

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

Průtoková cytometrie

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?

Průtoková cytometrie

Dihydroethidium

Detekce O_2^-

Výhody

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

Nevýhody

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

Průtoková cytometrie

- **povrchové antigeny:**
MAb značené různými fluorescenčními značkami
- **buněčný cyklus, buněčná viabilita:**
propidium iodide

EPR

Metody využívající existence spinu a jeho chování v silném magnetickém poli. Podle toho, zda se jedná o spin elektronu nebo jádra se dělí spektroskopické metody na nukleární a elektronové.

- nukleární magnetická rezonance NMR
- nukleární kvadrupólová rezonance NQR
- **elektronová paramagnetická rezonance EPR**
- Muonová rezonance

Objevena 1945. Metoda je založena na měření absorpce a emise elektromagnetického záření (mikrovlny) elektronů.

EPR

Na vzájemné interakci elektronového momentu hybnosti s vnějším magnetickým polem je založena **elektronová paramagnetická rezonance (EPR)**, nazývaná také **elektronová spinová rezonance (ESR)**.

EPR spektroskopie často neumožňuje přímé stanovení krátce žijících radikálů bez použití složitých experimentálních postupů (měření při nízkých teplotách, použití tzv. flow-techniky apod.). Aby se umožnilo stanovení krátce žijících radikálů i bez použití speciálních postupů, byla v šedesátých letech vyvinuta metoda spin-trappingu.

EPR

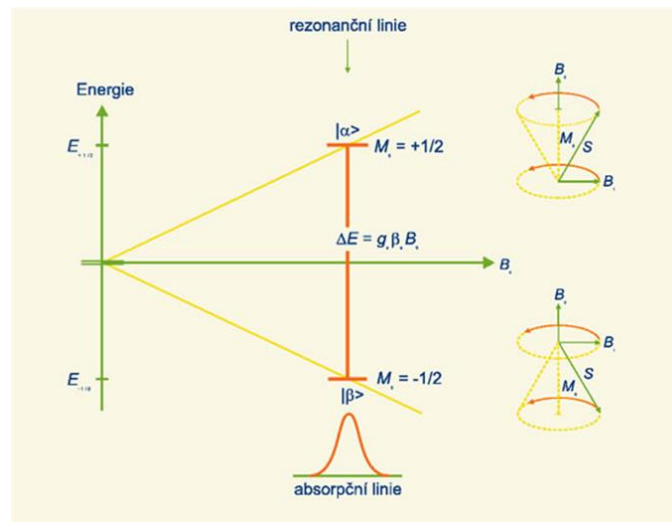
Metoda EPR je použitelná pro systémy s nenulovým spinem, tj. pro systémy, které obsahují alespoň 1 nepárový elektron. Jsou to např. paramagnetické ionty některých přechodných kovů nebo vzácných zemin s částečně zaplněnými **d** a **f** orbitaly jako Cu(II), Mn(II), Cr(III,IV), V(IV) a org. radikály.

Působením magnetického pole dojde k rozštěpení původního energetického stavu E_0 na energetické hladiny, odpovídající jednotlivým prostorovým orientacím celkového momentu hybnosti.

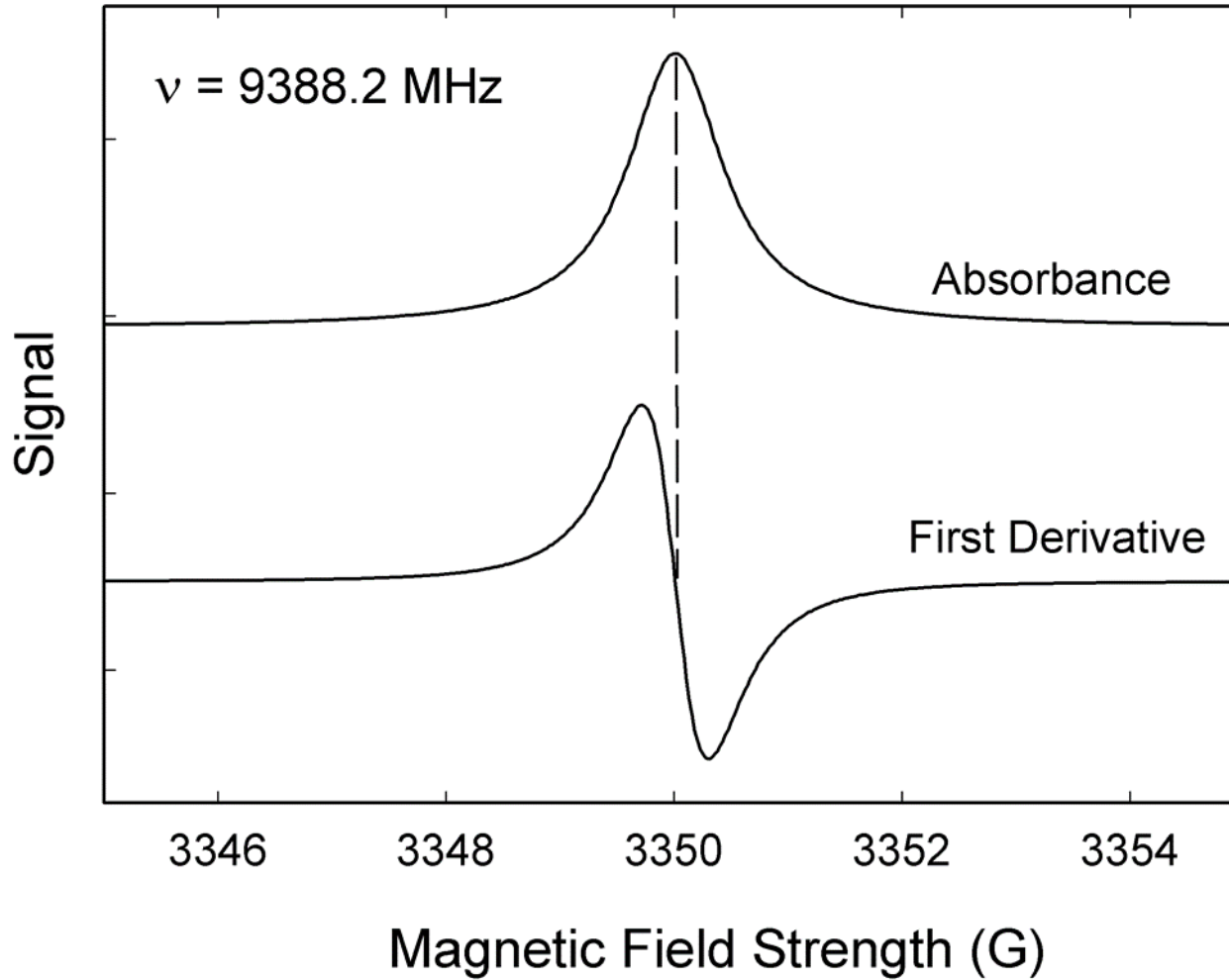
EPR

Interakcí nepárového elektronu s magneticky aktivními jádry okolních atomů nebo s jinými nepárovými elektrony dochází k rozštěpení signálu na multiplety.

- počet čar v multipletu $n+1$ (n - počet interagujících jader)



EPR



EPR

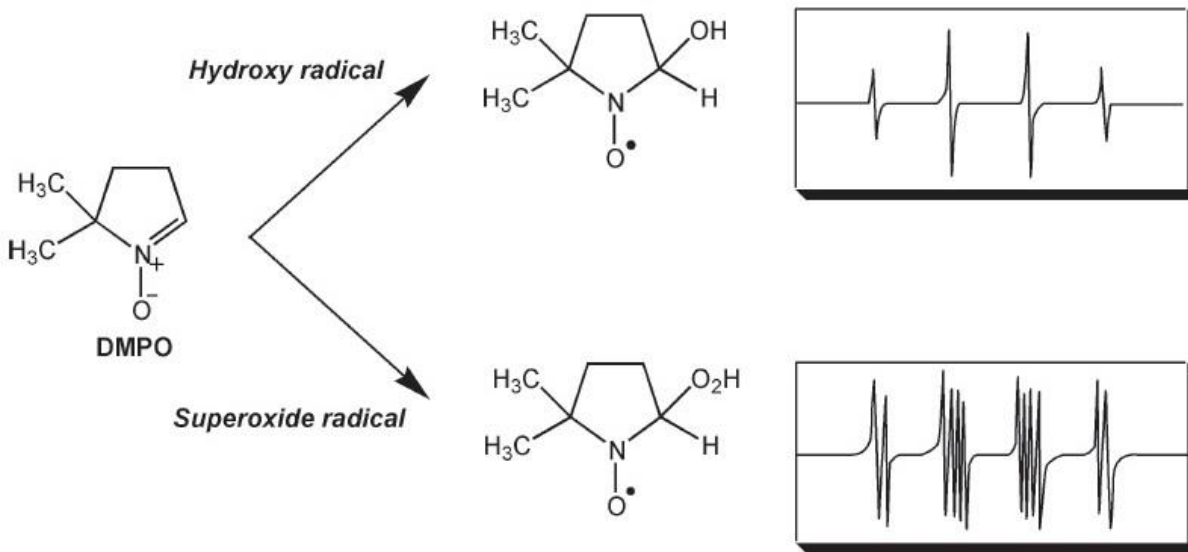


Fig. 1 ESR spectra of DMPO adducts

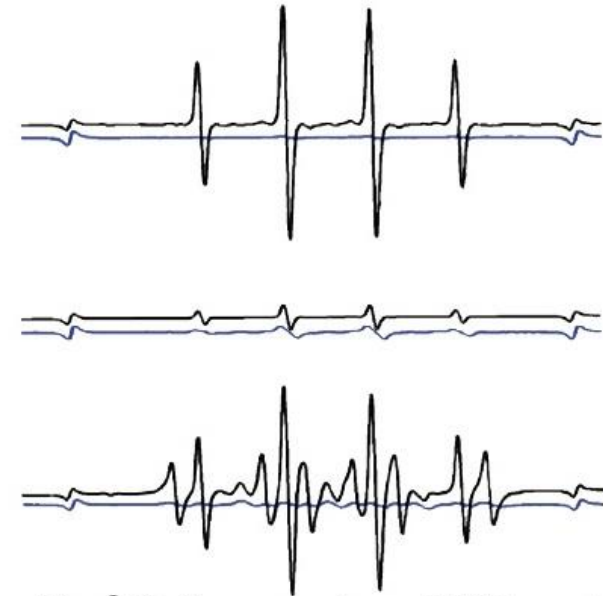


Fig. 2 Purity comparison of ESR spectra

EPR

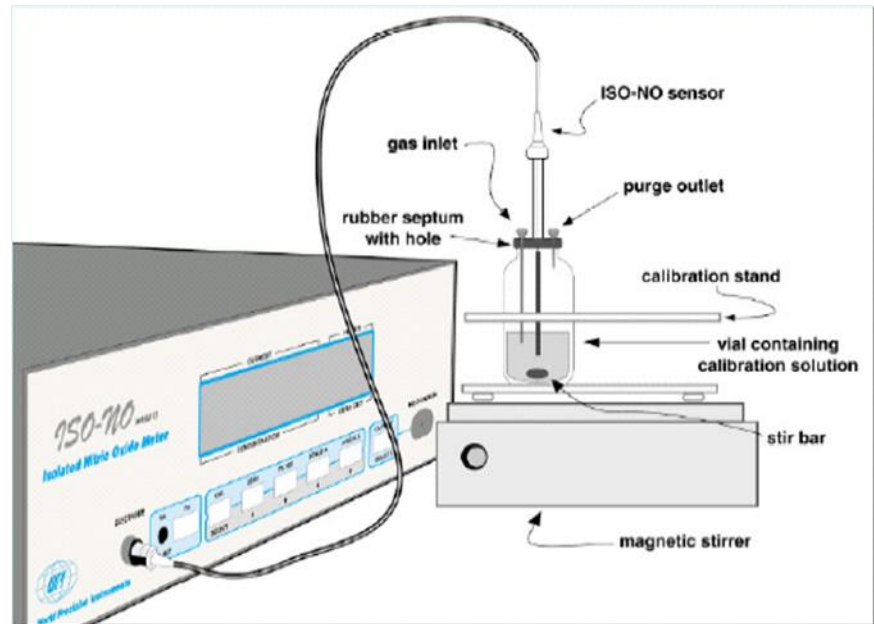


Spektrometrie

- **aktivita MPO:**
o-dianisidine
- **lipidová peroxidace:**
koncentrace TBARS
- **jednotlivé antioxidanty:**
kyselina močová, kyselina askorbová, albumin, bilirubin
- **oxid dusnatý:**
Griessova reakce (nitrity, nitráty), detekční limit 100 nM, 548 nm.
- **viabilita, cytotoxicita, buněčná proliferace:**
MTT test

Elektrochemie

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



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