



Department of Free Radical Pathophysiology

Head of the department:

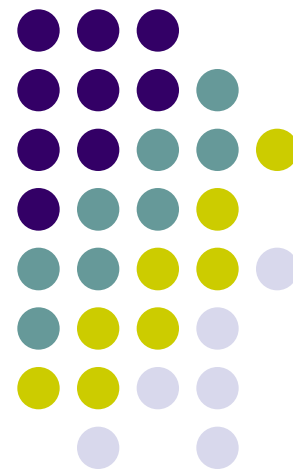
Antonín Lojek

Scientific interest:

- Modulation of mechanisms leading to the generation of reactive oxygen and nitrogen metabolites by phagocytes
- Effects of polyunsaturated fatty acids and products of their peroxidation on the metabolic activity of phagocytes
- Mutual interactions of phagocytes with other cell types and extracellular matrix components
- Antioxidative properties of body fluids, drugs and natural compounds
- Role of myeloperoxidase in the regulation of vascular physiology
- Redox regulation of intracellular signaling
- Role of NADPH oxidases in the physiology of non-phagocytic cells

<i>Parameter</i>	<i>Method</i>
cell numbers	coulter-counter, microscopy
cell viability	spectrophotometry, flow cytometry , microscopy
cell morphology	microscopy
cell cycle	flow cytometry
metabolic activity as a measure of the number of viable cells	spectrophotometry, luminometry
oxidative burst of neutrophils	luminescence, flow cytometry
MPO activity	luminescence, spectrophotometry
NO synthesis	luminescence, flow cytometry, spectrophotometry
total radical-trapping antioxidant parameter	luminescence
individual antioxidants	spectrophotometry
lipid peroxidation	spectrophotometry
surface molecule expression	flow cytometry
activity of specific enzymes	luminometry, spectrophotometry

REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU A DUSÍKU A METODY JEJICH STANOVENÍ



REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU A DUSÍKU



Volné radikály		Látky neradikálové povahy	
Reaktivní formy kyslíku			
Superoxid	$O_2 \cdot^-$	Peroxid vodíku	H_2O_2
Hydroxylový radikál	$HO\cdot$	Kyselina chlorná	$HOCl$
Alkoxylový radikál	$RO\cdot$	Ozon	O_3
Peroxylový radikál	$ROO\cdot$	Singletový kyslík	1O_2
Reaktivní formy dusíku			
Oxid dusnatý	$NO\cdot$	Peroxyinitrit	$ONOO\cdot$
Oxid dusičitý	$NO_2\cdot$	Dusitany	NO_2^-
		Dusičnany	NO_3^-
		Nitrosyl	NO^+

FCE:

- přeměny a uvolňování energie
- enzymatické komplexy
- signalizační molekuly
- mikrobicidní látky

ZABÍJEČSKÉ MECHANISMY FAGOCYTŮ



Acidification	pH= \sim 3.5–4.0, bacteriostatic or bactericidal
Toxic oxygen-derived products	Superoxide O_2^- , hydrogen peroxide H_2O_2 , singlet oxygen $^1O_2^*$, hydroxyl radical OH^* , hypohalite OCl^-
Toxic nitrogen oxides	Nitric oxide NO
Antimicrobial peptides	Defensins and cationic proteins
Enzymes	Lysozyme—dissolves cell walls of some Gram-positive bacteria. Acid hydrolases—further digest bacteria
Competitors	Lactoferrin (binds Fe) and vitamin B ₁₂ -binding protein

Figure 2-6 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

ZDROJE VOLNÝCH RADIKÁLŮ

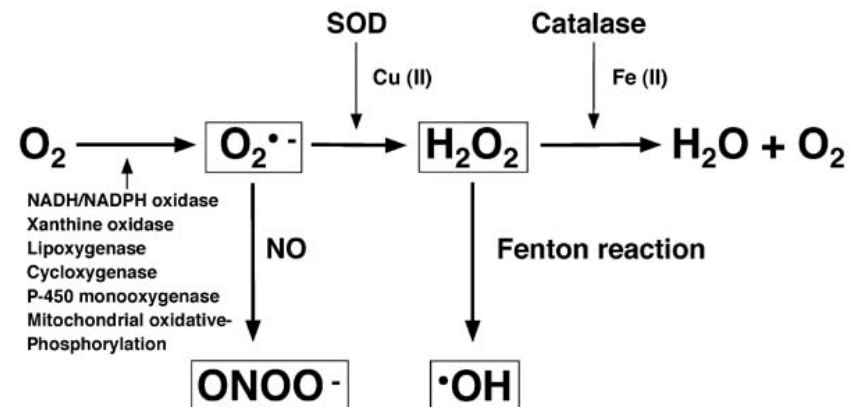


ENDOGENNÍ

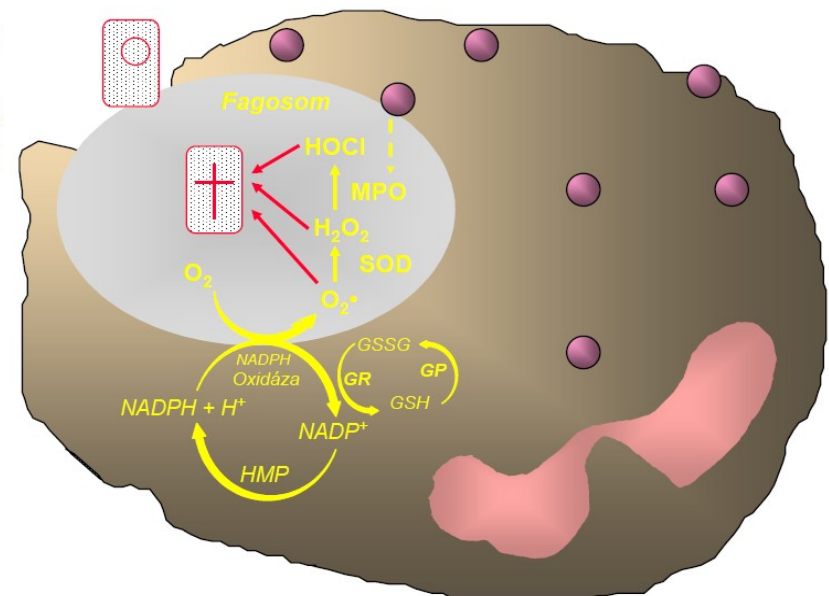
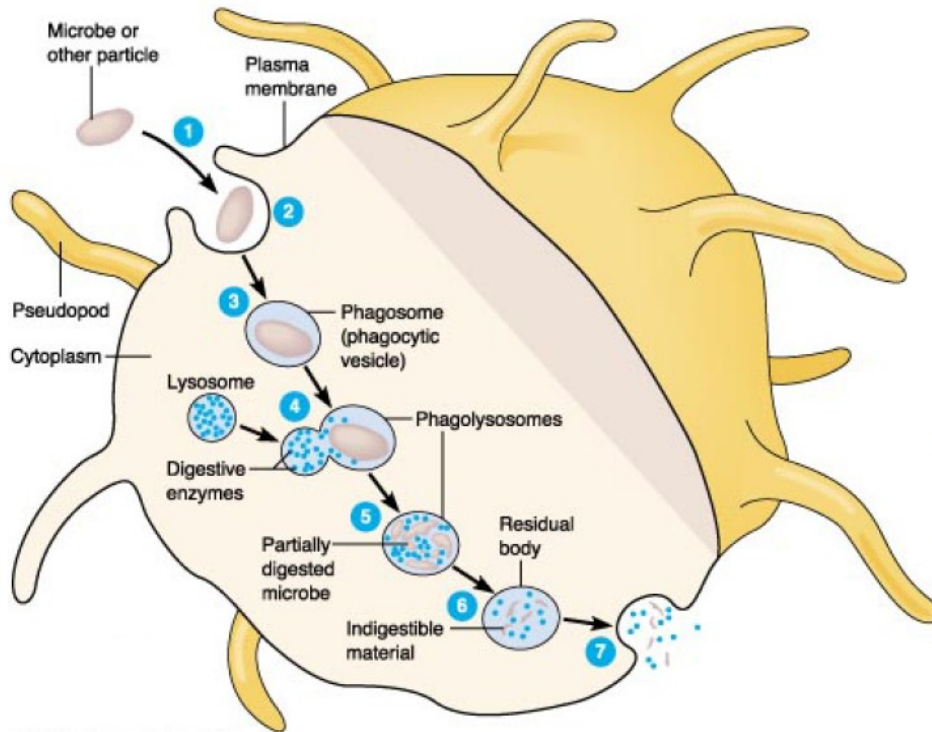
- Enzymatické systémy
 - NADPH oxidáza
 - NOS
 - Peroxidázy
 - Cytochrom P450
 - Xantin oxidoreduktáza
- Autooxidační rce.
- Proteiny obsahující hem
- Elektronový transportní řetězec mitochondrií

EXOGENNÍ

- Složky potravy
- Léčiva
- UV záření
- Ionizující záření
- Znečištěné prostředí



FAGOCYTÓZA A OXIDATIVNÍ VZPLANUTÍ



OXIDAČNÍ STRES A POŠKOZENÍ BIOMOLEKUL



- vznik > odbourávání ROS/RNS >>> oxidační stres

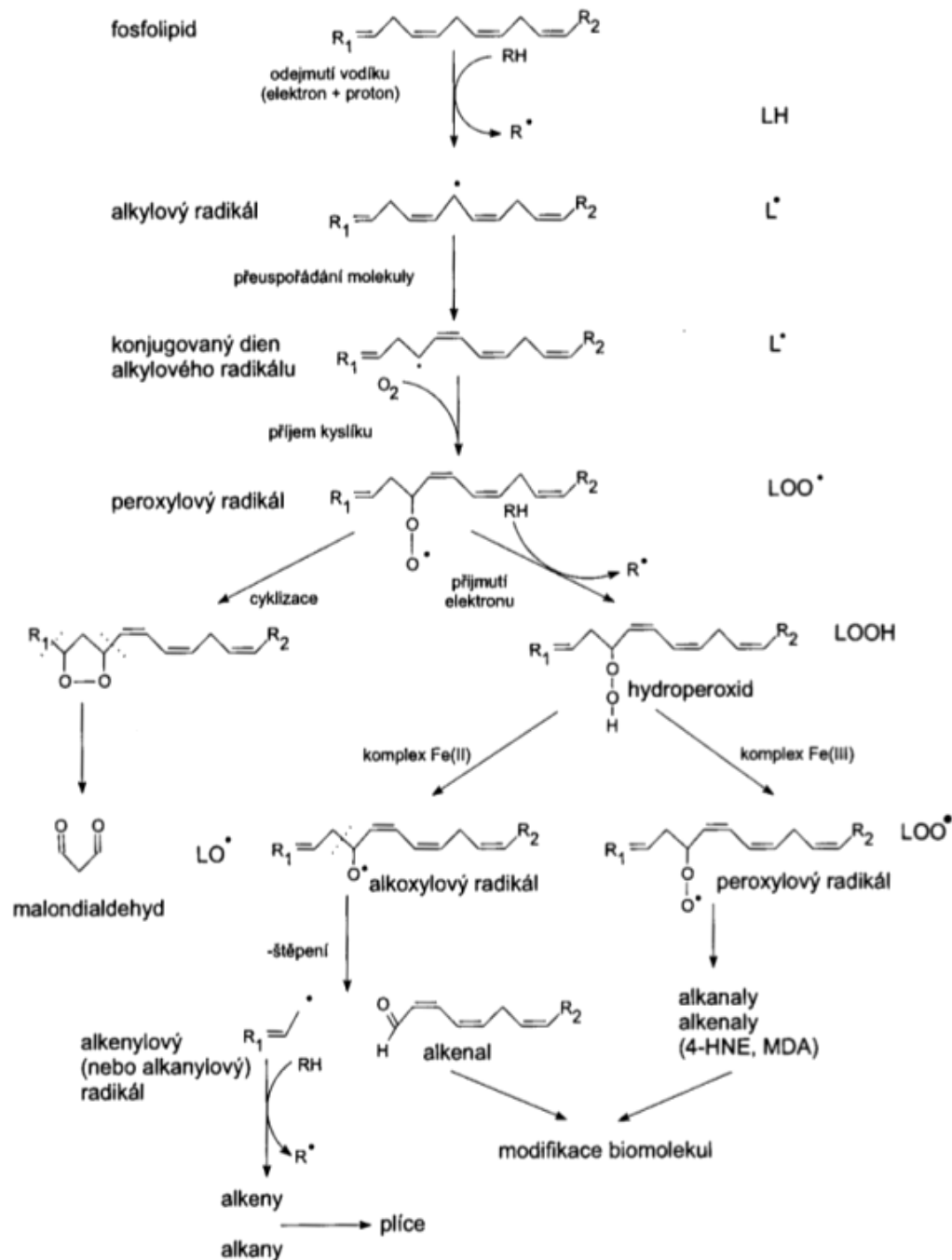
>>> vznik patofyziologických stavů

<i>Cíl</i>	<i>Poškození</i>	<i>Následky</i>
nenasycené mastné kyseliny v lipidech	ztráta dvojných vazeb, tvorba reaktivních metabolitů (peroxydy, aldehydy)	změněná fluidita lipidů, změny v propustnosti membrán, vliv na membránově vázané enzymy, tvorba chemoatraktivních látek pro makrofágy
proteiny	agregace a sífování, fragmentace a štěpení, modifikace thiolových skupin a benzenových jader aminokyselin, reakce s hemovým železem	změny v transportu iontů, vstup Ca^{2+} do cytosolu, změny v aktivitě enzymů
DNA	štěpení kruhu deoxyribózy, modifikace a poškození bází, zlomy řetězce, křížové vazby řetězců	mutace, translační chyby, inhibice proteosyntézy

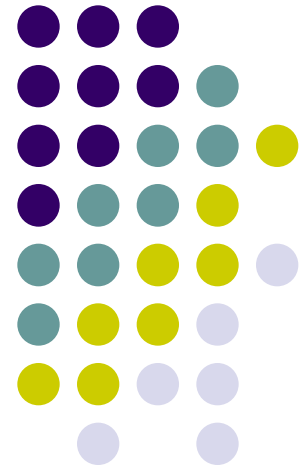
- významné mediátory IS >>> imunitní a zánětlivá onemocnění

LIPIDOVÁ PEROXIDACE

- enzymová
- neenzymová



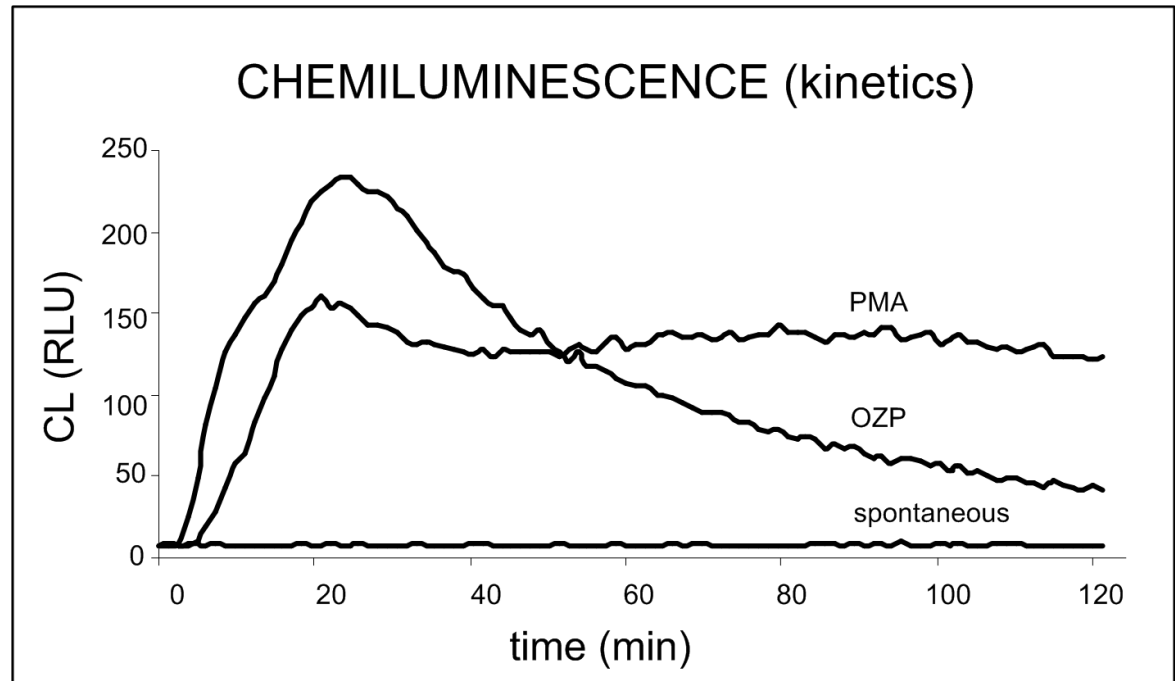
POUŽÍVANÉ METODY DETEKCE



CHEMILUMINESCENČNÍ DETEKCE METABOLICKÉ AKTIVITY FAGOCYTŮ



- přeměna chemické energie na světelnou (fotony):
luminofor + energie → luminofor* → luminofor + světlo
- luminofory:
 - luminol
 - izoluminol
 - lucigenin
 - pholasin
- aktivátory:
 - OZP
 - PMA
 - fMLP
 - Cal
- stimulace LPS

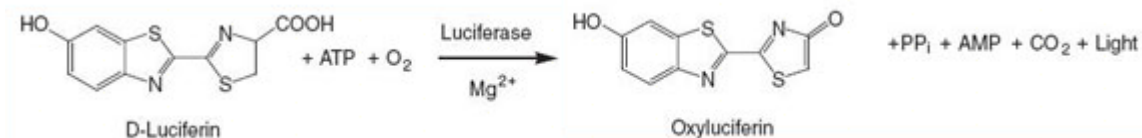


DALŠÍ LUMINOMETRICKÉ METODY



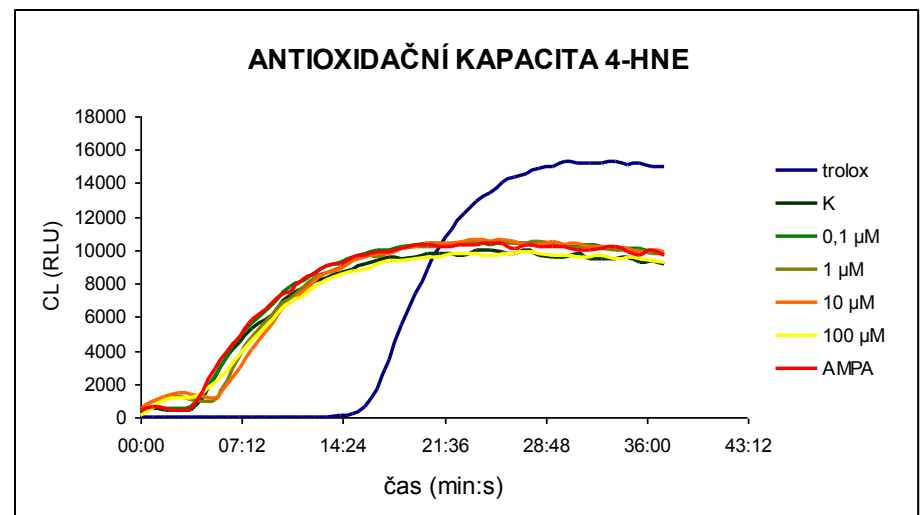
ATP test viability

- kvantifikace buněčného ATP » určení počtu živých buněk



Stanovení antioxidační kapacity metodou TRAP

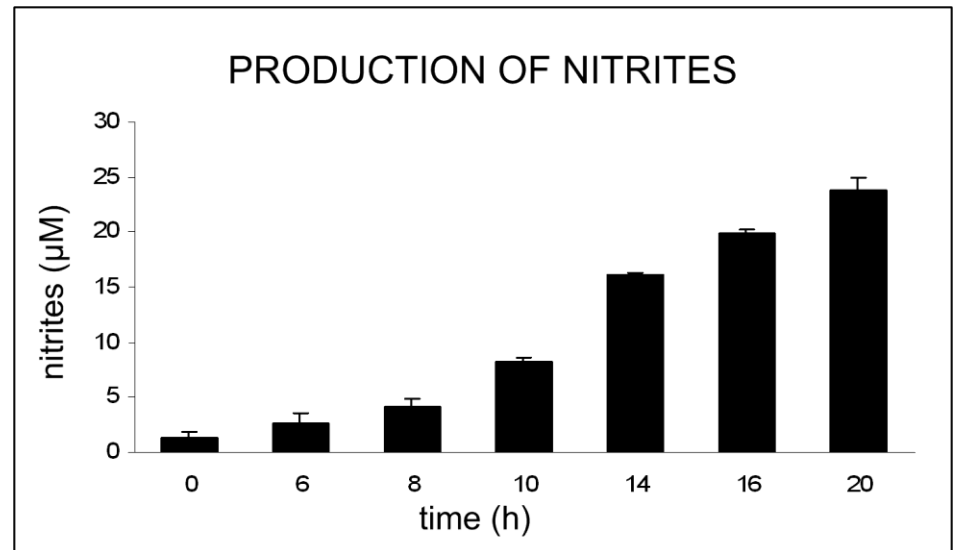
- zjištění schopnosti test. vzorku vychytávat peroxylový radikál vytvořený generátorem AMPA
- standard – trolox



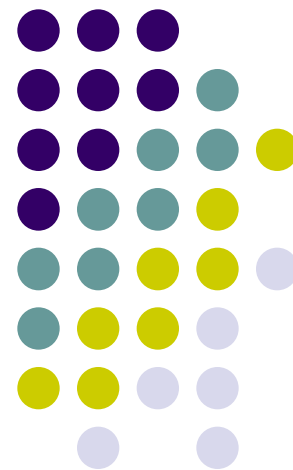
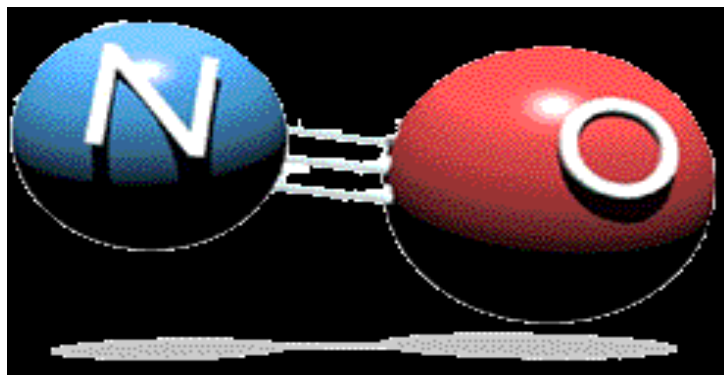
STANOVENÍ KONCENTRACE NITRITŮ GRIESSOVOU METODOU



- spektrofotometrické stanovení nitritů v médiu
 - NO » autooxidace » nitrity, nitráty
 - měření absorbance při 546 nm
 - výpočet koncentrace nitritů z kalibrační křivky
 - stimulace LPS



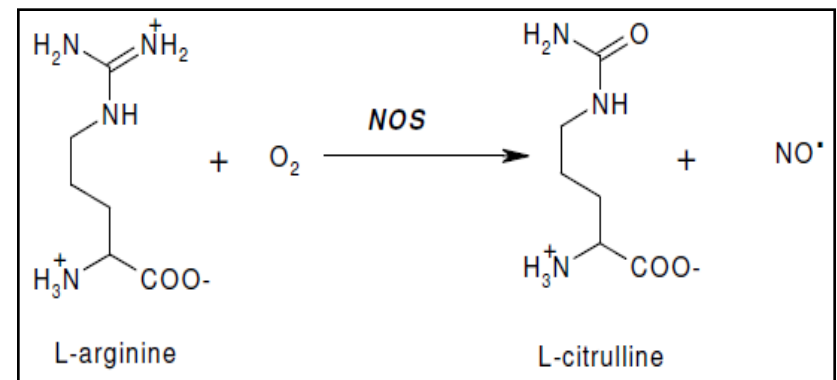
ELEKTROCHEMICKÁ DETEKCE OXIDU DUSNATÉHO



OXID DUSNATÝ



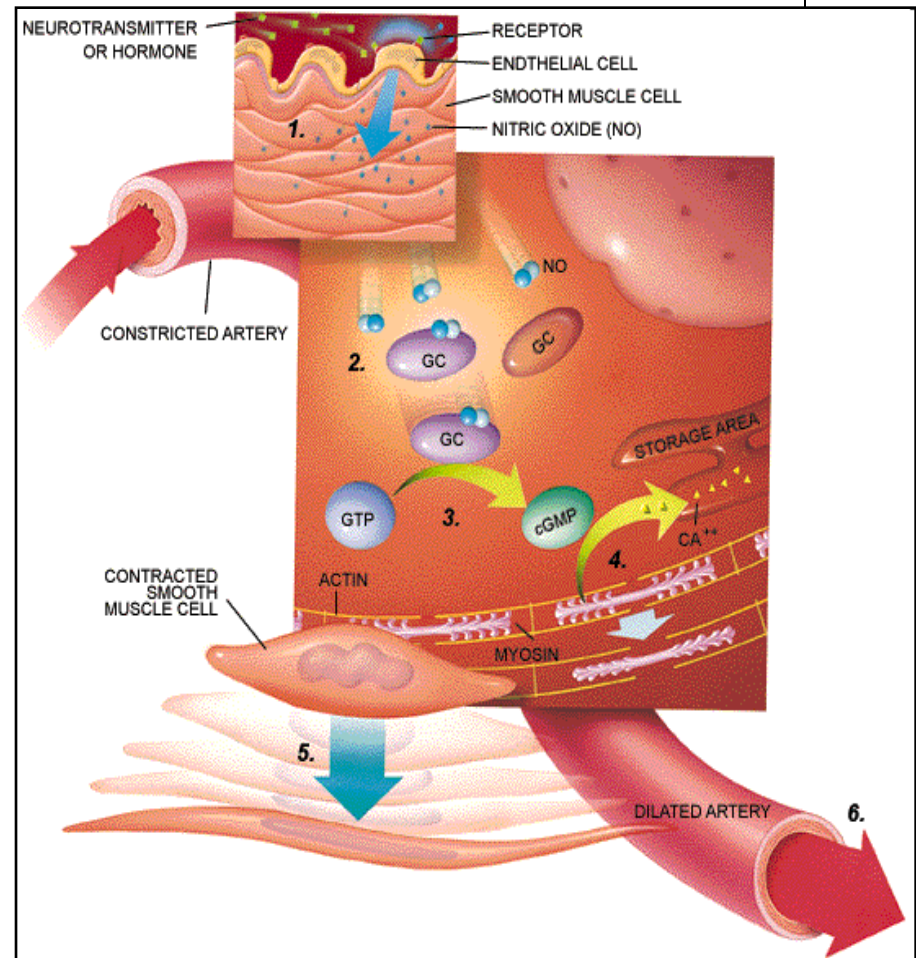
- radikál (lichý počet valenčních elektronů)
- jedna z nejstudovanějších molekul posledních let NC (1998): Furchgott, Ignarro, Murad: za klíčové objevy týkající se úlohy NO v kardiovaskulárním systému
- syntázy oxidu dusnatého:
 - neuronální (nNOS = NOS1)
 - inducibilní (iNOS = NOS2)
 - epiteliální (eNOS = NOS3)



FYZIOLOGICKÝ VÝZNAM NO



- komunikace mezi neurony v mozku
- relaxace cév
 - endothelium-derived relaxing factor (EDRF)
 - (ateroskleróza – nitroglycerin)
- mikrobicidní a zánětlivý mediátor
 - produkce RNS



METODY STANOVENÍ NO A JEHO METABOLITŮ



NEPŘÍMÉ:

Chemiluminiscence

Griessova metoda

Fluorimetrické metody

- stanovení sekundárních metabolitů (nitrity, nitráty)
- selektivita a citlivost
- časová náročnost
- drahé reagensy

PŘÍMÉ:

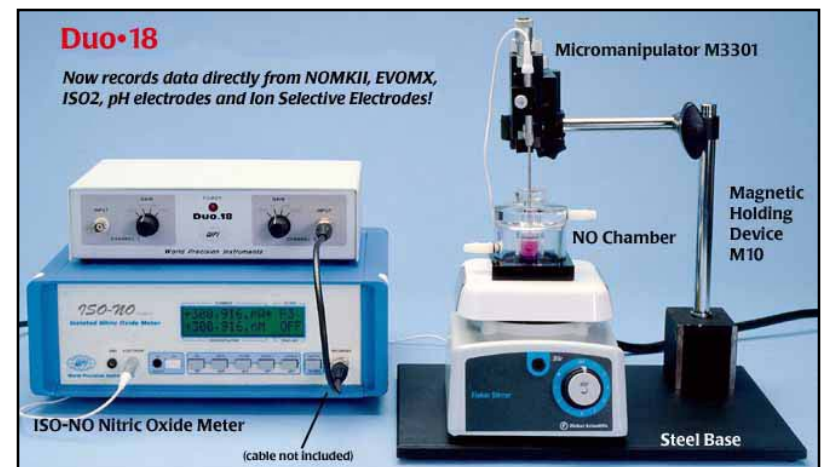
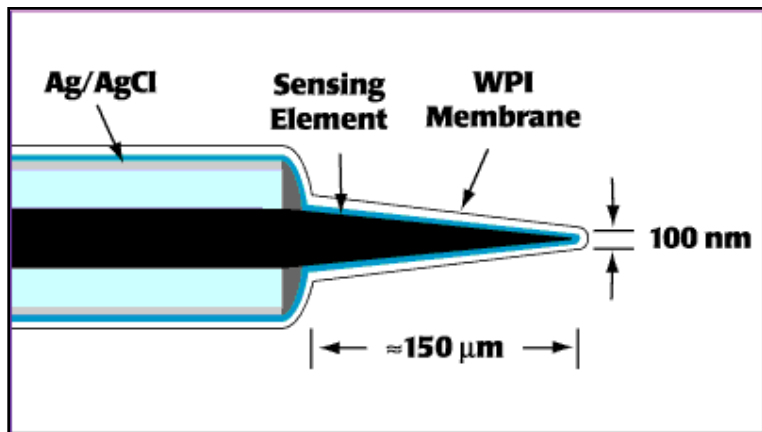
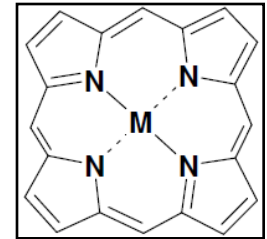
Elektrochemické metody

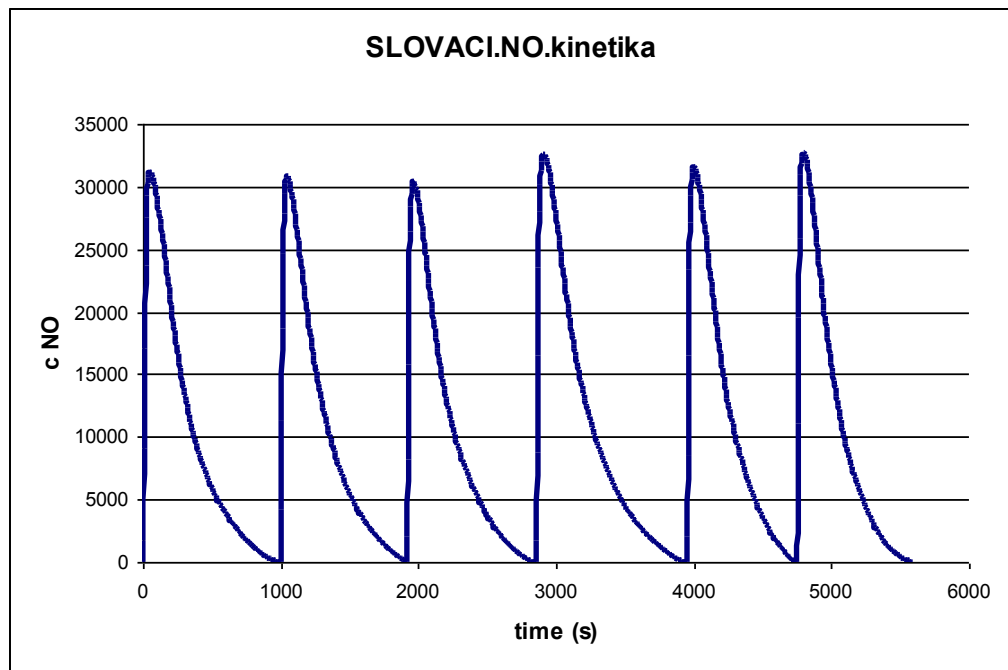
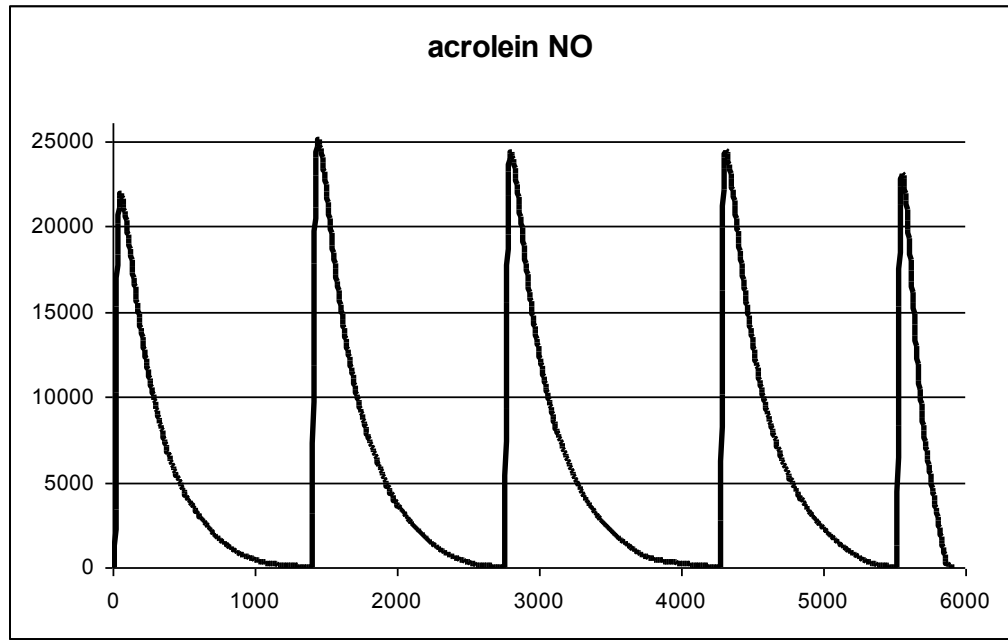
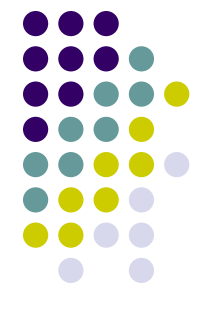
- + přímé stanovení NO
- + selektivita a citlivost
- + minimální spotřeba reagensů
- + jednoduchá kalibrace
- + nízká pořizovací cena
- + stanovení *in vivo*

NO ELEKTRODA



- oxidace NO na povrchu elektrody za vzniku potenciálu (jednoelektronový transfer z NO na elektrodu za vzniku NO⁺)
- povrch elektrody uzpůsoben k vysoké selektivitě a citlivosti k NO
 - polymery metaloporphyrinu a metalophthalocyaninu
 - NO reaguje s centrálním atomem kovu skrze N atom
»» oxidace





DĚKUJI ZA POZORNOST

