1 Metody stanovení antioxidantů

Antioxidanty nazýváme látky schopné i v relativně nízkých koncentracích konkurovat ostatním potenciálně oxidovatelným substrátům, a tím oddálit či zcela inhibovat jejich oxidační destrukci. Antioxidanty jsou tedy nezbytné pro udržení redoxní rovnováhy v organismu a zabraňují vzniku oxidačního stresu způsobeného kyslíkovými (ROS) či dusíkovými radikály (NOS), jejichž vznik je popsán v kapitole 4. Fagocytóza. Tyto látky lze rozdělit do dvou skupin – **enzymatické** a **neenzymatické**.
Mezi primární enzymatické antioxidanty (zabraňující tvorbě či přímo likvidující vzniklé volné radikály) patří především **superoxid dismutáza (SOD)**, **kataláza (CAT)** a **glutathion peroxidáza (GPX)**. SOD katalyzuje přeměnu superoxidu na peroxid vodíku a O_2. Takto vzniklý peroxid vodíku následně rozkládá CAT na H_2O a O_2 (především při vysokých koncentracích H_2O_2), nebo GPX za současné oxidace tripeptidu **glutathionu (GSH)** a vzniku H_2O (především při nízkých koncentracích H_2O_2). Takto vzniklý oxidovaný GSH je následně redukován sekundárními enzymatickými antioxidanty, mezi které patří především **glutathion reduktáza** nebo **glukóza-6-fosfát-dehydrogenáza**.
Mezi neenzymatické antioxidanty patří naopak velké množství látek, které lze rozdělit např. na vitamíny, kofaktory enzymů, dusíkaté sloučeniny či peptidy. Nejvýznamnějšími antioxidanty patřící mezi vitamíny jsou **vitamíny A, E a C**. **Koenzym Q10** a jeho redukovaná forma **ubiquinol** jsou antioxidanty patřící mezi kofaktory enzymů. Nejdůležitější dusíkatou sloučeninou s antioxidačním potenciálem je **kyselina močová**. Dalšími důležitými antioxidanty jsou již zmíněný **GSH, melatonin, flavonoidy, karotenoidy či fenolové sloučeniny rostlin**. Většina neenzymatických antioxidantů působí jako redukční činidlo proti většímu množství volných radikálů, nejčastěji proti superoxidovému anionu, peroxidu vodíku, hydroxylovému radikálu, singletovému kyslíku či oxidu dusnatému.
Oxidační stres je příčinou mnoha závažných onemocnění jako jsou nemoci kardiovaskulárního systému či rakovina. Tato onemocnění jsou jedním z nejčastějších příčin úmrtí ve vyspělých zemích a jejich prevence formou správné životosprávy či dostatečného přísunu pro člověka esenciálních antioxidantů je tedy klíčová.

Existuje několik metod, které se využívají pro **stanovení celkové antioxidační kapacity** v biologických vzorcích (plazma, sérum, mléko apod.). Tato stanovení reflektují aktivitu všech potenciálních antioxidantů obsažených ve vzorku. Vzhledem k tomu, že se *in vivo* mechanismy účinku jednotlivých antioxidačních molekul významně liší, není možné celkovou antioxidační kapacitu zcela objektivně změřit jen jednou metodou, ale je potřeba kombinovat metod více. Je možné využít metod spektrofotometrických, fluorescenčních nebo luminometrických:

Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

Jedná se o **spektrofotometrickou** metodu využívající tmavě modrý oxidant ABTS●- vznikající oxidací kyseliny 2,2´-azinobis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonové) ($ABTS^{2-}$) persulfátem draselným. Vzniklý tmavě modrý roztok je naředěn etanolem či pufrem na $OD_{734} = 0,7$ a následně je k němu přidán vzorek o různých koncentracích či **Trolox** (kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboxylová) jako antioxidační standard. Koncentrace vzorku dávající stejnou procentuální změnu absorbance roztoku jako 1mM Trolox je považována za TAEC.

Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP)

Tato metoda patřící také mezi **spektrofotometrické** využívá redukčního potenciálu antioxidačních látek v působení na tripyridyltriazin železitý (Fe^{III}-TPTZ), který je za nízkého pH redukován na svou železnatou formu (Fe^{II}) spolu s tvorbou intenzivního modrého zbarvení. Změna absorbance po přidání vzorku je měřena při 593 nm a výsledky jsou následně porovnávány proti změně absorbance standardního roztoku železnaté formy TPTZ. Jedna jednotka FRAP je definovaná jako redukce 1 mol Fe^{III} na Fe^{II}.

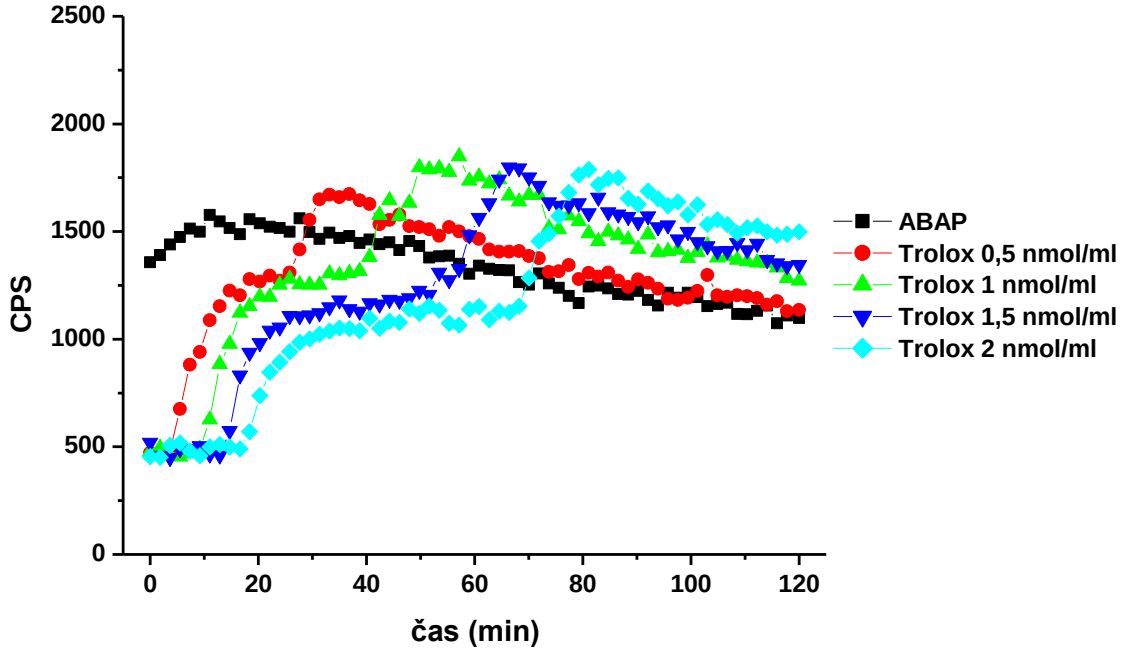
Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

Významnou **fluorescenční** metodou pro měření celkové antioxidační kapacity je ORAC. Metoda je založena na měření vychytávání peroxylového radikálu antioxidanty obsaženými ve vzorku. Peroxylový radikál je produkován 2,2-azobis-2-amidinopropan hydrochloridem (**ABAP**) při 37 °C. Zbylé peroxylové radikály, které nejsou odstraněny antioxidanty, dále oxidují fluorescenční próbu

(např. fluorescein), což má za následek úbytek fluorescenčního signálu. K vyhodnocení stanovení se používá porovnání plochy pod křivkou fluorescenčního signálu (integrálu), kdy plocha blanku je nižší než plocha vzorku obsahujícího antioxidanty, nebo se porovnávají křivky vzorků s křivkami standardu (např. výše zmíněný Trolox).

Total Radical-trapping Antioxidant Parameter (TRAP)

TRAP je nejpoužívanější **luminometrickou** metodou. Tuto metodu lze využít pro stanovení celkové antioxidační kapacity v nejrůznějších biologických vzorcích, jako je např. krev nebo plazma obratlovců, hemolymfa hmyzu, rostlinné extrakty a další. Stejně jako ORAC je i TRAP založen na termální dekompozici látky **ABAP**, která při 37 °C produkuje stálou hladinu peroxylového radikálu. Peroxylový radikál dále oxiduje **luminol**, který produkuje chemiluminiscenční signál měřený luminometrem. Pokud je do reakce přidán vzorek obsahující antioxidanty nebo **Trolox** (antioxidační standard), peroxylové radikály jsou těmito látkami vychytávány až do doby, než jsou všechny antioxidanty vyčerpány. Poté začne oxidace luminolu a chemiluminiscenční signál skokově naroste.
Pro hodnocení se používají různé koncentrace Troloxu (viz obrázek níže), z jejichž reakčních křivek se následně vytvoří kalibrace. Z křivek Troloxu i vzorku se odečítá čas potřebný k dosažení nejvyššího bodu křivky (píku). Podle rovnice regrese kalibrace se pak dopočítá antioxidační kapacitu vzorku vyjádřená jako odpovídající koncentrace Troloxu v nmol/ml.



Obr. X.1: Kalibrační křivky Troloxu a reakční křivka produkce ROS látkou ABAP.

ÚLOHA X: Stanovení antioxidační kapacity metodou ORAC

Chemikálie a roztoky:

- PBS (Roztok A: 2,70 g $Na_2HPO_4.12\ H_2O$ rozpuštěno ve 100 ml; Roztok B: 1,18 g $NaH_2PO_4.2H_2O$ rozpuštěno ve 100 ml. Upravit pH pufru na 7,4 přidáváním roztoku B do roztoku A.)
- **Trolox** (6-hydroxy-2,5,7,8,-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid; Mr = 250,29); 400 µM roztok v PBS. Zásobní roztok Troloxu o dané koncentraci je připraven dopředu. Na cvičení ho pouze rozmrazíme a dále naředíme v PBS dvojkovou řadou pro vytvoření kalibrace. **Jedna molekula Troloxu vychytává dvě molekuly peroxylového radikálu.**
- **ABAP** (2,2′-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride; Mr = 271,2); 0,1 M roztok v PBS. Rozpustíme 54,2 mg ve 2 ml PBS a do použití uchováváme při 4 °C. ABAP je nutné připravit vždy čerstvý!
- Fluorescein (Fluorescein sodium salt; Mr = 376,27); 100 nM v PBS. Na cvičení máme připravenou zkumavku s 37 mg fluoresceinu, který rozpustíme v PBS a dále ředíme podle postupu níže. Uchováváme chráněný před světlem a před použitím promícháme!

Měřený vzorek

- sérum nebo plazma obratlovců; hemolymfa hmyzu; jakékoli bezbarvé tekutiny, ve kterých předpokládáme přítomnost antioxidantů (např. zelený čaj)

Přístroje a pomůcky

Fluorimetr, černá plastová 96-jamková destička, 10 ml zkumavky, 50 ml Falkony, Eppendorf zkumavky.

Postup

1. Do zkumavky, ve které máme navážen ABAP, napipetujeme 2 ml PBS a rozmícháme na vortexu. Rozpuštěný ABAP dáme do lednice a pipetujeme jej do jamek až těsně před započetím měření ve fluorimetru.

2. Do zkumavky, ve které máme navážen fluorescein, napipetujeme 10 ml PBS a rozmícháme na vortexu. Vzniklý 10mM zásobní roztok dále 100x ředíme v Eppendorf zkumavce na 100µM (10 µl zásobního roztoku + 990 µl PBS). Nakonec 100µM roztok zředíme ve Falkoně 1000x na pracovní 100nM fluorescein (20 µl zásobního roztoku + 19980 µl PBS).

3. Podle následujícího schématu si připravíme několik ředění Troloxu pro vytvoření kalibrační křivky: 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 a 3,125 µM standard.

Zkumavka	**zásobní**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Koncentrace Troloxu (µM)	**400**	**200**	**100**	**50**	**25**	**12,5**	**6,25**	**3,125**
PBS (µl)	0	100	100	100	100	100	100	100
Přidáváme (µl)	0	100 (ze zásobní zk.)	100 (ze zk. č. 1)	100 (ze zk. č. 2)	100 (ze zk. č. 3)	100 (ze zk. č. 4)	100 (ze zk. č. 5)	100 (ze zk. č. 6)

4. Připravíme si ředění měřených vzorků. Pokud víme, kolik antioxidantů ve vzorcích očekáváme, naředíme vzorky empiricky. V opačném případě přichystáme čtyři testovací ředění 10x, 100x, 500x a 1000x. Celkem budeme potřebovat 20 µl roztoku od každého ředění.

5. Do jamek na černé destičce napipetujeme po 10 µl standard Trolox v duplikátech (použijeme připravené zkumavky 1 až 7), PBS jako blank bez antioxidantů a jednotlivé vzorky. Řídíme se následujícím schématem uspořádání jamek na destičce:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Trolox 200	Trolox 200	Vz. 1 10x	Vz. 1 100x	Vz. 1 500x	Vz. 1 1000x	9	9	9	9		
B	Trolox 100	Trolox 100	Vz. 2 10x	Vz. 2 100x	Vz. 2 500x	Vz. 2 1000x	10	10	10	10		
C	Trolox 50	Trolox 50	Vz. 3 10x	Vz. 3 100x	Vz. 3 500x	Vz. 3 1000x	11	11	11	11		
D	Trolox 25	Trolox 25	4	4	4	4	12	12	12	12		
E	Trolox 12,5	Trolox 12,5	5	5	5	5	13	13	13	13		
F	Trolox 6,25	Trolox 6,25	6	6	6	6	14	14	14	14		
G	Trolox 3,125	Trolox 3,125	7	7	7	7	15	15	15	15		
H	Blank (PBS)	Blank (PBS)	8	8	8	8	16	16	16	16		

6. Do každé jamky přidáme 170 µl 100nM fluoresceinu. Můžeme přidávat jednotlivě po skupinkách nebo využít multikanálovou pipetu. Destičku po přidání fluoresceinu držíme ve tmě, např. přikrytou alobalem!

7. Zapneme a vytemperujeme fluorimetr na 37 °C (pozor: zahřátí trvá zhruba 20 min, ale bude připraveno vyučujícím před cvičením). Destičku umístíme do fluorimetru a inkubujeme 10 min při 37 °C. V případě potřeby je také možné v době inkubace ověřit fluorescenci na destičce.

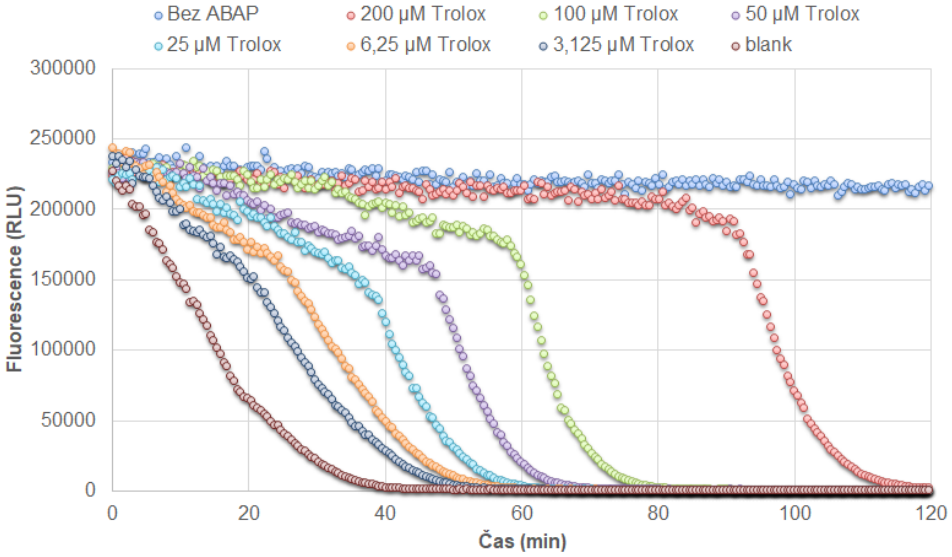
8. Měření bude probíhat při 37 °C po dobu 2 hodin v pravidelných intervalech cca 30 s. Využijeme nastavení pro ORAC s následujícími parametry:

Temperature		37 °C
Kinetics by plate	**Cycles**	nejméně 240
	Interval	30 s
	Shake	No shake
Fluorescence	**Excitační vlnová délka**	460 nm
	Emisní vlnová délka	535 nm
	Flashes	10
	Read mode	Top

9. Do všech jamek napipetujeme 20 µl roztoku ABAP a zapneme měření.

Hodnocení

Pro každou jamku známe hodnoty fluorescence měřené v relativních fluorescenčních jednotkách (RLU) v závislosti na čase a integrál, tj. plochu pod křivkou.



1. Vytvořte křivky závislosti fluorescence na čase pro kalibrace Troloxu a blank. Zvlášť vytvořte grafy, kde budou křivky pro jednotlivé měřené vzorky.
2. Dále počítejte s integrály, které odpovídají celkové antioxidační kapacitě měřeného vzorku.
3. Zprůměrujte hodnoty duplikátů jednotlivých ředění Troloxu a vytvořte kalibrační graf závislosti integrálu fluorescence na koncentraci Troloxu. Z kalibrace vynechte blank, který je již mimo lineární závislost, a zároveň si všimněte, že fluorescence zde ihned klesala. Blank neosahuje žádné antioxidanty, a tak radikály tvořené z ABAP rychle ničí nechráněný fluorescein.
4. Dosazením hodnot integrálu fluorescence vzorků do rovnice kalibrační přímky dopočtěte množství antioxidantů v měřených vzorcích. Nezapomeňte nakonec do výsledku započítat případné ředění vzorků.

Výstup

Do protokolu uveďte grafy závislosti fluorescence na čase a kalibrační přímku závislosti integrálu fluorescence na koncentraci Troloxu.

Podle kalibrace dopočtěte koncentraci antioxidantů v měřených vzorcích a vyjádřete ji jako koncentraci Troloxu v µM. Vypočtené hodnoty uveďte do tabulky.

ÚLOHA X: Stanovení antioxidační kapacity metodou TRAP

Chemikálie a roztoky:

- PBS (3,8 g Na_2HPO_4.12 H_2O rozpuštěno ve 100 ml 0,85% roztoku NaCl); pH 7,4
- **Trolox** (6-hydroxy-2,5,7,8,-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid; Mr = 250,29) o koncentraci **2 nmol/ml**. Roztok Troloxu o dané koncentraci je připraven dopředu a na cvičení ho pouze rozmrazíme. **Jedna molekula Troloxu vychytává dvě molekuly peroxylového radikálu.**
- **ABAP** (2,2′-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride; Mr = 271,2); 400 mM roztok v PBS:

  Rozpustíme 108,48 mg v 1 ml PBS a do použití uchováváme při 4 °C. ABAP je nutné připravit vždy čerstvý!
- luminol (3-aminophthalhydrazide; Mr = 177,16); 10^{-2} M v borátovém pufru. Uchováváme v -20 °C a chráněný před světlem. Před použitím je nutné rozmražený luminol promíchat.

Měřený vzorek

- sérum nebo plazma obratlovců; hemolymfa hmyzu; jakékoli bezbarvé tekutiny, ve kterých předpokládáme přítomnost antioxidantů (např. zelený čaj)

Přístroje a pomůcky

Luminometr, šablona s jednorázovými stripy (plastové mikrojamky), termostat.

Postup

10. Do zkumavky, ve které máme navážen ABAP, napipetujeme 1 ml PBS a rozmícháme na vortexu. Rozpuštěný ABAP dáme do lednice a pipetujeme jej do jamek těsně před započetím měření na luminometru.

11. Podle následujícího schématu si připravíme čtyři ředění Troloxu pro vytvoření kalibrační křivky: 2; 1,5; 1 a 0,5 nmol/ml.

Zkumavka	**zásobní**	**1**	**2**	**3**
Koncentrace Troloxu (nmol/ml)	**2**	**1,5**	**1**	**0,5**
dH_2O (µl)	0	25	100	100
Přidáváme (µl)	0	75 (ze zásobní zkumavky)	100 (ze zásobní zkumavky)	100 (ze zkumavky č. 2)

12. Připravíme si ředění pěti vybraných vzorků: 5x, 10x, 100x, 1000x (k dispozici je pro vzorky celkem 19 jamek, proto nebude nejvyšší ředění jednoho vzorku nakonec použito). Celkem budeme potřebovat 20 µl roztoku od každého ředění.

13. Pipetujeme do jamek v šabloně v pořadí:

PBS	**Luminol**	**vzorek/Trolox/blank** (dest. voda)
160 µl	16,5 µl	20 µl

Schéma uspořádání jamek na destičce:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank (dH_2O)	Trolox 0,5	Trolox 1	Trolox 1,5	Trolox 2	Vz. 1 5x	Vz. 1 10x	Vz. 1 100x	Vz. 1 1000x	Vz. 2 5x	Vz. 2 10x	Vz. 2 100x
B	Vz. 3 5x	Vz. 3 10x	Vz. 3 100x	Vz. 3 1000x	Vz. 4 5x	Vz. 4 10x	Vz. 4 100x	Vz. 4 1000x	Vz. 5 5x	Vz. 5 10x	Vz. 5 100x	Vz. 5 1000x

14. Destičku inkubujeme 10 min při teplotě 37 °C. Mezitím připravíme nastavení luminometru.

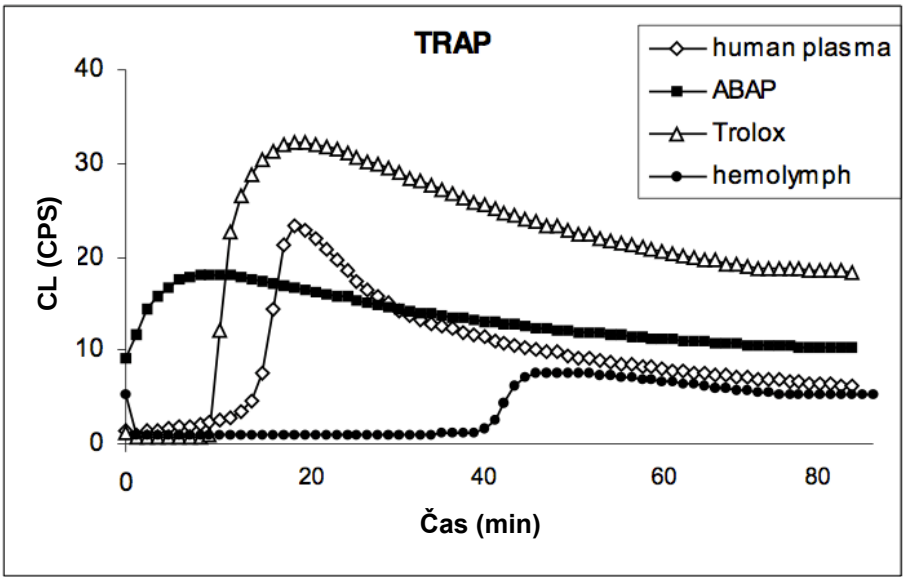
15. Zapneme a vytemperujeme luminometr na 37 °C (pozor: zahřátí trvá zhruba 20 min). Měření bude probíhat po dobu cca 2 hodin a před každým cyklem musí být destička protřepána. Nastavíme tedy následující parametry měření:

Operation mode	Range kinetics	**Shake time**	15
Number of repeats	120	**Shake amplitude**	3
Interval time	54	**Shake mode**	Ranges

16. Do všech jamek napipetujeme 16,7 µl roztoku ABAP a zapneme měření.

Hodnocení

Pro každou jamku známe hodnoty chemiluminiscence v závislosti na čase.



5. Vytvořte křivku závislosti CL na čase pro kalibraci Troloxu, ABAP a všechna ředění vzorků.
6. Z křivek Troloxu a vzorků odečtěte hodnotu maxima CL a čas, kdy tohoto maxima bylo dosaženo (pozor: určuje se pouze, pokud se pík v daném měření objevil; tj. pouze u některých ředění kalibrace a vzorků!).
7. Z hodnot časů maxima jednotlivých koncentrací Troloxu vytvořte kalibrační křivku (závislost času dosažení maxima CL na koncentraci Troloxu).
8. Dosazením hodnot časů maxima CL vzorků do rovnice kalibrační křivky dopočtěte množství antioxidantů v měřených vzorcích.

Výstup

Do protokolu uveďte graf závislosti CL na čase a kalibrační křivku závislosti času dosažení maxima CL na koncentraci Troloxu.

Podle kalibrace dopočtěte koncentraci antioxidantů v měřených vzorcích a vyjádřete ji v nmol Troloxu/ml. Vypočtené hodnoty uveďte do tabulky.