

Imunologie cvičení 6

Metody sledování antioxidantů

MVDr. Mgr. Monika Dušková, Ph.D.

Oxidační stres

Reaktivní kyslíkové a dusíkové radikály fyziologicky slouží k destrukci patogenů a regulačním procesům např. ve stěnách cév aj.

Při jejich nadprodukci (která může být prospěšná pro likvidaci patogena) může však docházet k **oxidativnímu poškození vlastních buněk a tkání**.

Radikály napadají biomolekuly: lipidy, nukleové kyseliny a proteiny a způsobují změny jejich struktury, což se odráží na změně funkce těchto molekul.

V případě lipidů hovoříme o lipidové peroxidaci a lipidy jsou častým a důležitým cílem oxidativního poškození.

V organismu existují **přírozené antioxidační mechanismy**, které eliminují riziko oxidačního poškození

Antioxidanty

Konkurují jiným potenciálně oxidovatelným substrátům a tím je chrání před poškozením radikály

Enzymatické:

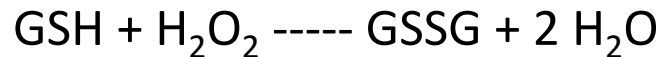
superoxid dismutáza SOD - přeměňuje superoxidový radikál na peroxid vodíku

kataláza CAT - rozkládá peroxid vodíku

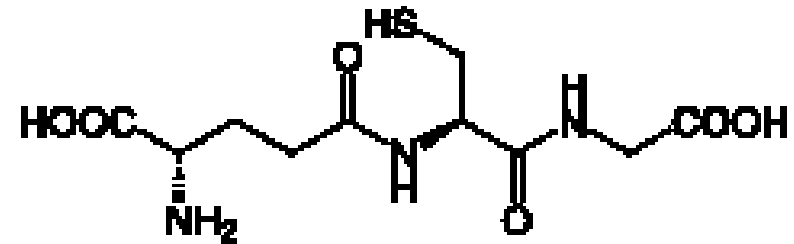
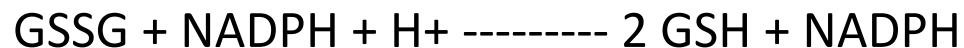
glutathion peroxidáza GPX – rozkládá peroxid vodíku na vodu za současné oxidace glutathionu

Glutathion: tripeptid glutamylcysteinylglycin. Při oxidaci glutathionu může vzniknout disulfidový můstek mezi dvěma jeho molekulami (vzniklý dimer glutathionu se výstižně označuje GSSG). GSSG je možné redukovat zpět na dvě molekuly GSH:

1) vznik oxidované formy glutathionu (zkr. GSSG)



2) regenerace oxidované formy glutathionu na redukovanou



Antioxidanty

Neenzymatické:

Vitamíny - A, E, C

kofaktory enzymů - koenzym Q10

dusíkaté sloučeniny – kyselina močová

Přírodní barviva – karotenoidy, flavonoidy aj



Stanovení celkové antioxidační kapacity

Stanovuje se v různých biologických vzorcích:

plasma, sérum, hemolymfa, potraviny (mléko, ovocné a zeleninové šťávy apod.)

Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) spektrofotometrická

Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) spektrofotometrická

Total Radical-trapping Antioxidant Parameter (TRAP) luminometrická

Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) fluorescenční

Princip:

ABAP produkuje peroxylový radikál a ten oxiduje fluorescein, který je tímto degradován a přestává svítit.

Pokud jsou ve vzorku antioxidanty, tak vychytají peroxylový radikál, tím je ochráněn fluorescein a může svítit

Jako standard se používá Trolox – jedna molekula Troloxu vychytá dvě molekuly peroxylového radikálu

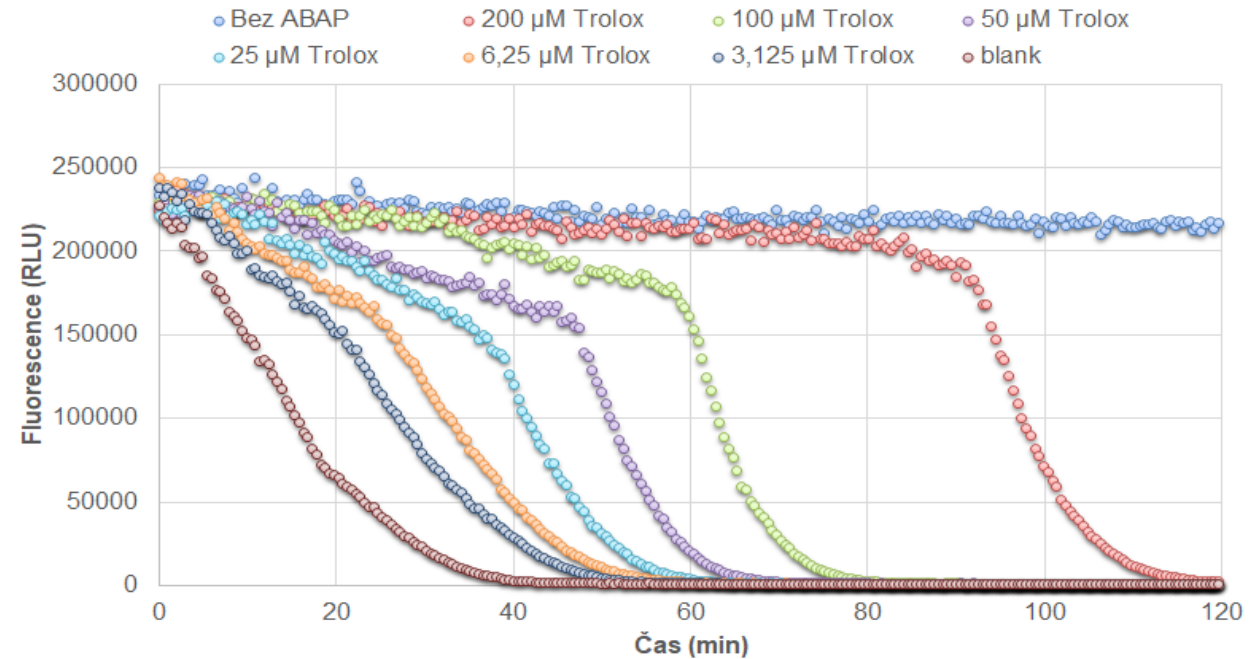
Složky reakční směsi a výstup měření

Do jamek pipetujeme:

Trolox/vzorek/PBS (blank)

Fluorescein

ABAP



Co do výsledků:

1. Kinetický graf závislosti fluorescence na čase pro jednotlivé koncentrace Troloxu (standard)
2. Kinetické grafy pro jednotlivé vzorky
3. Graf závislosti integrálu fluorescence na koncentraci Troloxu a určit rovnici kalibrační přímky
4. Z rovnice kalibrační přímky určit koncentraci antioxidantů ve vzorcích a vyjádřit ji jako mikromoly Troloxu