

Bioluminiscence a její praktické využití

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 aplikace v biologii a medicíně

Na principu luminofory zesíleného chemiluminiscenčního stanovení reaktivních kyslíkových metabolitů (RKM) je založeno měření oxidativního vzplanutí fagocytů a antioxidační kapacity biologických tekutin.

Další skupinu tvoří metody založené na reakci ATP s luciferinem katalyzované luciferázou.

Mikroorganismy produkující světlo jako součást svého základního metabolismu jsou využívány v toxikologii.

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Luminometrické metody založené na stanovení RKM

Princip metody

luminol + oxidant \longrightarrow α - aminorftalát + N₂ + světlo (425 nm)

Využití metody

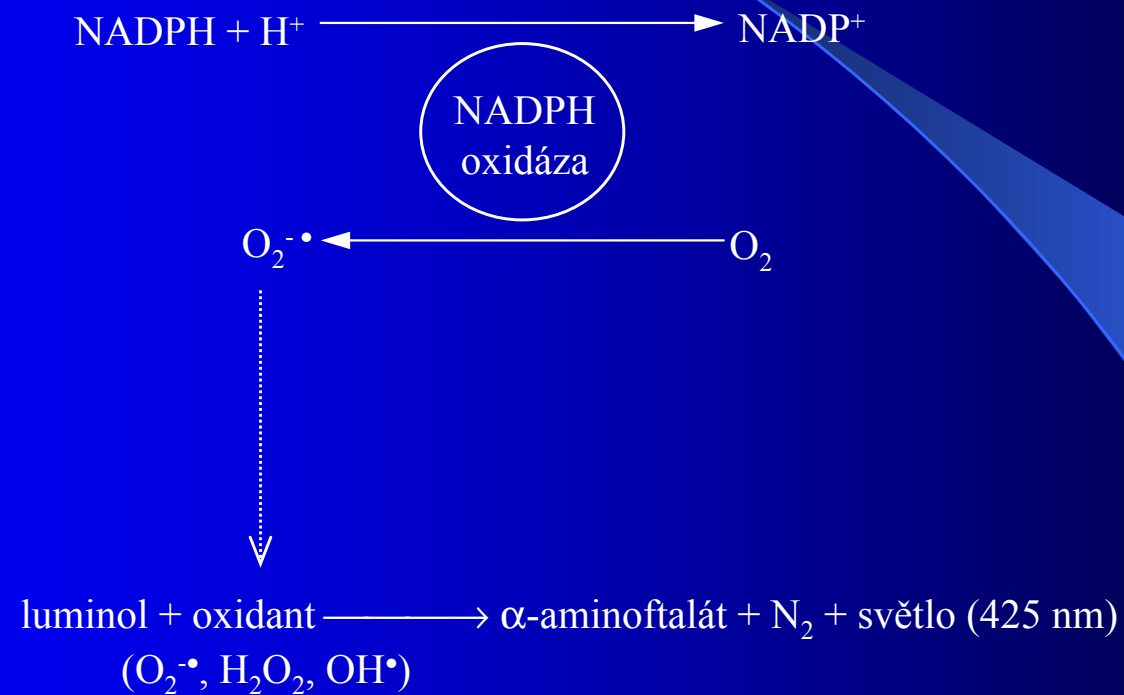
- studium fagocytózy
- měření antioxidačních vlastností (tělních) tekutin

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Studium fagocytózy pomocí chemiluminiscence

Chemiluminiscenční analýza je senzitivní technika, která měří produkci volných kyslíkových radikálů v malých objemech krve (mikrolitry). Použití různých luminoforů umožňuje odlišit jednotlivé radikály, jejich intracelulární a extracelulární tvorbu. Použitím různých aktivátorů a inhibitorů lze sledovat defekty procesu **opsonizace a chemotaxe**, funkčnost NADPH oxidázy a ostatních enzymů spojených s **oxidativním vzplanutím**, expresi a funkčnost různých **buněčných receptorů**.

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně



Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Studium fagocytózy pomocí chemiluminiscence

Materiál

- plná krev
- plasma obohacená o leukocyty (tzv. buffy coat)
- izolované PMNL

Indikace

- imunologie (chronická granulomatóza, nedostatečnost komplementu, defekty chemotaxe)
- hematologie a biochemie (neutropenie, aktivita myeloperoxidázy)
- fyziologie (poruchy opsonizace)
- mikrobiologie (vliv bakteriálních peptidů, buněčných stěn, endotoxinu)
- farmakologie a toxikologie (účinek léčiv a toxických látek)

Oxidativní vzplanutí fagocytů

Aktivátory fagocytů

osponizované částice (OZP)
fMLP
PMA
vápníkový ionofor A23187

Místo působení

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

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Měření antioxidační kapacity biologických tekutin

Reaktivní kyslíkové metabolity jsou tvořeny při tepelném rozkladu vybraných sloučenin. Po přidání vzorku obsahujícího antioxidanty CL signál vymizí, přičemž doba vymizení CL signálu je přímo úměrná antioxidační aktivitě vzorku.

Intra- a extracelulární tvorba RMKD

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

Rozlišení mezi RMK a RMD

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

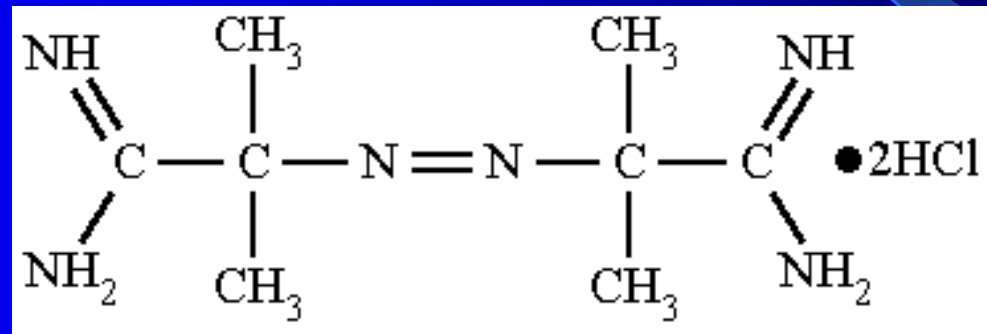
Systemy generující RMKD

- 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

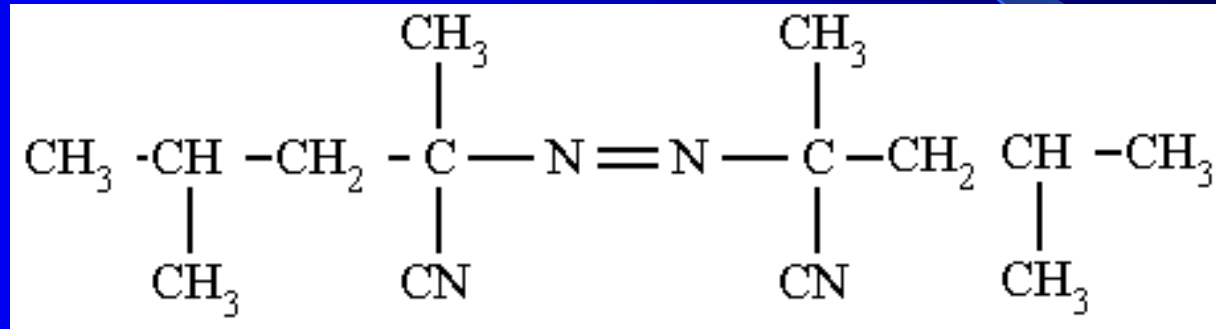
- Total (peroxyl) Radical-trapping Antioxidative Parameter
- stanovení celkové antioxidační kapacity ve vodě rozpustných antioxidantů
- referenční vzorek: trolox

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)

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Měření antioxidační kapacity biologických tekutin

Materiál

- plasma
- sérum
- sliny
- semenná tekutina

Indikace

- riziko oxidativního poškození tkání
- riziko odvržení štěpu po transplantaci

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

