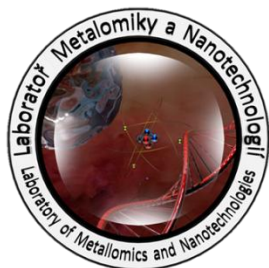




Laboratoř Metalomiky a Nanotechnologií



Monitorování hladiny biochemických markerů, včetně thiolových sloučenin

Ing. Kateřina Tmejová, Ph. D., Mgr. et Bc. Markéta Komínková, Mgr. Natalia Cernei, Ph. D., Mgr. Zbyněk Heger, Ing. Branislav Ruttkay-Nedecký, Ph. D., Ing. Iva Blažková, MUDr. Jaromír Gumulec, Ing. et Ing. David Hynek, Ph. D., Mgr. Ondřej Zítka, Ph. D., Doc. RNDr. Pavel Kopel, Ph. D., Prof. Inf. René Kizek, Ph. D.

ÚVOD

Různé formy kyslíkových radikálů, které se tvoří například při intenzivní činnosti mitochondrií, musí být buňkou zlikvidovány. Pro tyto účely jsou syntetizovány látky, antioxidanty, které podléhají oxidaci namísto důležitých buněčných komponentů. Mezi antioxidanty patří metallothionein a glutathion, které vytvářejí oxidačně redukční prostředí a za určitých podmínek jsou schopni se vzájemně oxidovat či redukovat.

To je důvod, proč působení oxidačních faktorů indukuje expresi MT v buňkách. Z fyzikálního hlediska sem patří například rentgenové záření, což potvrdilo několik studií. U myší, jejichž tělo bylo ozařováno rentgenovými paprsky, byl zjištěn zvýšený výskyt mRNA metallothioneinu I (Shibuya, Satoh et al. 1995).

Je předpokládáno, že MT funguje jako zhášec radikálů či donor zinku enzymům účastnících se opravných procesů.

Nízký redoxní potenciál thiolátového klastru MT umožňuje jeho oxidaci mírnými buněčnými oxidanty, které jsou neustále přítomné v buňce s dynamickou změnou jeho redoxního stavu. Vazba kovu (většinou zinku) je termodynamicky stabilní, ale oxidace thiolátového klastru MT vede k uvolnění kovů a vzniku MT-disulfidu anebo thioninu (dojde-li k uvolnění všech kovů z MT). Redukce MT disulfidu nebo thioninu je možná, pokud jsou k dispozici buněčná redukční činidla jako redukovaný glutathion (GSH) společně se selenem, jako katalyzátorem



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE

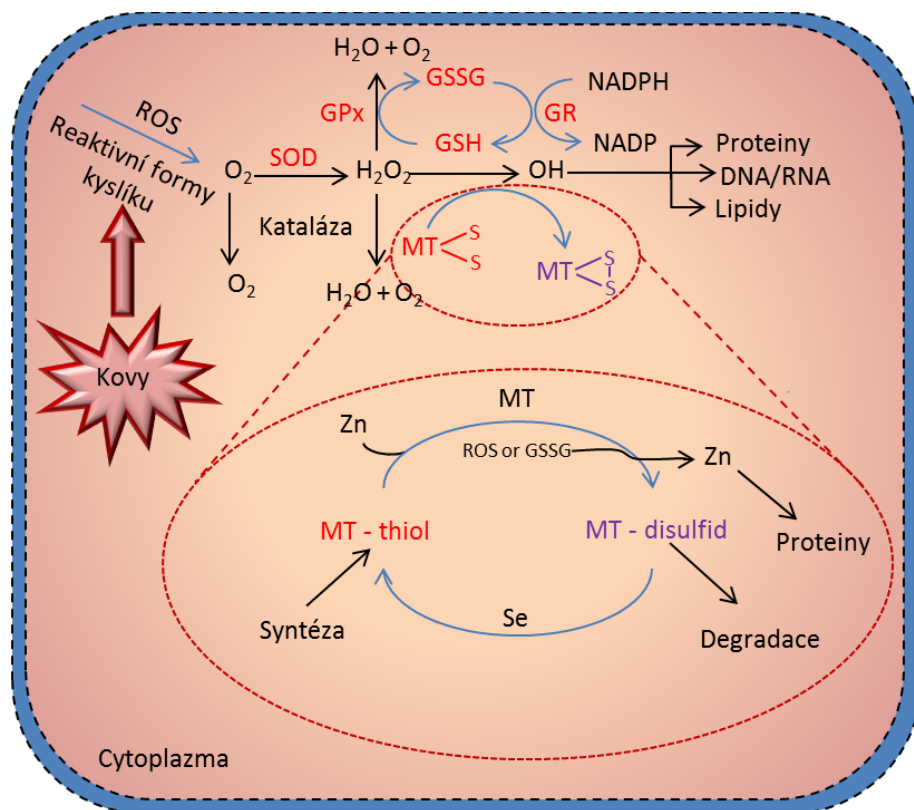


MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Obr. 1: Antioxidační mechanismus v důsledku působení oxidanty.

PRAKTICKÁ ČÁST – měření oxidačního stresu

Popis přístroje BS-400

Byl použit automatický spektrofotometr BS-400 (Mindray, China), který se skládá z kyvetového prostoru (temperovaný na 37 ± 0.1 °C), reagenčního prostoru s karuselem pro reagenty a přípravu vzorků (temperovaný na 4 ± 1 °C) a optického detektoru. Zdrojem světla je halogeno-wolframová žárovka. Přenos vzorků a reagentů zabezpečuje robotické



CZ.1.07/2.3.00/20.0148 NANOLABSYS

Mezinárodní spolupráce v oblasti „in vivo“ zobrazovacích technik

http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/nanolabsys/

rameno s dávkovací jehlou. Obsah kyvet je promíchán

automatickým míchadlem ihned po přidání činidla nebo vzorku o objemu 2 - 45 μ l.

Kontaminace je minimalizována díky proplachování jak dávkovací jehly, tak míchadla MilliQ

vodou. Pro detekci bylo možné využít vlnových délek: 340, 380, 412, 450, 505, 546, 570,

605, 660, 700, 740, 800 nm. Zařízení je plně kontrolováno softwarem BS400 (Mindray,

China).

Stanovení celkových proteinů pomocí Biuretové metody

Principem je reakce peptidové vazby s $\text{Cu}^{(II)}$ v alkalickém prostředí za tvorby modrofialového

zbarvení. Do kyvety bylo napipetováno 150 μ l biuretova činidla (100 mM vinan sodno-

draselný, 100 mM NaOH, 15 mM KI, 6 mM CuSO_4) a následně bylo napipetováno 3 μ l

vzorku. Po 10 min inkubace při 37 $^\circ\text{C}$ byla změřena absorbance při vlnové délce $\lambda = 546$ nm.

Pro výpočet bylo použito hodnoty absorbance samotné reagensie a hodnoty absorbance

po 10 minutové inkubaci se vzorkem.

Stanovení antioxidační aktivity

Výsledek antioxidační aktivity byl vyjádřen jako ekvivalent kyseliny galové.

Sérum/ovoce/tkáň/nápoj mělo celkově takový antioxidační potenciál jako x koncentrace

kyseliny galové. Jednotky jsou v $\mu\text{g/g}$.

Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody ABTS

ABTS metoda je jedním z nejvíce používaných testů na stanovení koncentrace volných

radikálů. Princip stanovení je založen na neutralizaci radikalkationtu vzniklého jedno

elektronovou oxidací syntetického chromoforu ABTS $^\bullet$ (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-

6-sulfonátu) na radikál ABTS $^\bullet$ - e- ABTS $^{++}$. Tato reakce je monitorována

spektrofotometricky, měří se změna absorbance.

Do plastových kyvet bylo pipetováno 150 μ l reagensie R1 (7 mM ABTS $^\bullet$ (2,2'-azinobis 3-

ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina a 4,95 mM peroxodisíran draselný), následně bylo

přidáno 3 μ l vzorku. Absorbance byla měřena při $\lambda = 660$ nm po dobu 12 minut. Pro výpočet



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

bylo použito hodnoty absorbance po přidání vzorku (2. minuta měření) a hodnoty absorbance po 12 minutách.

Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH[•] testu

Principem DPPH testu je schopnost stabilního volného radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu reagovat s donory vodíku. DPPH[•] vykazuje silnou absorpci v UV-VIS spektru. Při tomto testu se po redukci antioxidantem (AH) nebo radikálem (R[•]) roztok odbarví dle následující reakce $\text{DPPH}^{\bullet} + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}^{\bullet}$, $\text{DPPH}^{\bullet} + \text{R}^{\bullet} \rightarrow \text{DPPH-R}$. Do plastových kyvet bylo pipetováno 150 μl reagensie R1 (0,095 mM 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl- DPPH[•]), následně bylo přidáno 15 μl měřeného vzorku. Absorbance byla měřena 12 minut při $\lambda = 505 \text{ nm}$. Pro výpočet bylo použito hodnoty absorbance samotné a hodnoty absorbance po 12 minutách.

Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody DMPD

Sloučenina DMPD (N,N-dimethyl-1,4-diaminobenzen) je působením železité soli v roztoku převedena na relativně stabilní a barevnou radikálovou formu DMPD^{•+}. Sloučeniny s antioxidační aktivitou jsou schopny DMPD^{•+} radikály zhaset a tím dochází k odbarvení roztoku a poklesu absorbance při $\lambda = 505 \text{ nm}$. Do plastových kyvet bylo pipetováno 160 μl reagensie R1 (200 mM N, N-dimethyl-p-fenylendiamin-DMPD, 0,05 M FeCl₃, 0,1 M acetátový pufr pH 5,25), následně bylo přidáno 4 μl měřeného vzorku. Absorbance byla měřena 12 minut při $\lambda = 505 \text{ nm}$. Pro výpočet bylo použito hodnoty absorbance samotné a hodnoty absorbance po 12 minutách.

Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody Free Radicals

U této metody je využíváno schopnosti chlorofylinu (sodno-mědnatá sůl chlorofylu) přijímat a odevzdávat elektrony za současné stabilní změny absorpčního maxima. Tento děj je podmíněn alkalickým prostředím a přidávkem katalyzátoru. Do plastových kyvet bylo pipetováno 150 μl reagensie R1 (extrakt chlorofylinu, reakční pufr, katalyzátor) a následně bylo přidáno 6 μl vzorku. Absorbance byla měřena 12 minut při $\lambda = 450 \text{ nm}$. Pro výpočet bylo použito poslední hodnoty měření.



Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody FRAP

Metoda FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) je založena na redukci železitých komplexů TPTZ (2,4,6-tripyridyl-S-triazin) s chloridem železitým (FeCl_3), které jsou téměř bezbarvé (popř. slabě nahnědlé) a po redukci tvoří modře zbarvený železnatý komplex. Metoda má své limity spočívající v tom, že měření probíhá při nefyziologicky nízké hodnotě pH (3,6) a nejsou zachyceny s komplexem pomalu reagující polyfenolické látky a thioly.

Příprava reagensie: 1. 10 mM roztok TPTZ, doplnit po rysku 40 mM kyselinou chlorovodíkovou (HCl); 2. roztok 20 mM FeCl_3 ; 3. acetátový pufr 20 mM, pH 3,6; tyto tři roztoky se smíchají v poměru TPTZ: FeCl_3 : acetátový pufr – 1:1:10. Reagencie je použitelná týden při uskladnění v temném prostředí a teplotě 4°C. Do plastových kyvet bylo pipetováno 150 μl reagensie a následně bylo přidáno 3 μl vzorku. Absorbance byla měřena 12 minut při $\lambda = 605 \text{ nm}$. Pro výpočet bylo použito hodnoty absorbance samotné a hodnoty absorbance po 12 minutách.

Fotometrické stanovení malonyldialdehydu MDA podle Honga.

Principem stanovení je reakce malonyldialdehydu (MDA) s kyselinou thiobarbiturovou (TBA) za vzniku TBA-MDA-TBA aduktu, který silně absorbuje při 532 nm. Trichloroctová kyselina (TCA) se přidává ke vzorku kvůli její schopnosti srážet proteiny, bilirubin, nenasycené mastné kyseliny a lipoproteiny. K 300 μl vzorku plasmy bylo přidáno 10 μl 0,5 M roztoku butylovaného hydroxytoluenu (BHT) v 96% ethanolu a 310 μl 20% TCA připravené v 0,6 M HCl. Po dvacetiminutovém stání v ledu byla směs centrifugována při 11 000 rpm 15 minut. K 400 μl supernatantu byl přidáno 800 μl 30 mM kyseliny thiobarbiturové TBA a směs byla inkubována v termomixeru při 90°C 30 minut. Po ochlazení v ledě byla absorbance MDA měřena ve spektrofotometru při 535 nm a koncentrace byla odečtena z kalibrační křivky.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

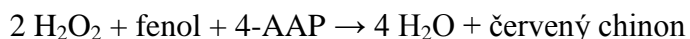
Stanovení glukosy

Enzymatické kolorimetrické stanovení glukózy probíhalo podle následujících reakcí:

GOD



POD



Do plastových kyvet bylo pipetováno 200 μl reagentie (0.1 M fosfátový pufr pH 7.5, 0.75mM fenol, 0,25 mM 4aminoantipyrin (4-AAP), glukózooxidáza $\geq 15\text{kU/l}$, peroxidáza $\geq 1.5 \text{ U/l}$), následně bylo přidáno 20 μl měřeného vzorku. Absorbance byla měřena 10 minut při $\lambda = 505$. Pro výpočet bylo použito hodnoty absorbance samotné reagentie a hodnoty absorbance po 10 minutové inkubaci se vzorkem.

PRAKTICKÁ ČÁST – měření GSH, GSSG

Vzorky byly před analýzou uchovávány při -80°C . Do eppendorfek budou naváženy vzorky rostlin 0,1 g. Tyto vzorky budou rozrušeny působením tekutého dusíku a dále drceny pomocí misky po dobu 2 minut. K vzorku bude vždy přidáno 1 ml fosfátového pufru pH 7 a dále drceno. Následovat bude použití ultrazvukové jehly po dobu 2 min a vortexování 15 min. Takto připravené vzorky. Takto připravené vzorky budou přesunuty do centrifugy a centrifugovány při 4°C , 25000g, 20 min. Supernatant bude rozdělen na alikvoty 1. pro stanovení na spektrofotometrii a 2. pro stanovení na HPLC. Pro HPLC stanovení přidáme 5 % TFA (ředěno z 20%), opět centrifugujeme a supernatant injektujeme do HPLC-ED systému.

Stanovení obsahu GSH, GSSG

HPLC-ED systém byl složen ze dvou chromatografických pump Model 582 ESA (ESA Inc., Chelmsford, MA) (pracovní rozsah $0.001 - 9.999 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) a chromatografické kolony s reverzní fází Zorbax eclipse AAA C18 (150×4.6 ; $3,5 \mu\text{m}$ velikost částic, Agilent Technologies, USA) a dvanácti-kanálového CoulArray elektrochemického detektoru (Model



5600A, ESA, USA). Detektor je složen ze tří průtočných analytických komůrek (Model 6210, ESA, USA). Každá komůrka obsahuje čtyři analytické cely. Jedna analytická cela obsahuje dvě referentní (hydrogen paládiové), dvě pomocné a jednu porézní grafitovou pracovní elektrodu. Elektrochemický detektor je uložen v řídicím modulu, jehož celý prostor je termostatován. Vzorek (20 μ l) byl injektován automaticky pomocí autosampleru (Model 542, ESA, USA), který má v sobě zabudován i termostatovaný prostor pro kolonu. Vzorky byly během analýzy uchovány v karuselu při teplotě 8°C. Kolona byla termostatována na 30°C. Průtok mobilní fáze byl 1 ml.min⁻¹. Mobilní fáze se skládala z A: kyseliny trifluoroctové (80 mM) a B: 100% Met-OH. Látky byly eluovány následujícím lineárně vzestupným gradientem: 0 - 7 min (3 %B), 8 - 15 min (15 %B), 25 min (30 %B), 28 - 33 min (98 %B), 37 - 45 min (3 %B). Detekce separovaných látek probíhala při aplikovaném potenciálu 900 mV. Doba jedné analýzy byla 45 minut.

evropský
sociální
fond v ČR

EVROPSKÁ UNIE

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVYOP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost