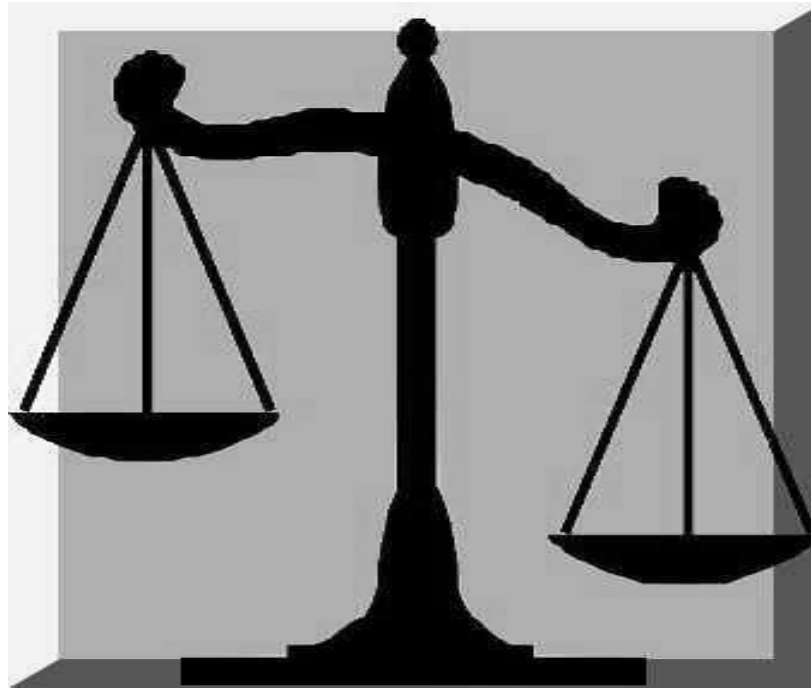


Metody výzkumu patofyziologie volných radikálů

Milan Číž

Oxidační stres



- redoxní rovnováha
- poškození biologických makromolekul

Oxidační stres

FYZIOL. FUNKCE

ZDROJ

POŠKOZENÍ

oxidace
xenobiotik

Cyt. P-450

regulace
hladkého
svalstva

Endotel. buňky

destrukce
patogenů

Fagocyty

DNA
proteiny
lipidy
sacharidy

Oxidační stres



Metody stanovení

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

Metody stanovení

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

Chemiluminescence

Chemiluminescence (1)

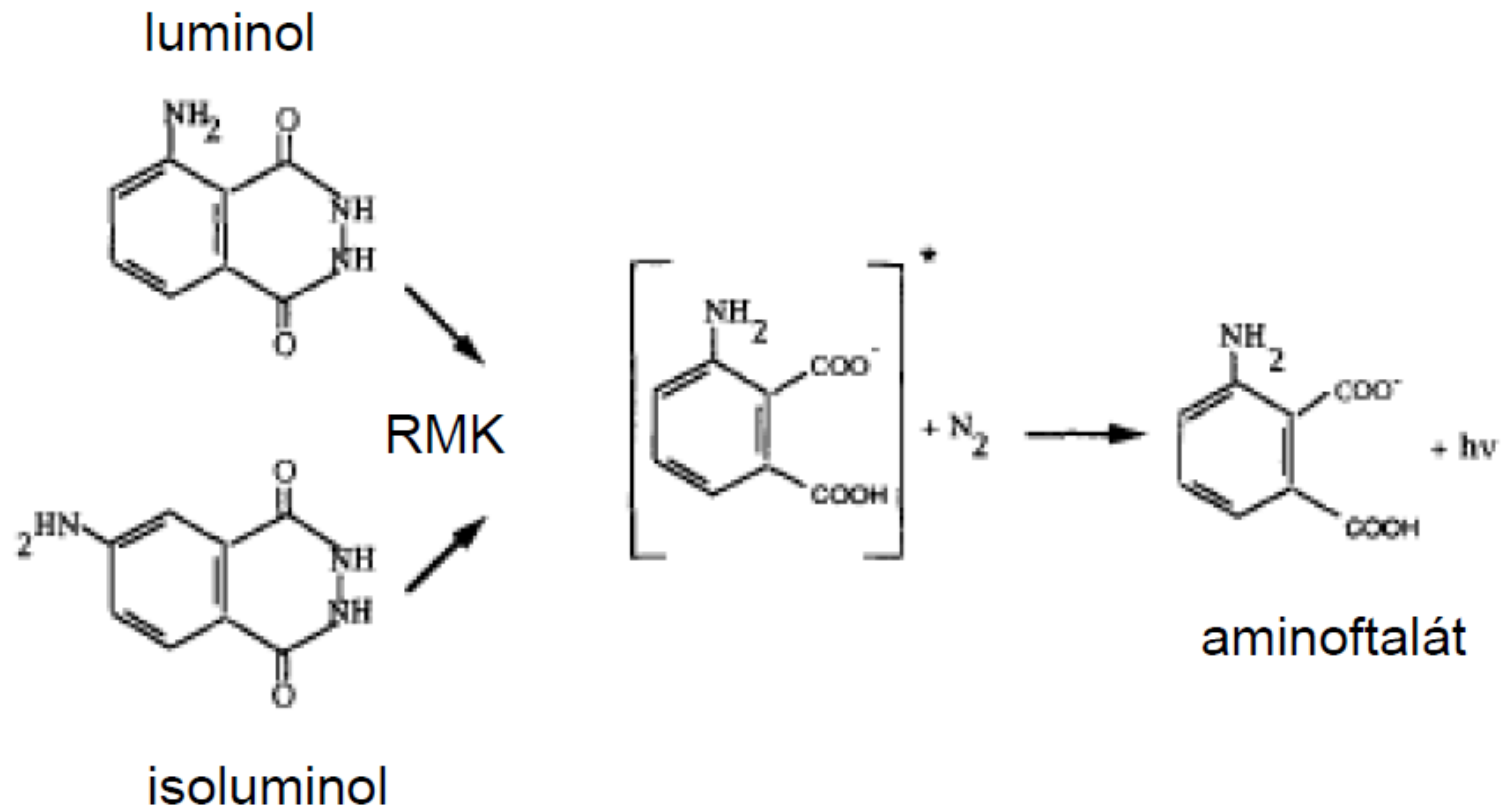
Luminofory jsou oxidovány RMKD. Při návratu do základního energetického stavu emitují fotony. Jejich detekce je možná pomocí luminometrů nebo scintilačních spektrofotometrů.

Nejčastěji používané luminofory:

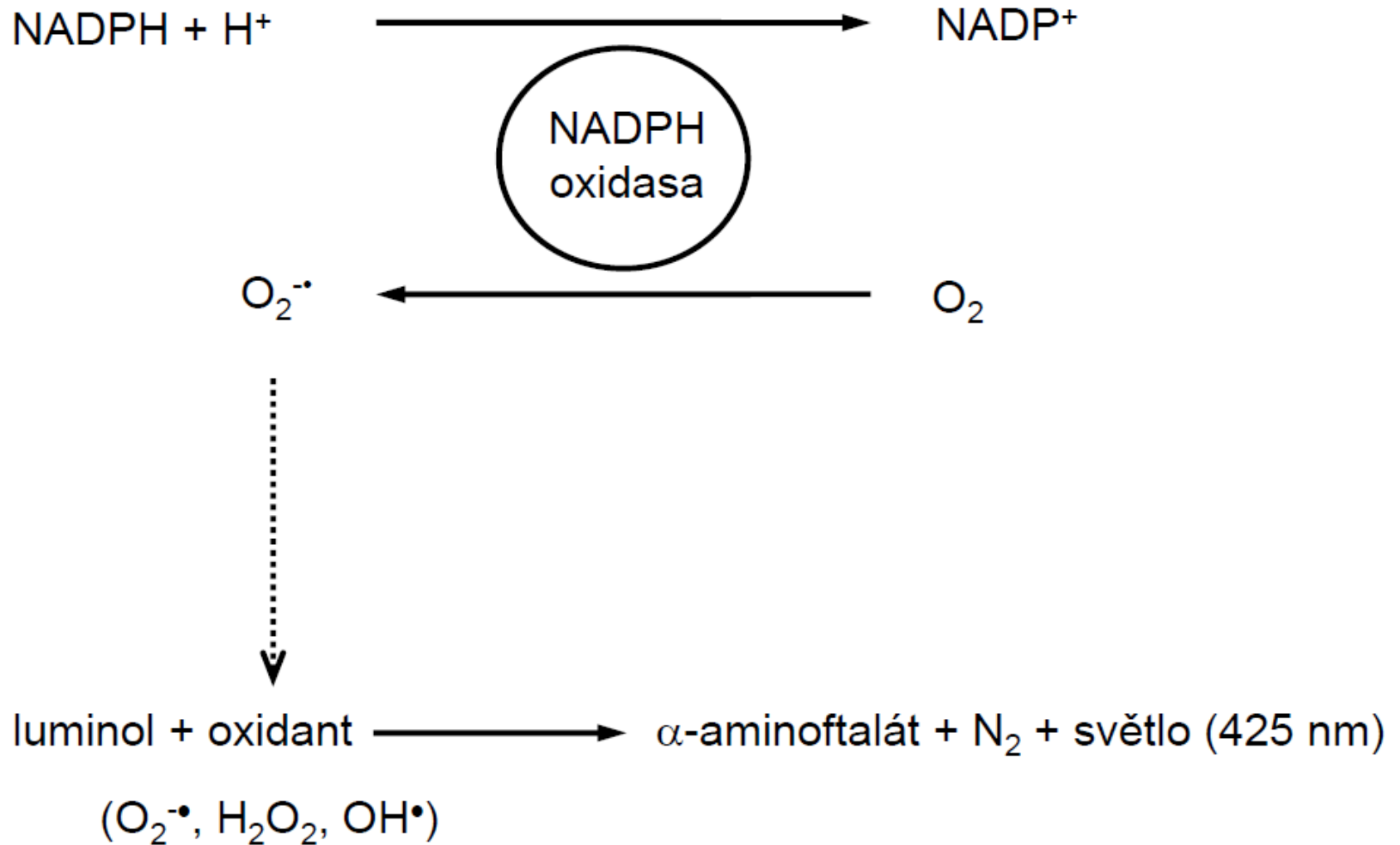
- Luminol
- Lucigenin
- Isoluminol
- Pholasin



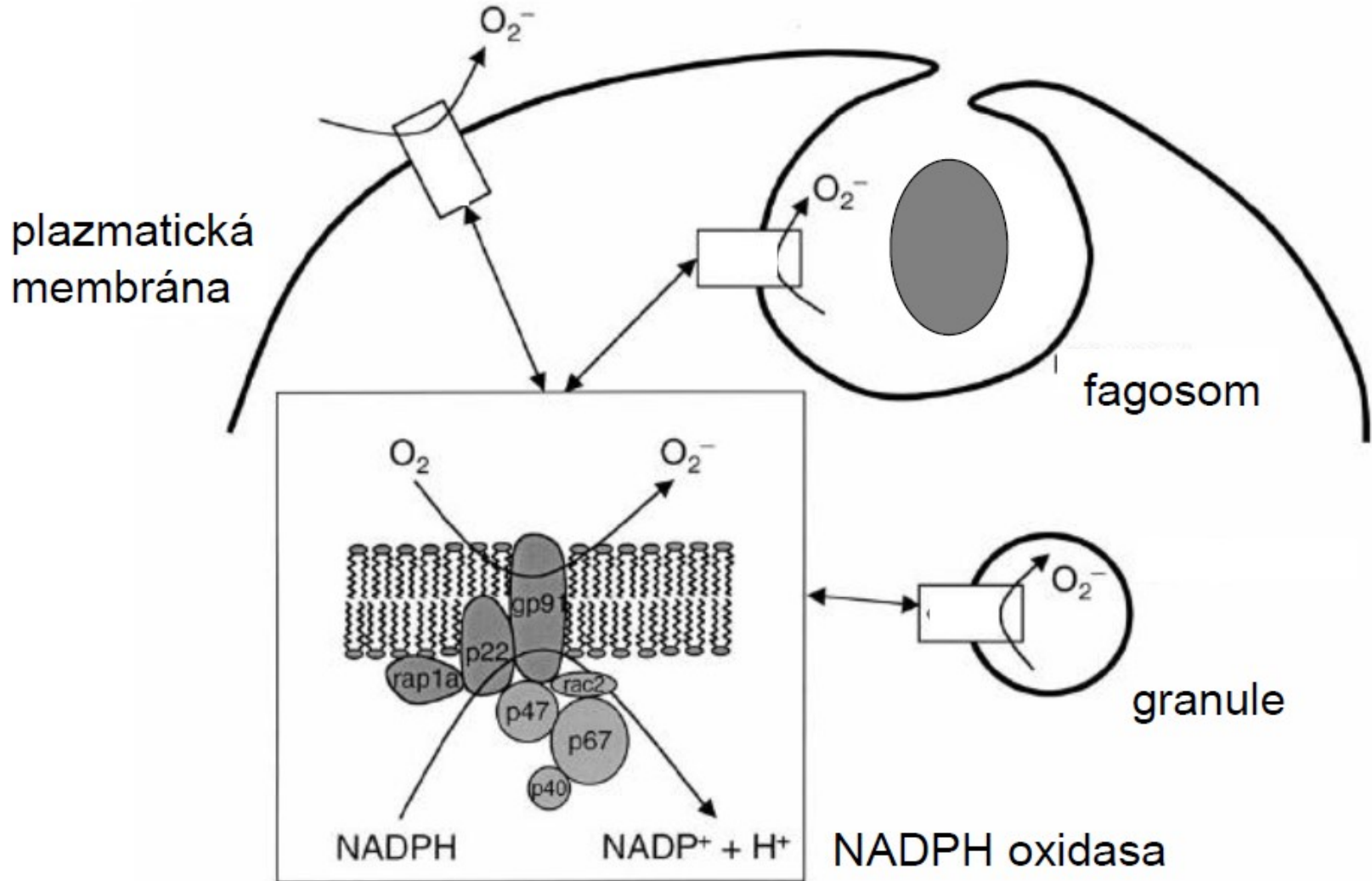
Chemiluminescence



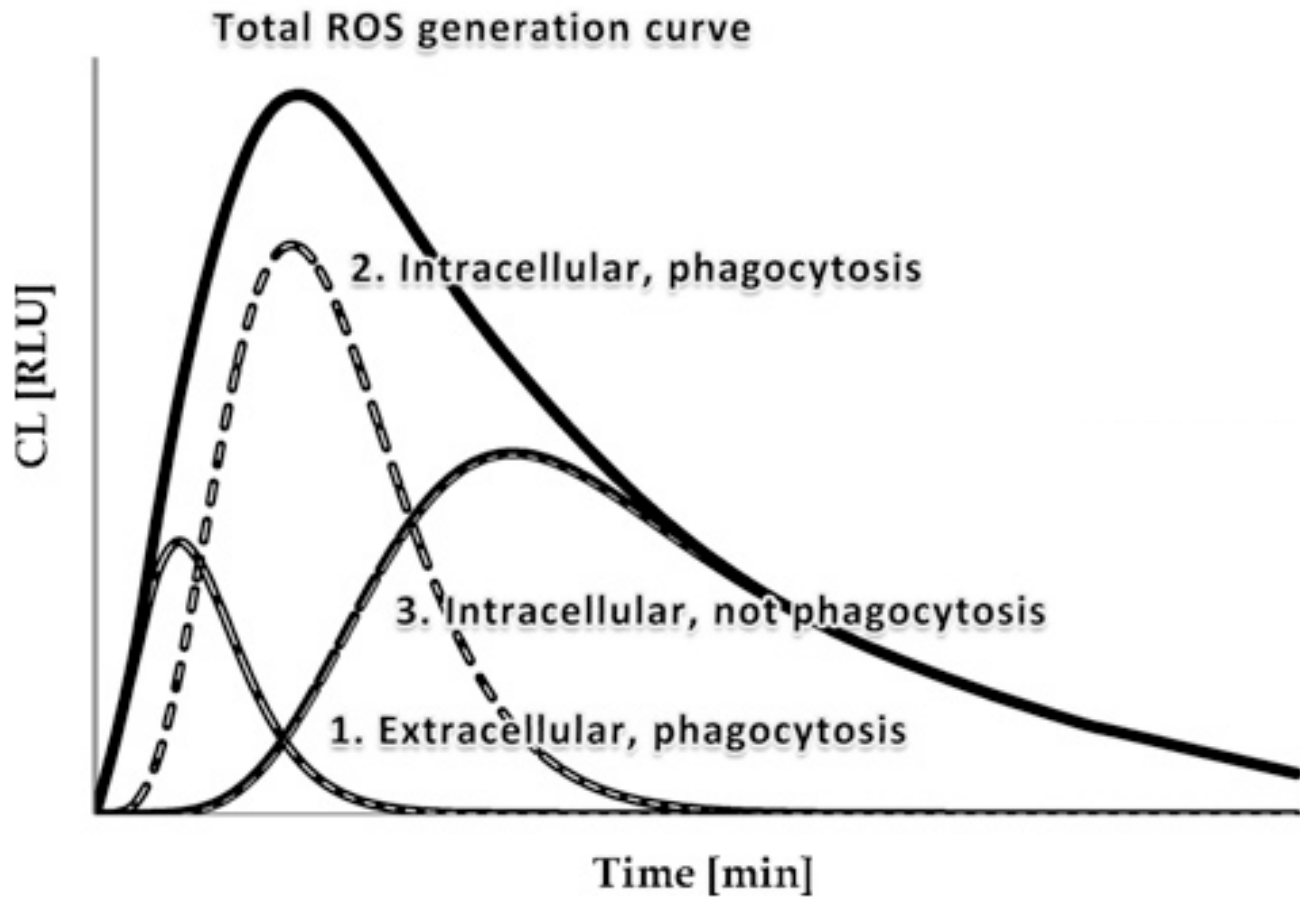
CL fagocytů



CL fagocytů



CL fagocytů

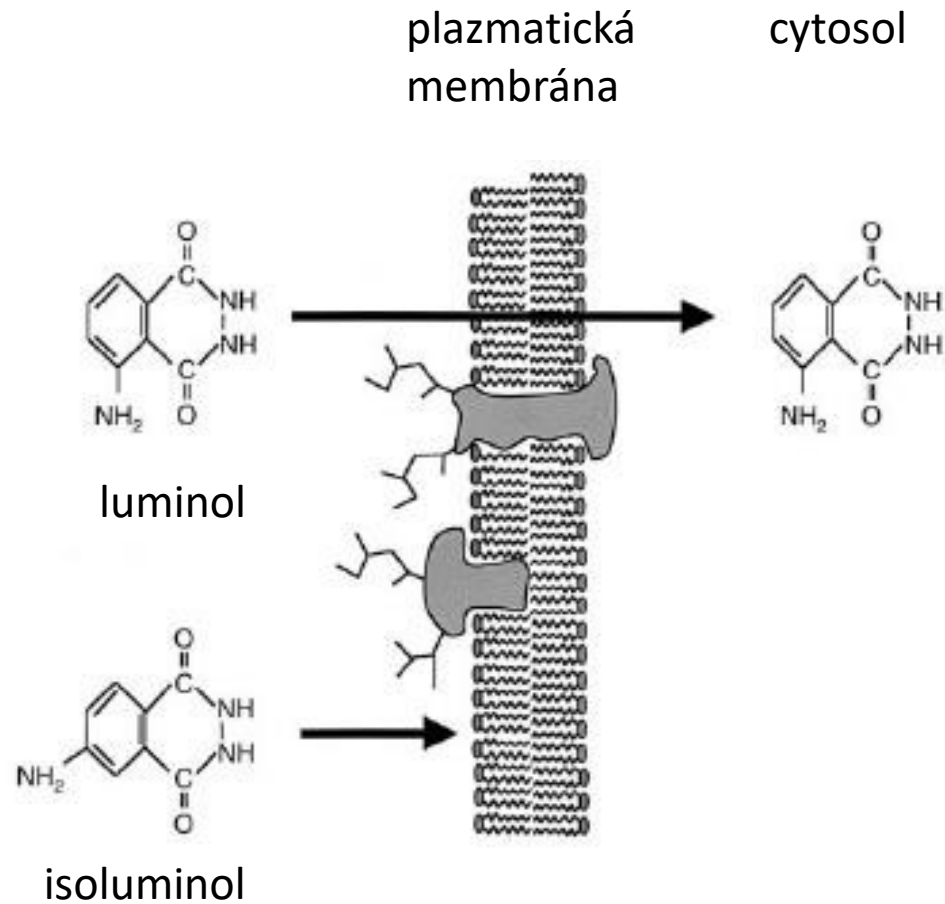


CL fagocytů

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

proteinkináza C

Ca²⁺ → PKC

CL fagocytů

Rozlišení mezi RMK a RMD

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

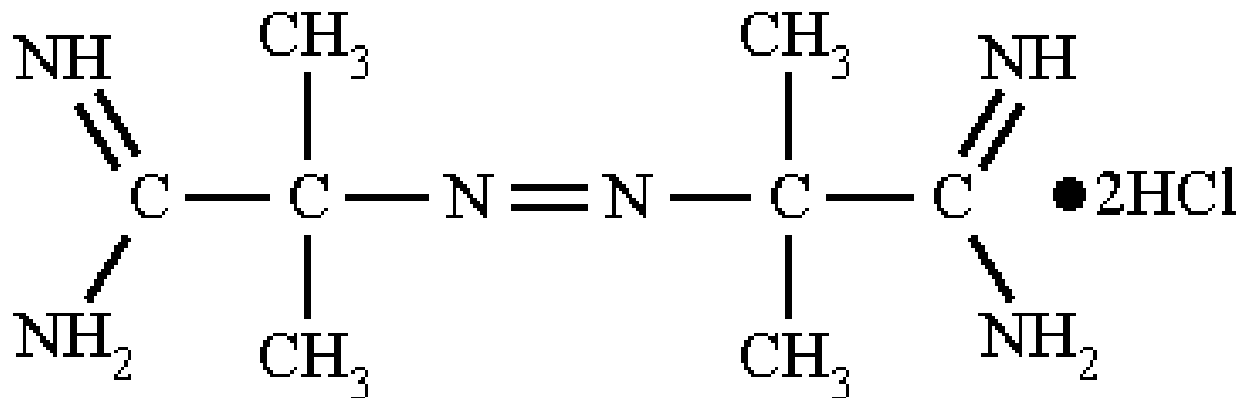
Systemy generující RMKD

- 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

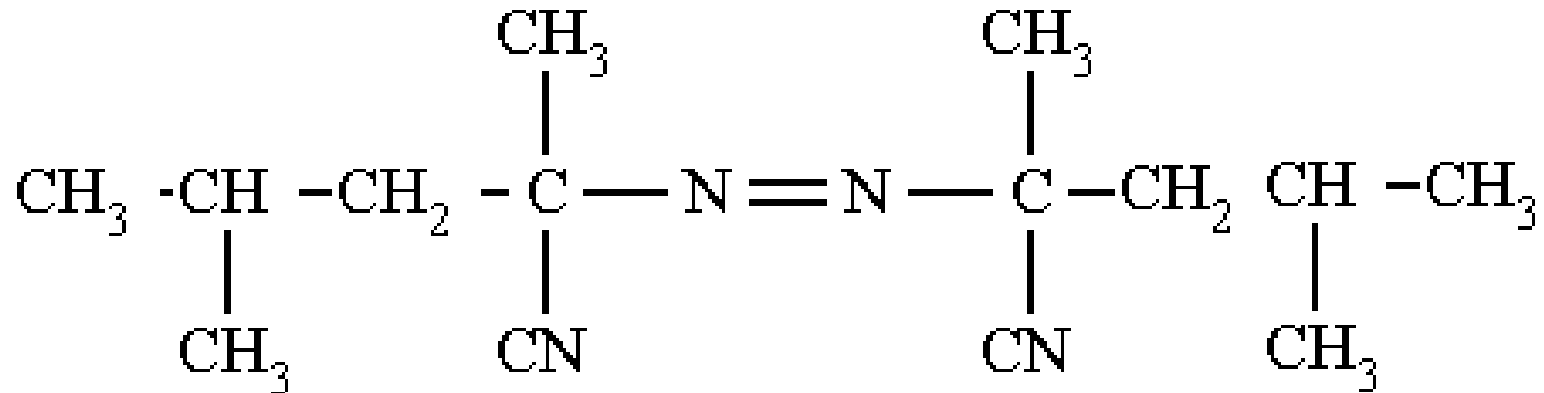
- **T**otal (peroxyl) **R**adical-trapping **A**ntioxidative **P**arameter
- stanovení celkové antioxidační kapacity ve vodě rozpustných antioxidantů
- referenční vzorek: trolox

Metoda TRAP



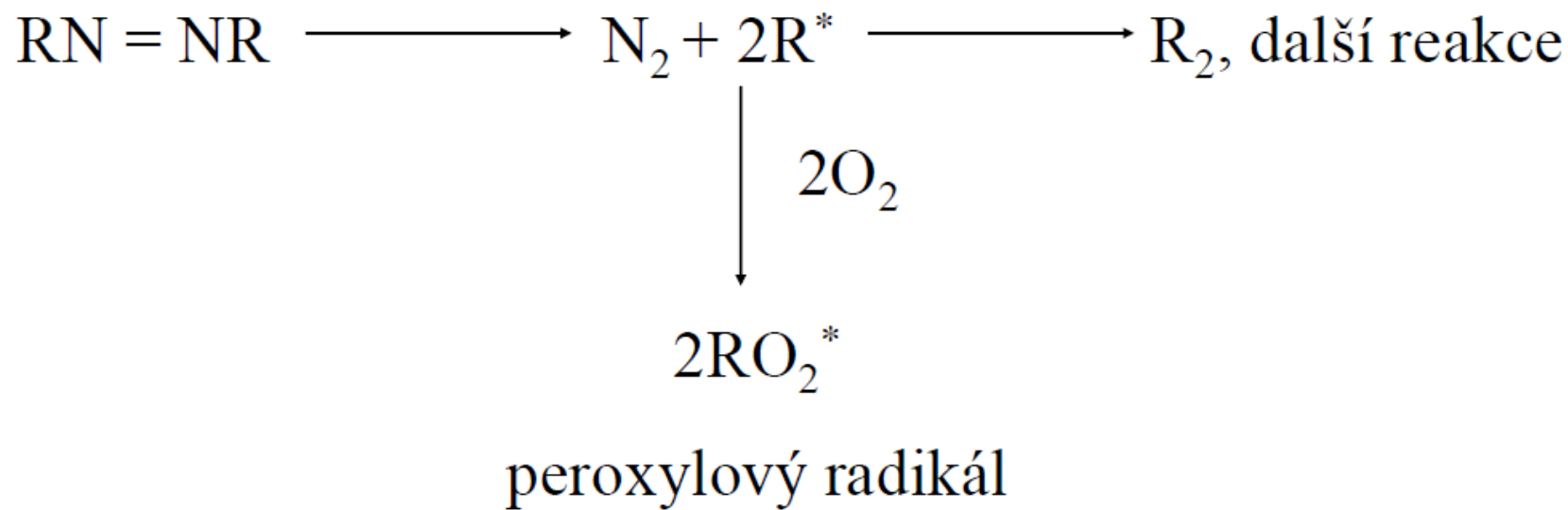
- 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride
- 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride

Metoda TRAP v lipidové fázi

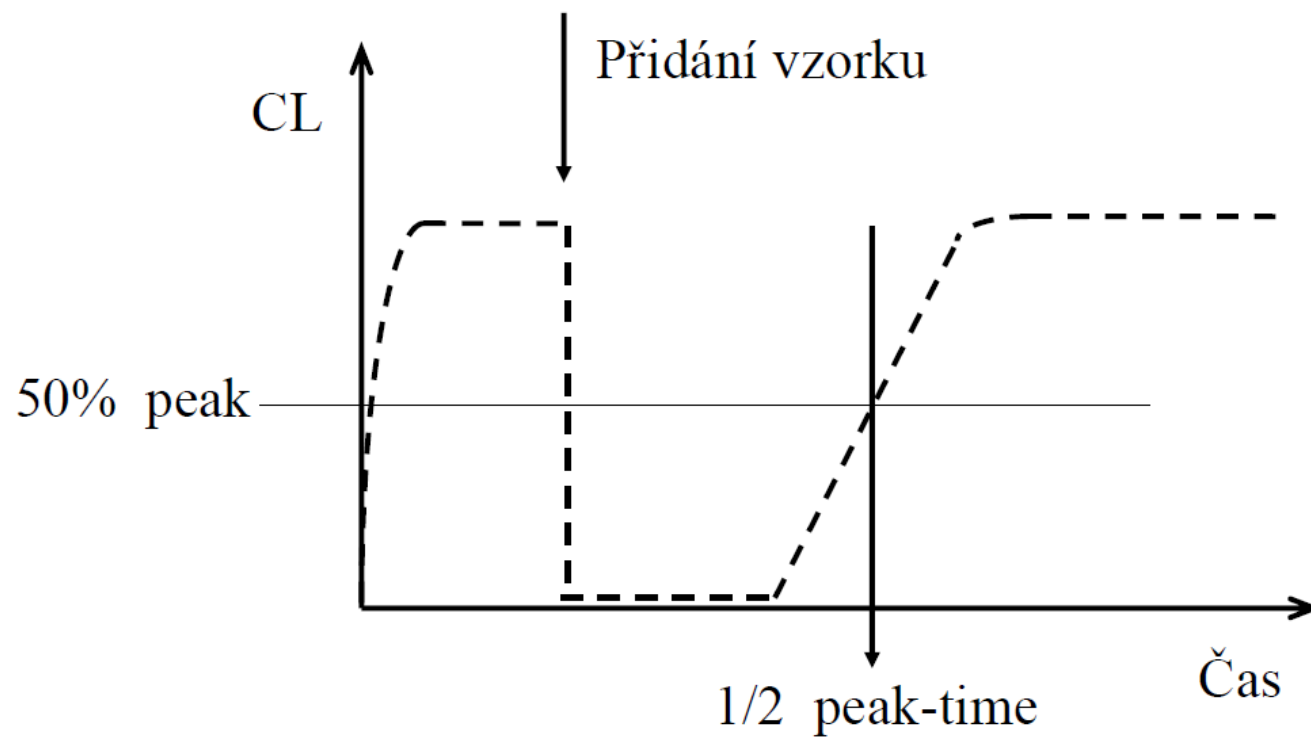


- 2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile)

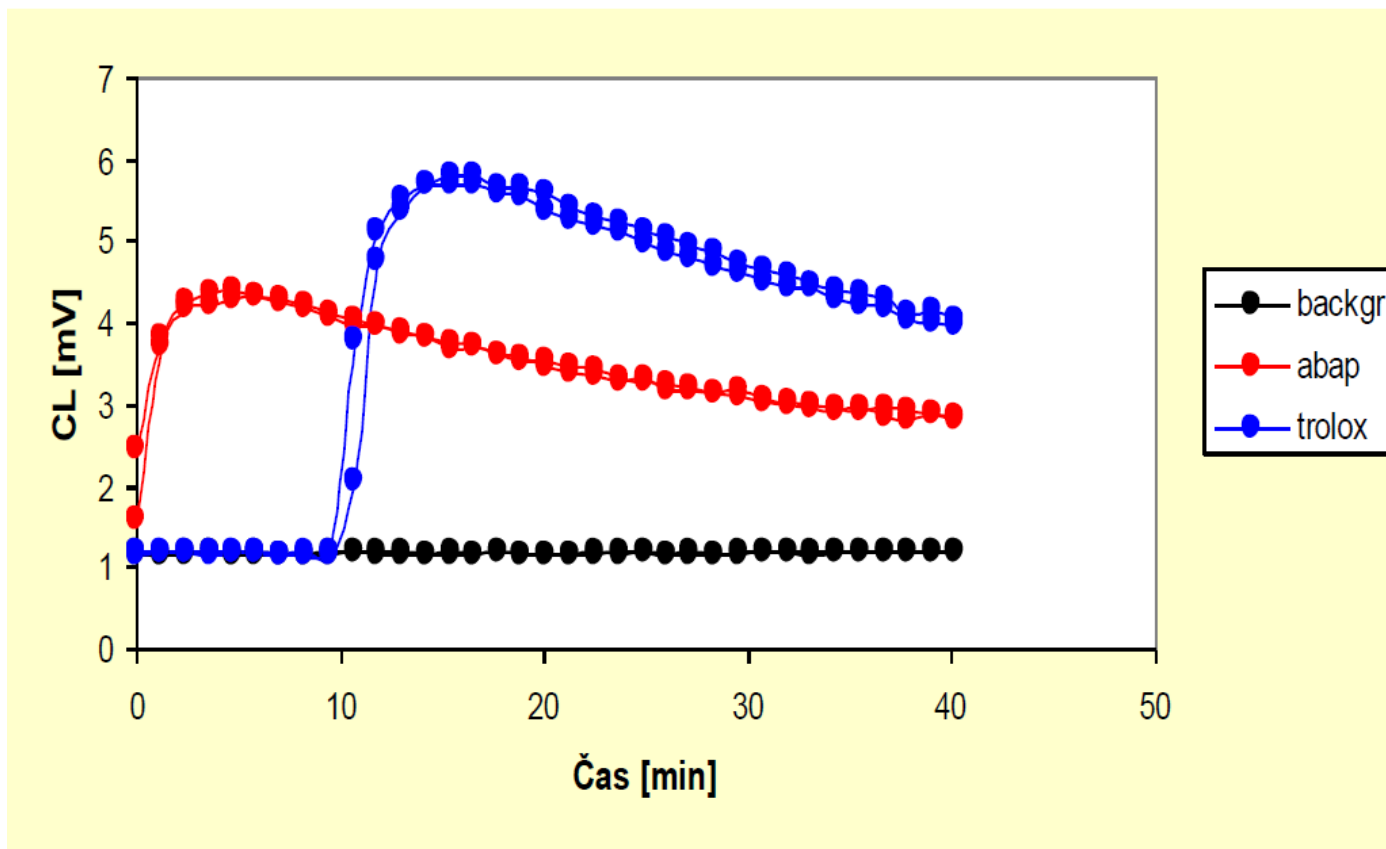
Metoda TRAP



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, peroxyinitrit
 - Dihydrorhodamine 123:
 - peroxid vodíku, peroxyinitrit
 - Dihydroethidium (hydroethidine):
 - 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 - nelze fixovat
- vysoká citlivost vůči světlu
- toxicita

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

- nescifická detekce oxidantů
- závislost na mitochondriálním membránovém potenciálu?

Průtoková cytometrie

Dihydroethidium

detekce $O_2^{\cdot-}$

Výhody

- dobrá specificita pro $O_2^{\cdot-}$
- stabilita - možnost fixace

Nevýhody

- HE katalyzuje dismutaci $O_2^{\cdot-}$
- 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

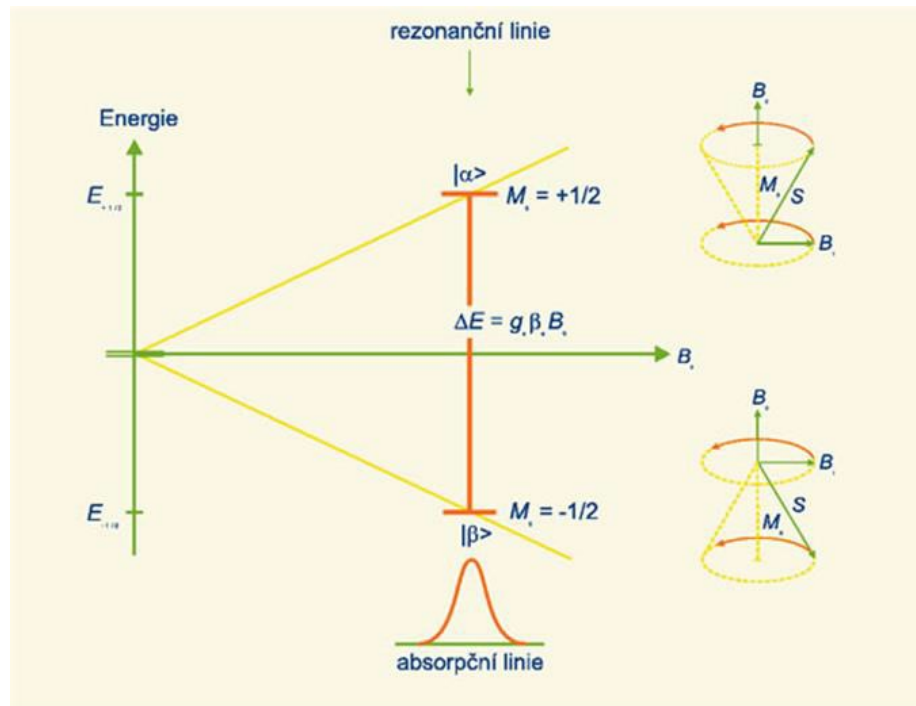
Metoda EPR je použitelná pro systémy s nenulovým spinem, tj. pro systémy, které obsahují alespoň 1 nepárový elektron. Jsou to např. paramagnetické ionty některých přechodných kovů nebo vzácných zemin s částečně zaplněnými *d* a *f* orbitaly jako Cu(II), Mn(II), Cr(III,IV), V(IV) a organické radikály.

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

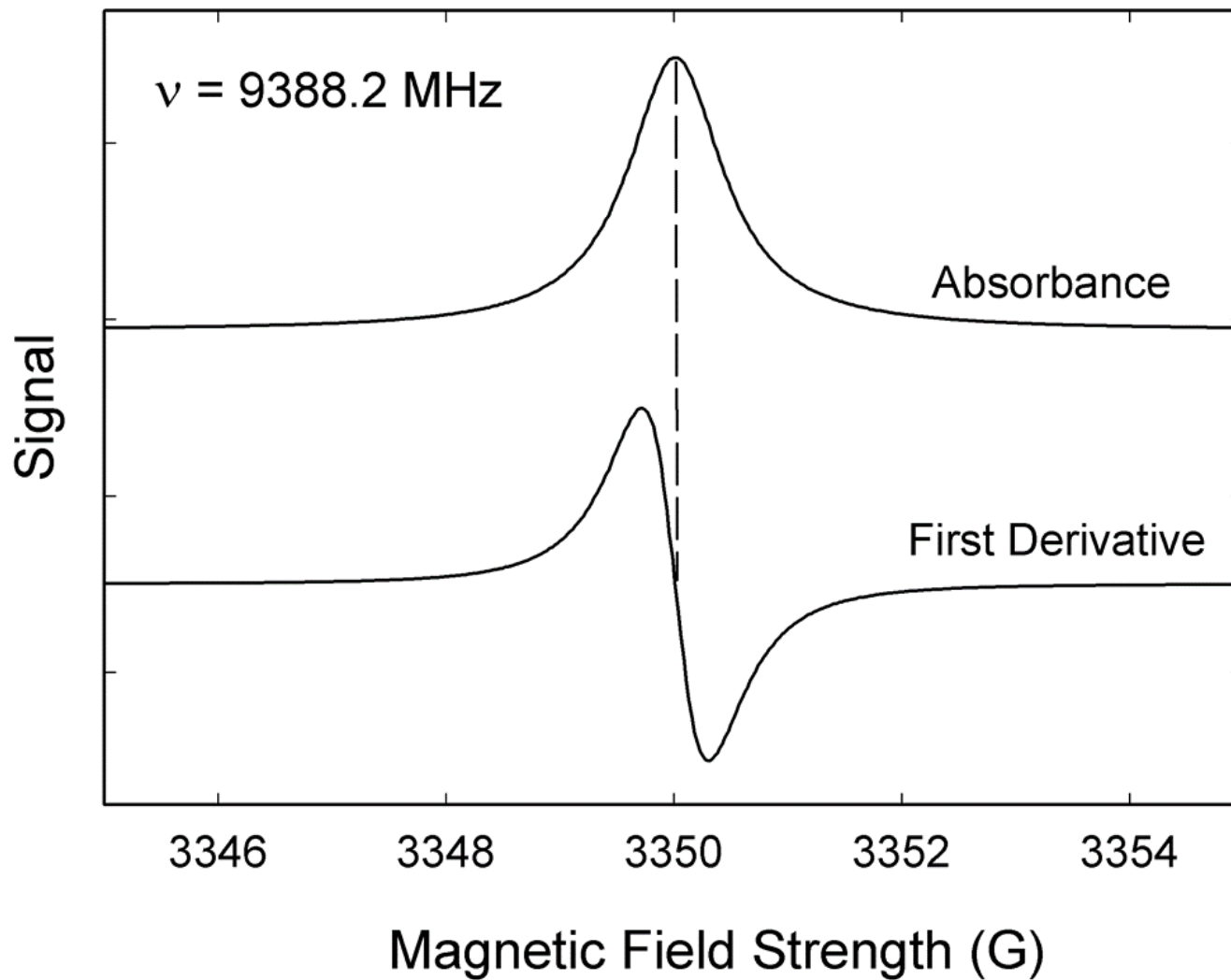
EPR

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

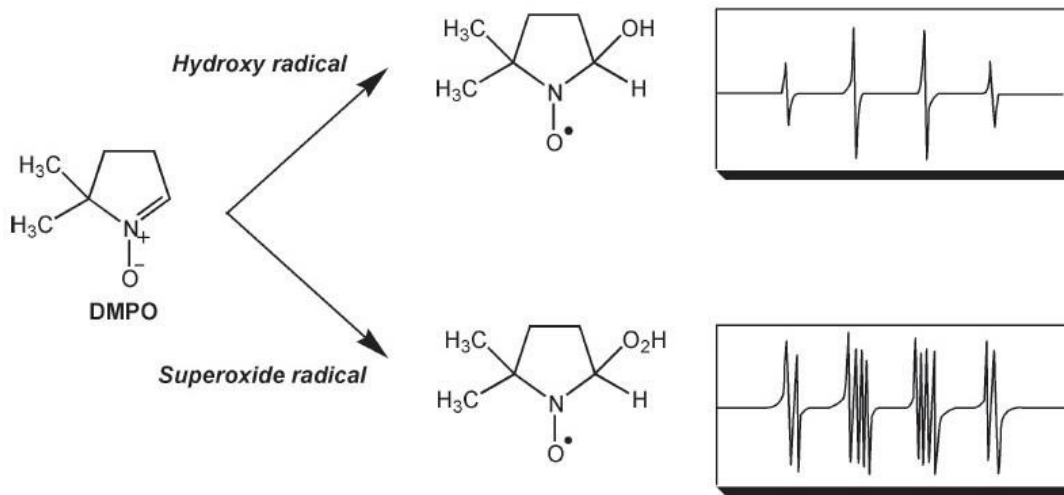


Fig. 1 ESR spectra of DMPO adducts

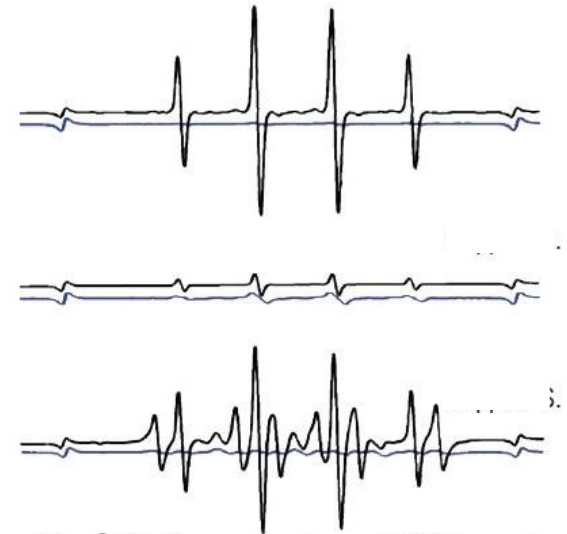


Fig. 2 Purity comparison of ESR spectra

EPR

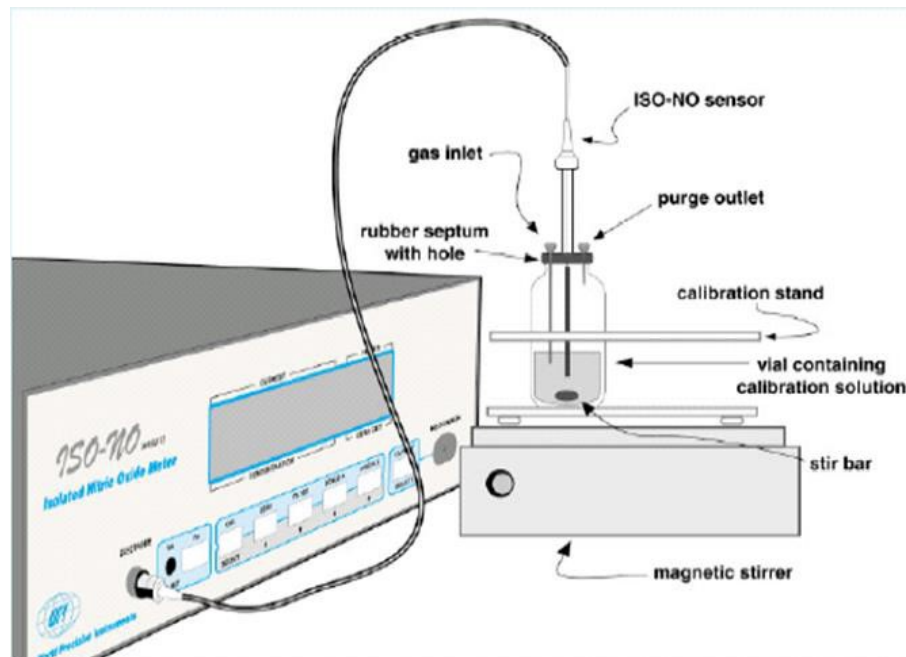


Spektrometrie

- **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