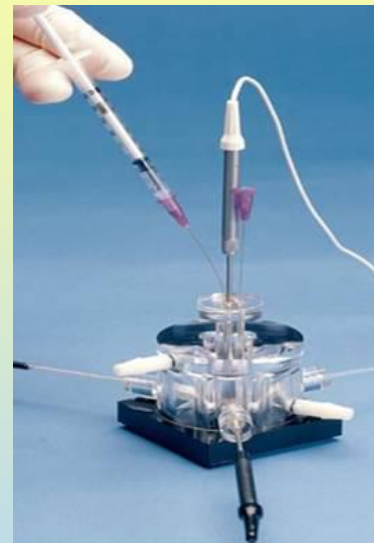
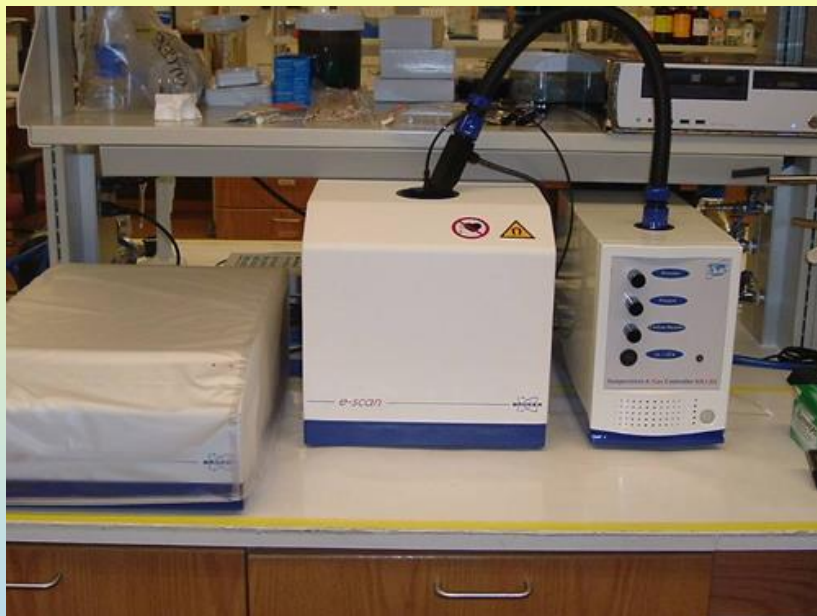


ANTIOXIDANTY A VOLNÉ RADIKÁLY

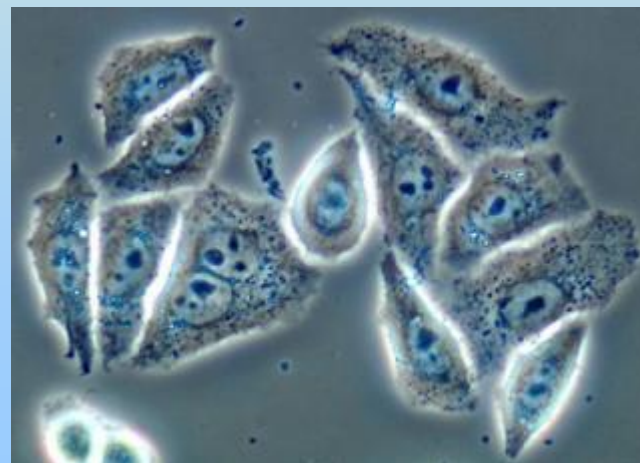
Detekce volných radikálů

Rozdělení metod

- Metody fyzikálně – chemické

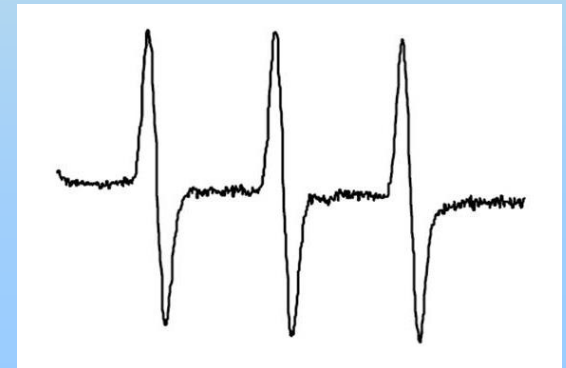


- Metody biochemické
- Metody přímé
- Metody nepřímé

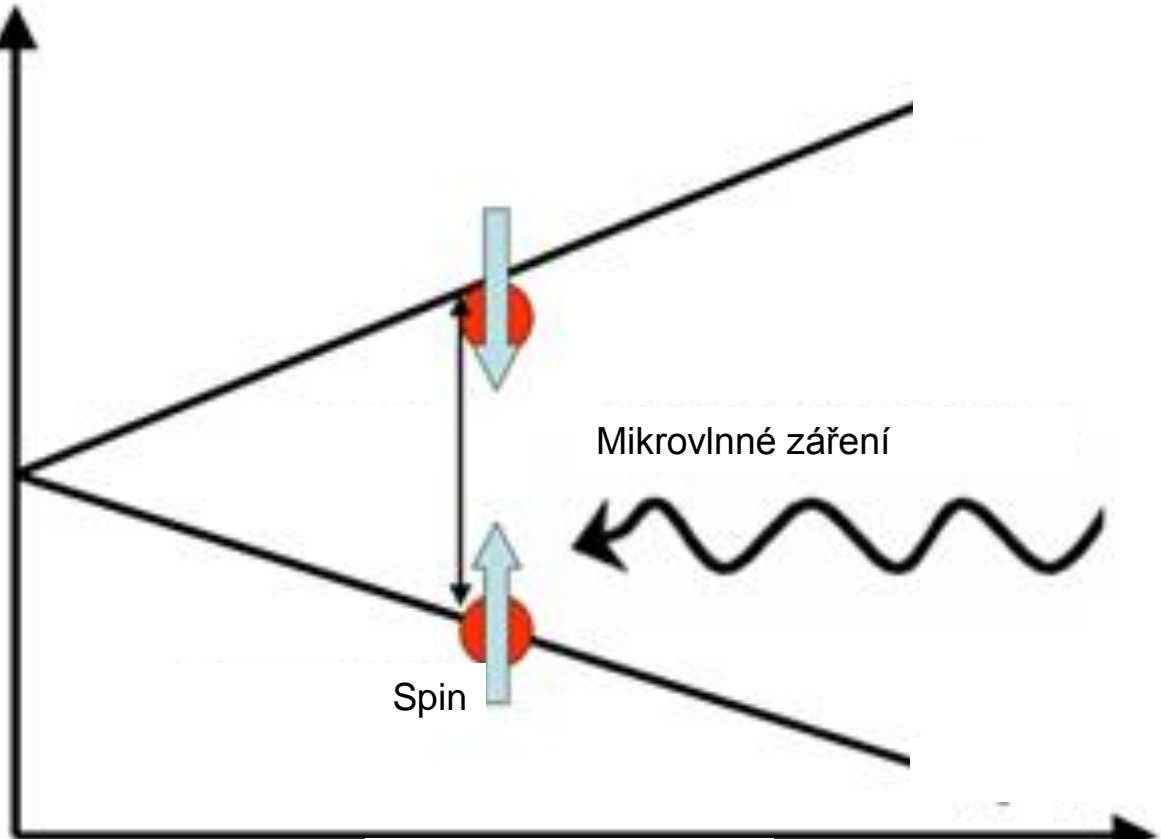


Elektronová paramagnetická rezonanční spektrometrie (EPR, ESR)

- Metoda detekující volné radikály
- Využívá paramagnetických vlastností volných radikálů
- Vzorek je umístěn v silném magnetickém poli a vystaven mikrovlnnému záření
- Nepárový elektron je excitován, změní spin a přejde na základní hladinu emisí fotonu
- Tyto energetické přechody se projeví jako typický signál na osciloskopu



Energie



Mikrovlnné záření

Spin

Magnetické pole

počítač

konsola s
detektorem

zdroj
mikrovlnného
záření

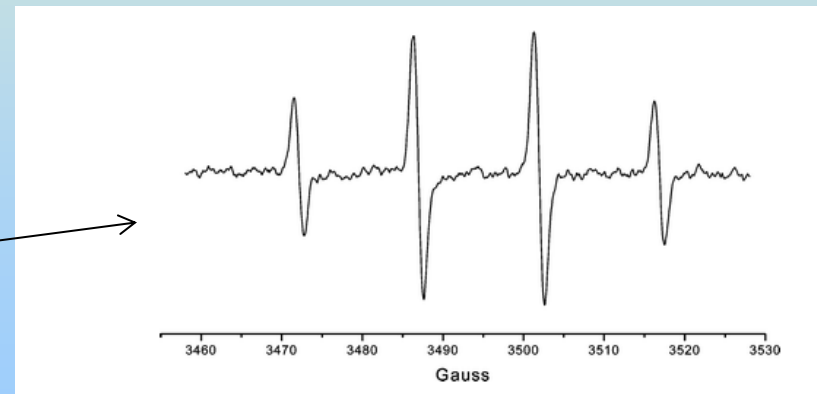
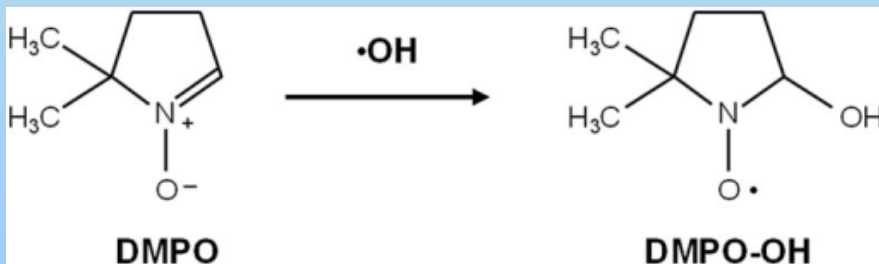


elektromagnety

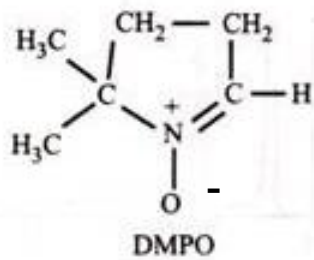
vzorek

Spin trapping

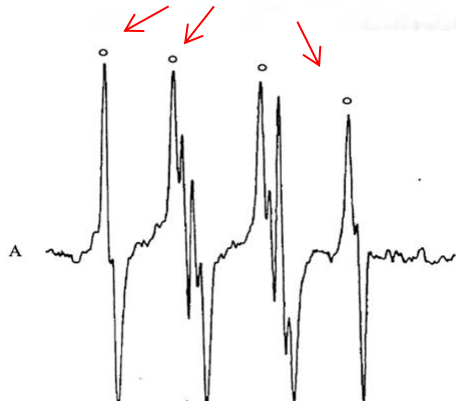
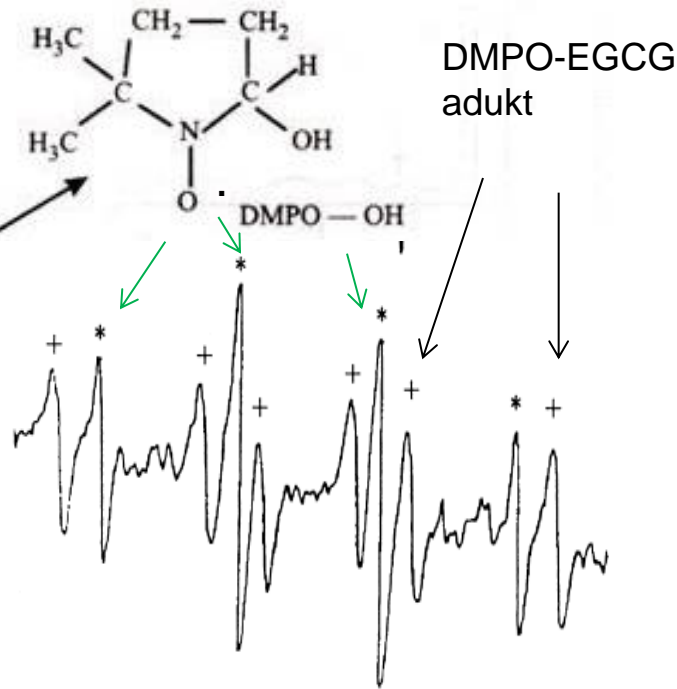
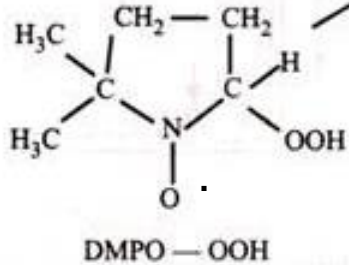
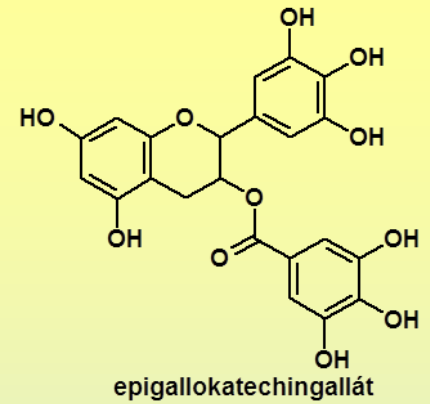
- K prodloužení životnosti radikálů slouží záchyt radikálů do stabilnějšího aduktu s vhodnou sloučeninou
- Nejčastěji se využívá 5,5-dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO) a 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO)
- Lze využít i k detekci biologickém prostředí
- Nevýhodou je jedovatost detektorových látek, nelze užívat v klinice



EPR spektrum aduktu hydroxylového radikálu s DMPO

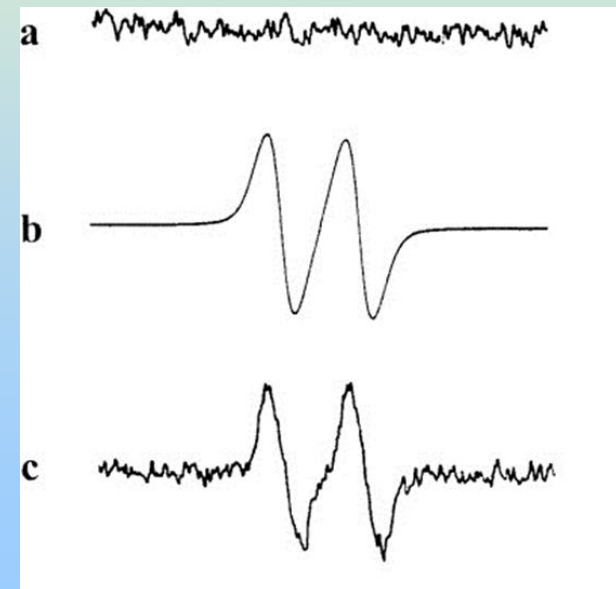


EPR spektrum aduktu superoxidu s DMPO. Adukt s hydroxylovým radikálem se formuje jeho rozpadem. Jeho zhašením vzniká adukt DMPO s EGCG radikálem.



Gue Q. et al.: ESR study on the structure antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. *Biochim. Biophys. Acta* 1427,1999 13-23

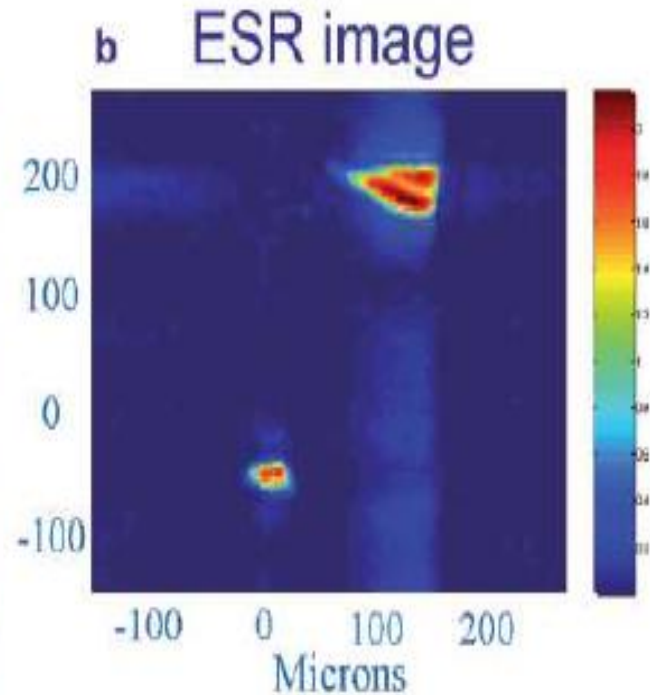
Gunera magellanica Lam.



askorbyl radikál



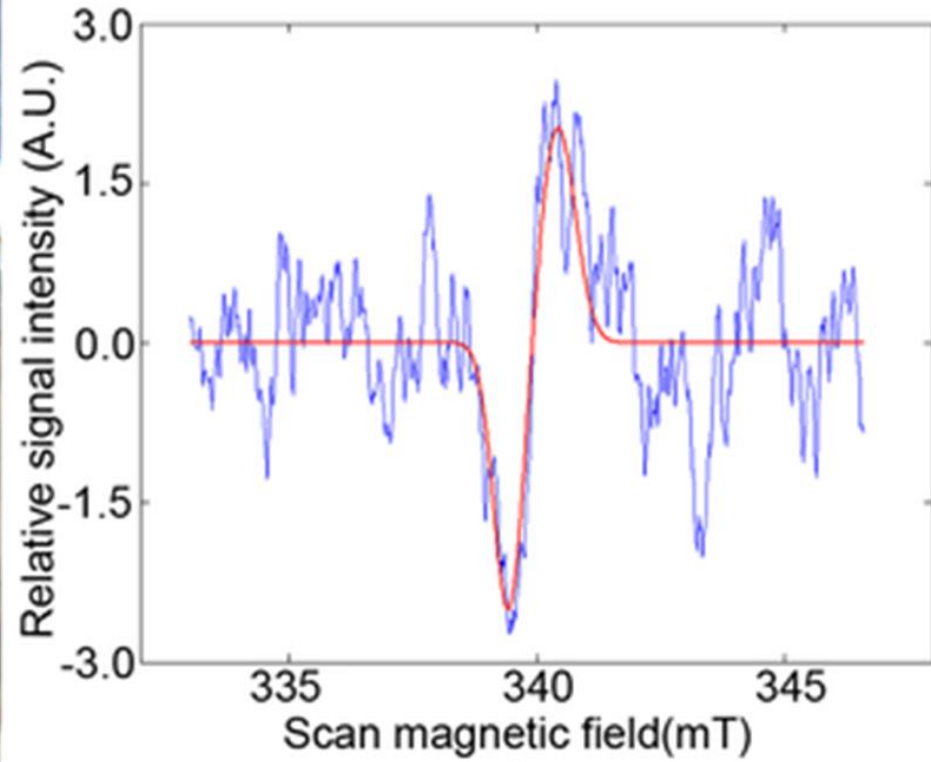
Přímé metody lokalizace oxidačního stresu v organismu



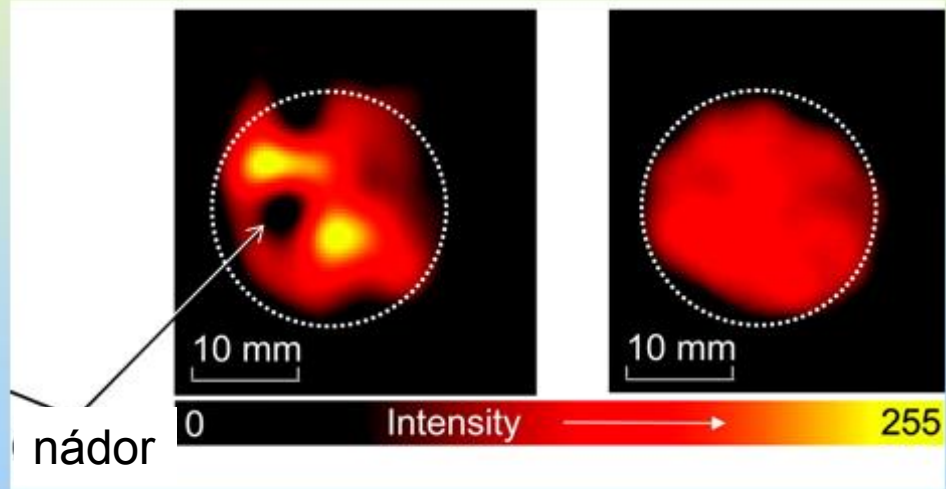
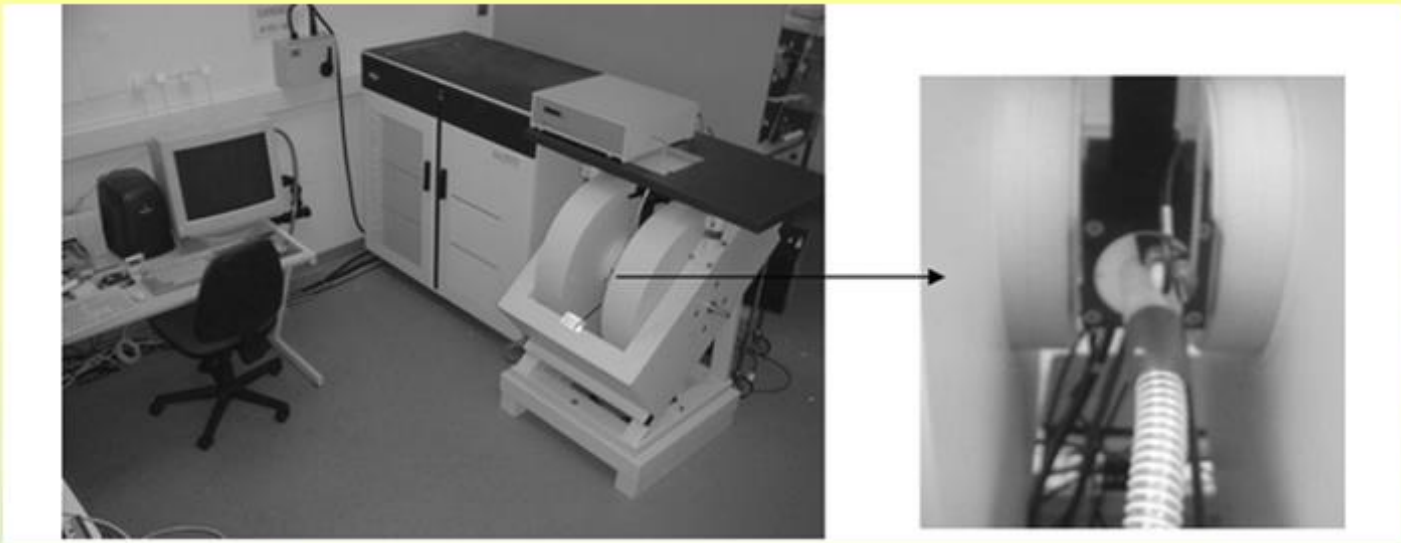
Lohan B.S. et al.: Determination of the Antioxidant Status of the Skin by In Vivo-Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy. *Cosmetics* 2015, 2, 286-301



a



b

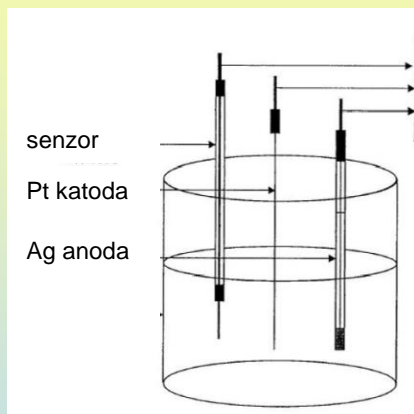


Jackson S. K. et al.: *In vivo* EPR spectroscopy: biomedical and potential diagnostic applications. *Faraday Discuss.* 2004, 126, 103-117

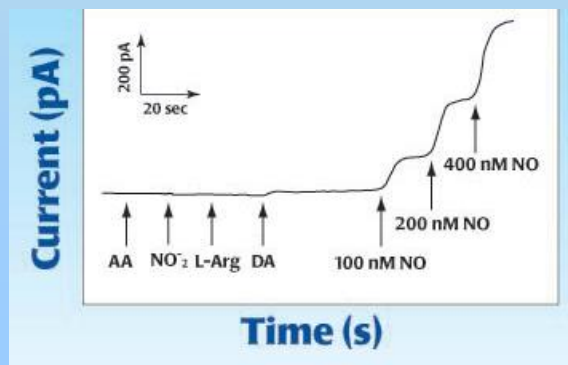
Mikuni T. et al.: *In vivo* Detection of Gastric Cancer in Rats by Electron Paramagnetic Resonance Imaging. *Cancer research* 2004, 64, 6495– 6502.

Elektrochemické měření ROS/RNS

- Elektrochemie se zabývá studiem elektrochemického chování vzorku v závislosti na jeho složení a koncentraci



- Využívají se elektrochemické elektrody – minisenzory
- Lze využít v biologických systémech k detekci RNOS

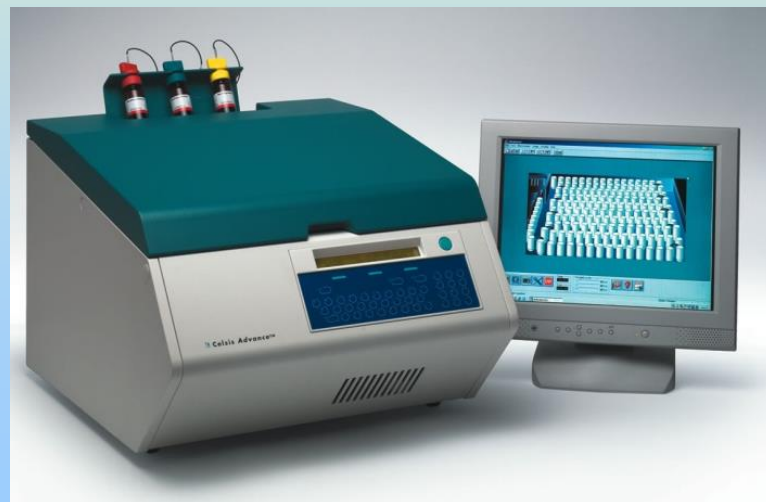


<https://www.wpiinc.com/blog/2013/04/24/videos/how-to-calibrate-an-iso-hpo100/>

<https://www.youtube.com/watch?v=6GzNh0XRfq8>

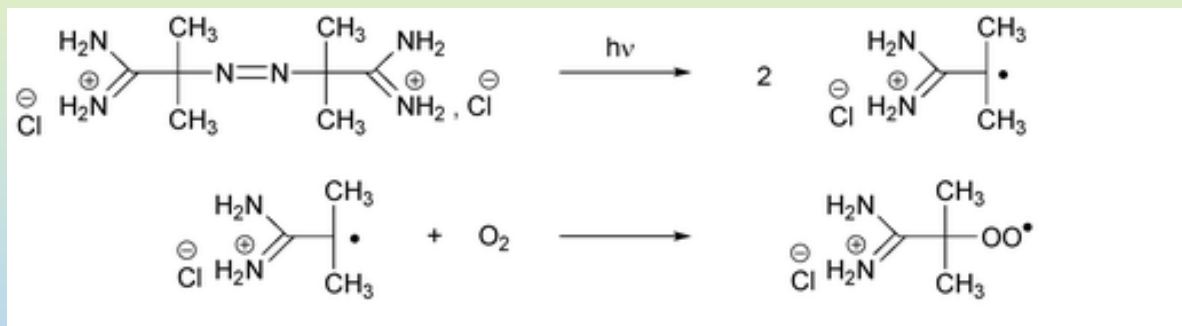
Luminiscenční sledování ROS/RNS

- Luminiscence vzniká excitací atomu a následným návratem do základního stavu, čímž dojde k vyzáření fotonu
- Používá se velmi často v biologickém materiálu
- Existuje celá řada luminoforů pro různé reaktivní formy kyslíku a dusíku
- Detekujeme pomocí luminometrů, fluorescenční mikroskopii nebo elektrochemicky
- Chemiluminiscence
- Fotoluminiscence - fluorescence
- K detekci ROS/RNS a hodnocení antioxidační aktivity látek

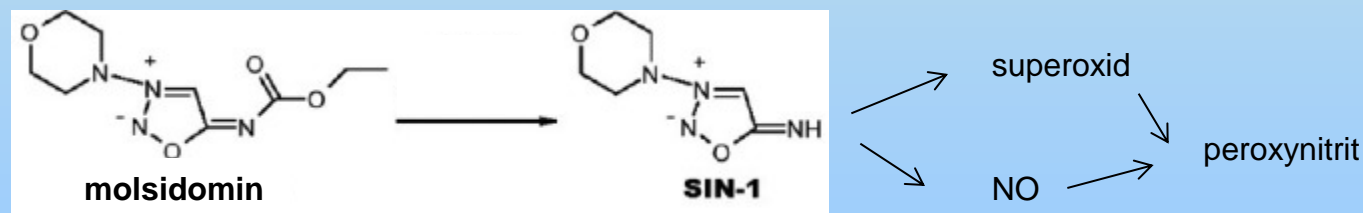


Systemy generující ROS/RNS

- Xanthin/xanthinoxidasa \longrightarrow superoxid
- Peroxid vodíku + přechodné kovy \longrightarrow hydroxyl
- Peroxid vodíku \longrightarrow H_2O_2
- AAPH \longrightarrow peroxy
(2,2'-azo-bis(2-amidinopropan) dichlorid)

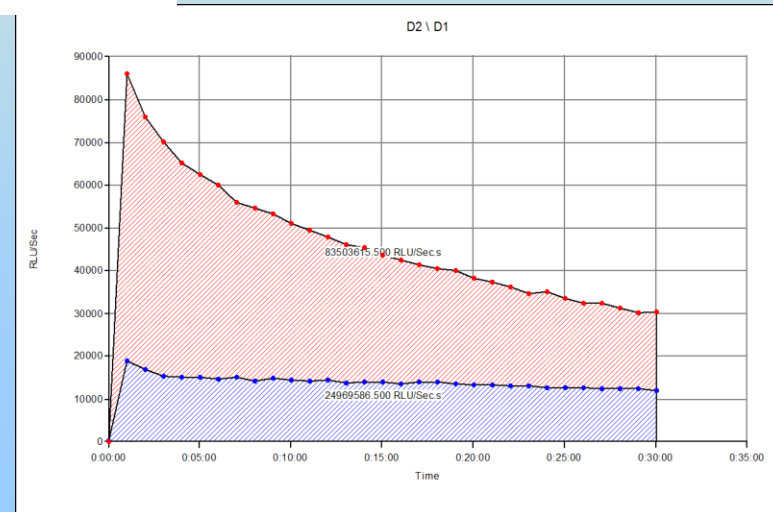
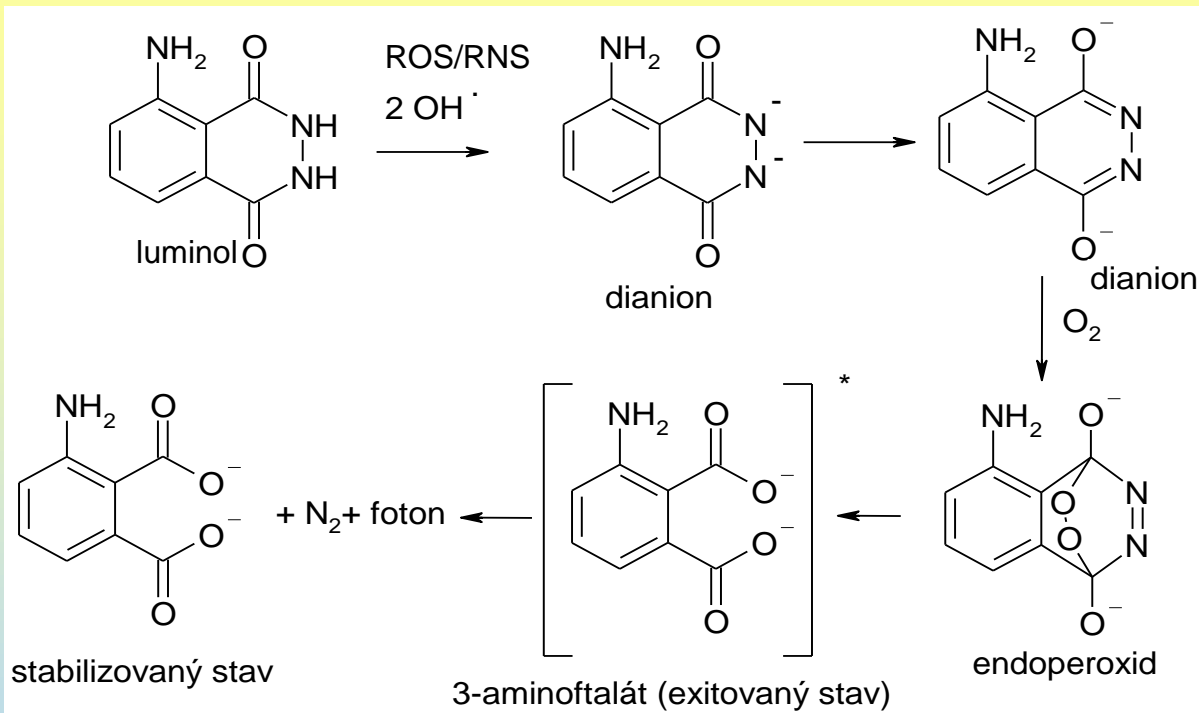


- SIN-1 (3-morfolino-sydnonimin) \longrightarrow peroxyinitrit

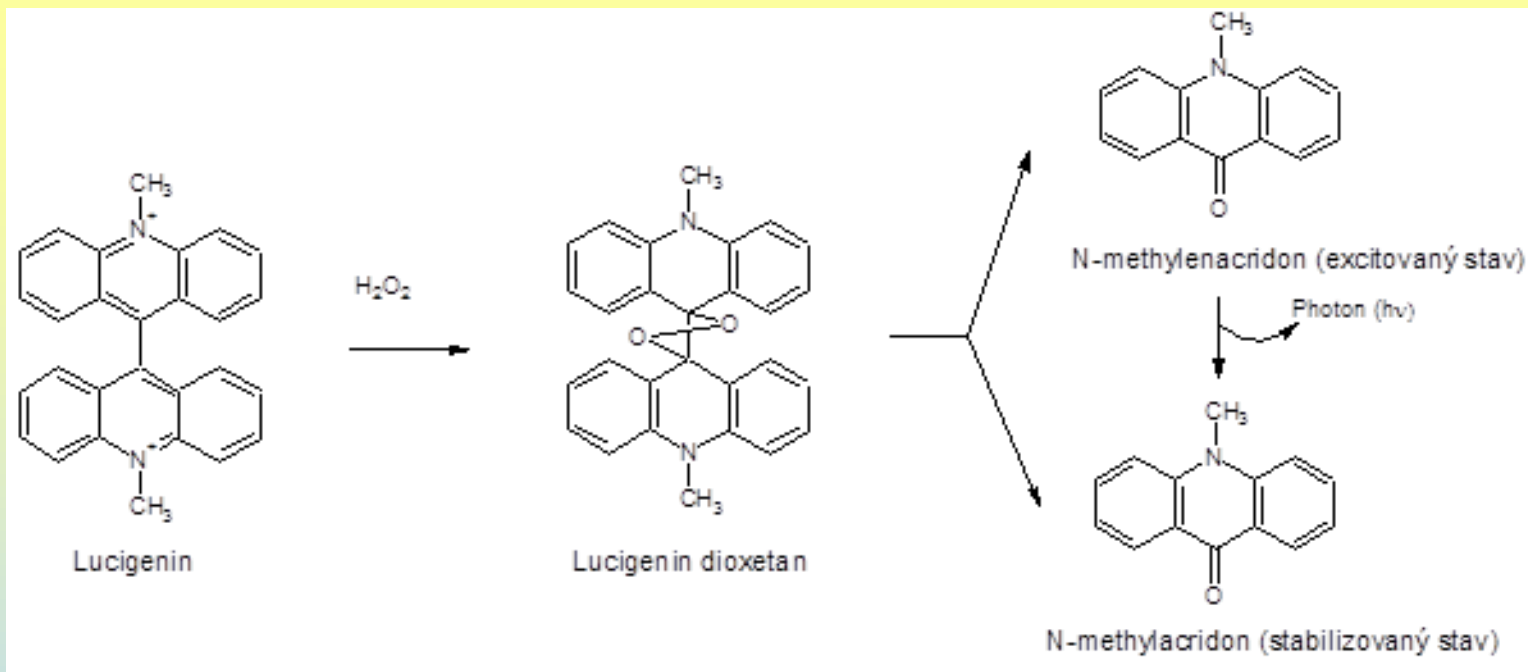


- Nitroprusid sodný $Na_2[Fe(CN)_5NO] \cdot 2H_2O \longrightarrow NO$

Chemiluminescence Detekce ROS – luminol

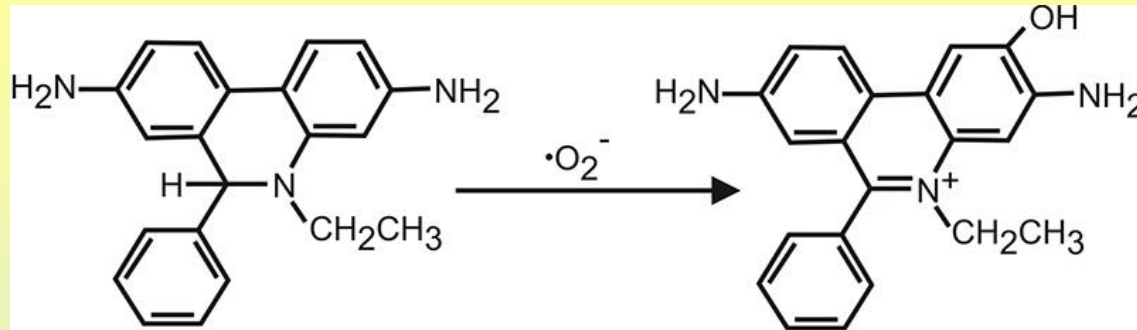


Detekce peroxidu vodíku, superoxidu - lucigenin



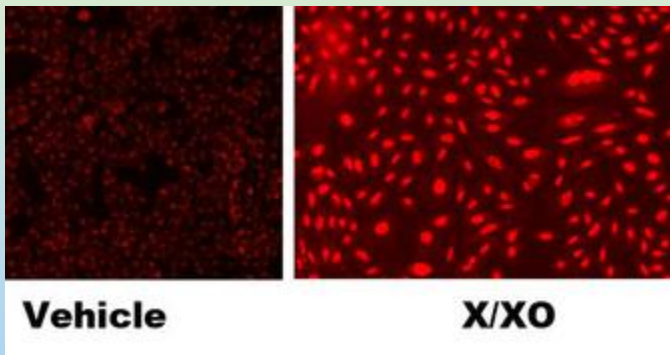
Fluorescence

Detekce superoxidu – dihydroethidium



dihydroethidium

2-OH-ethidium

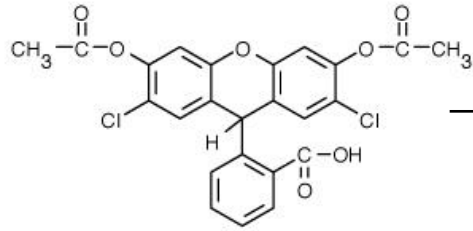


fluorescenční mikroskopie



elektrochemická detekce

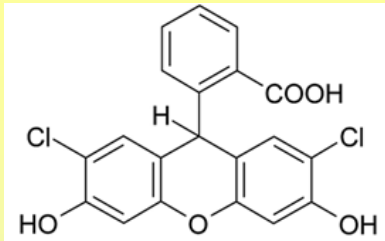
Detekce ROS - dichlorofluorescein



Dichlorofluorescein diacetát

vstup do buňky

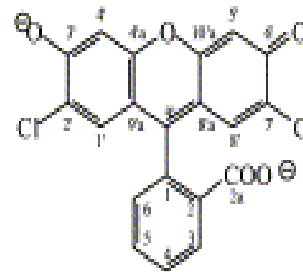
estrasy



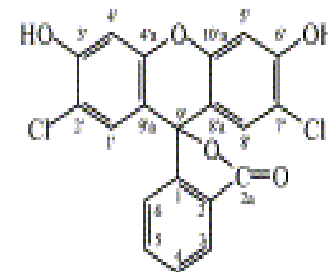
Dichlorofluorescein

bez fluorescence

ROS

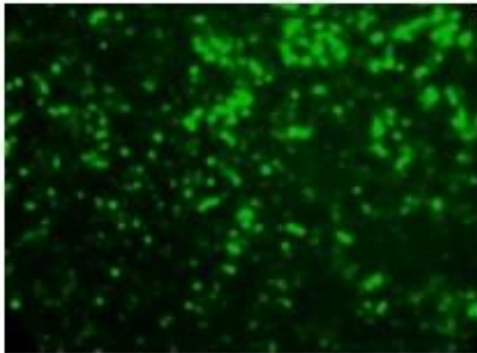


pH<5
pH>5

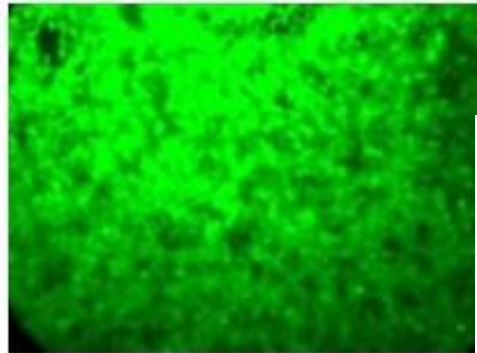


Dichlorofluorescein

fluorescence



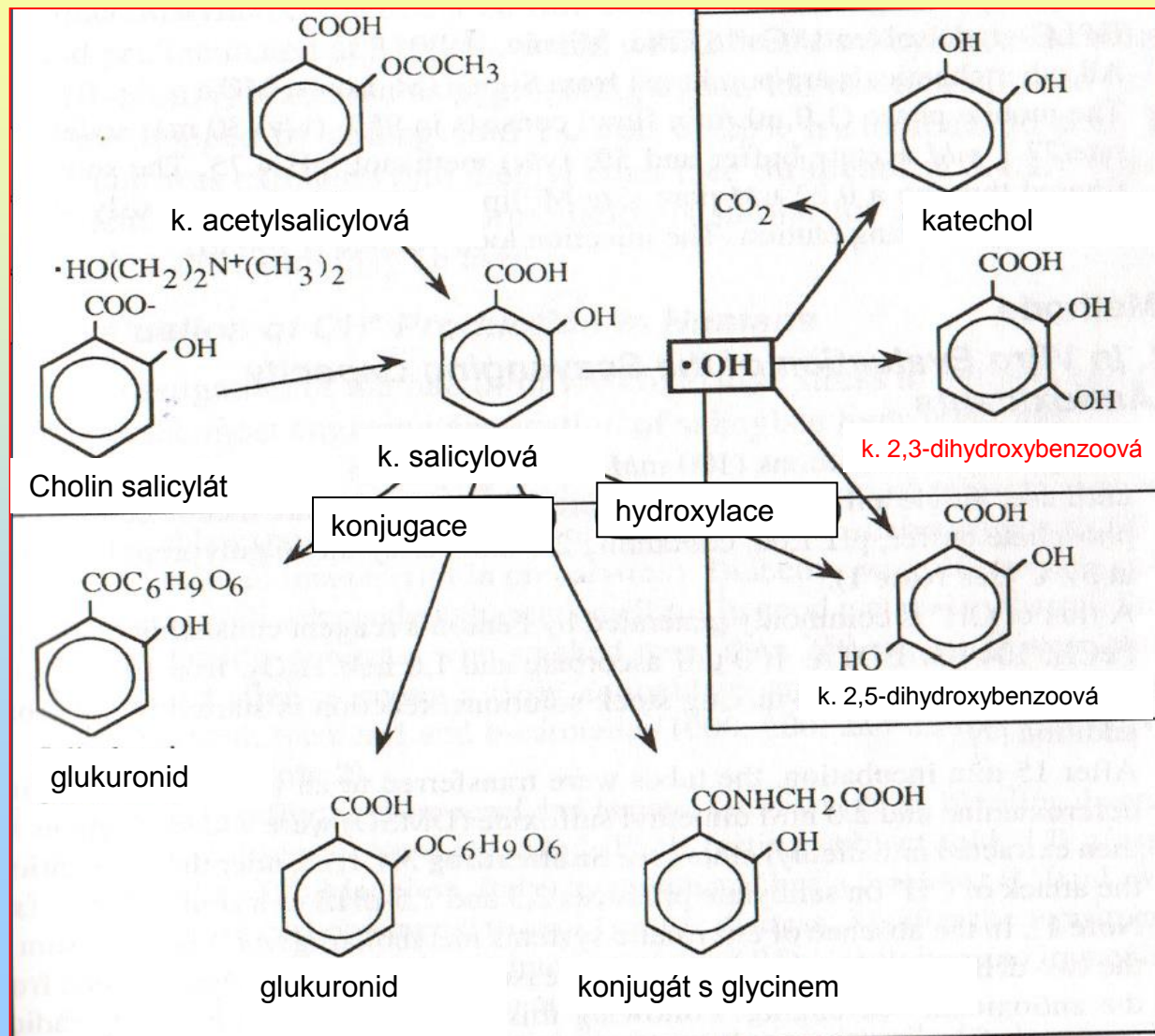
kontrola

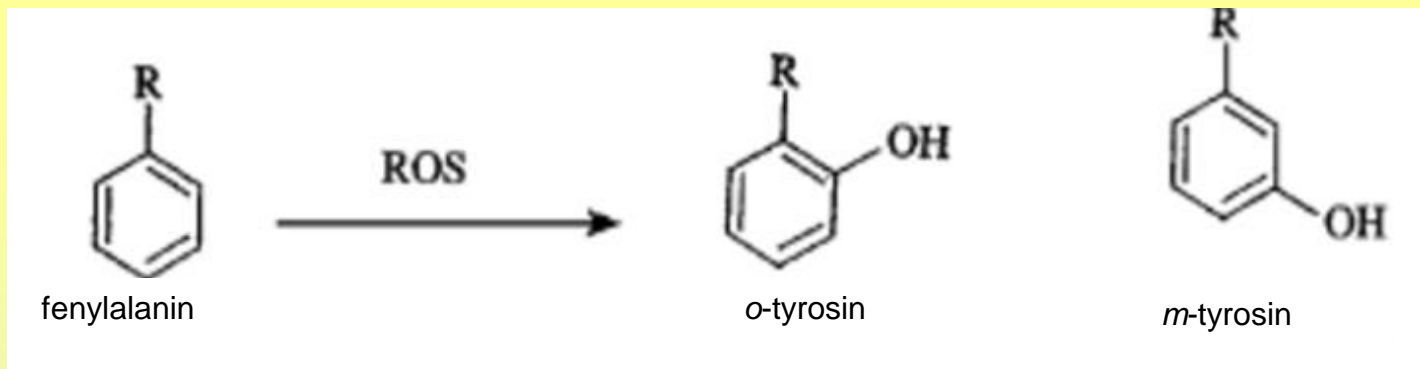


oxidační stres



Aromatická hydroxylace jako ukazatel tvorby hydroxylového radikálu *in vivo*

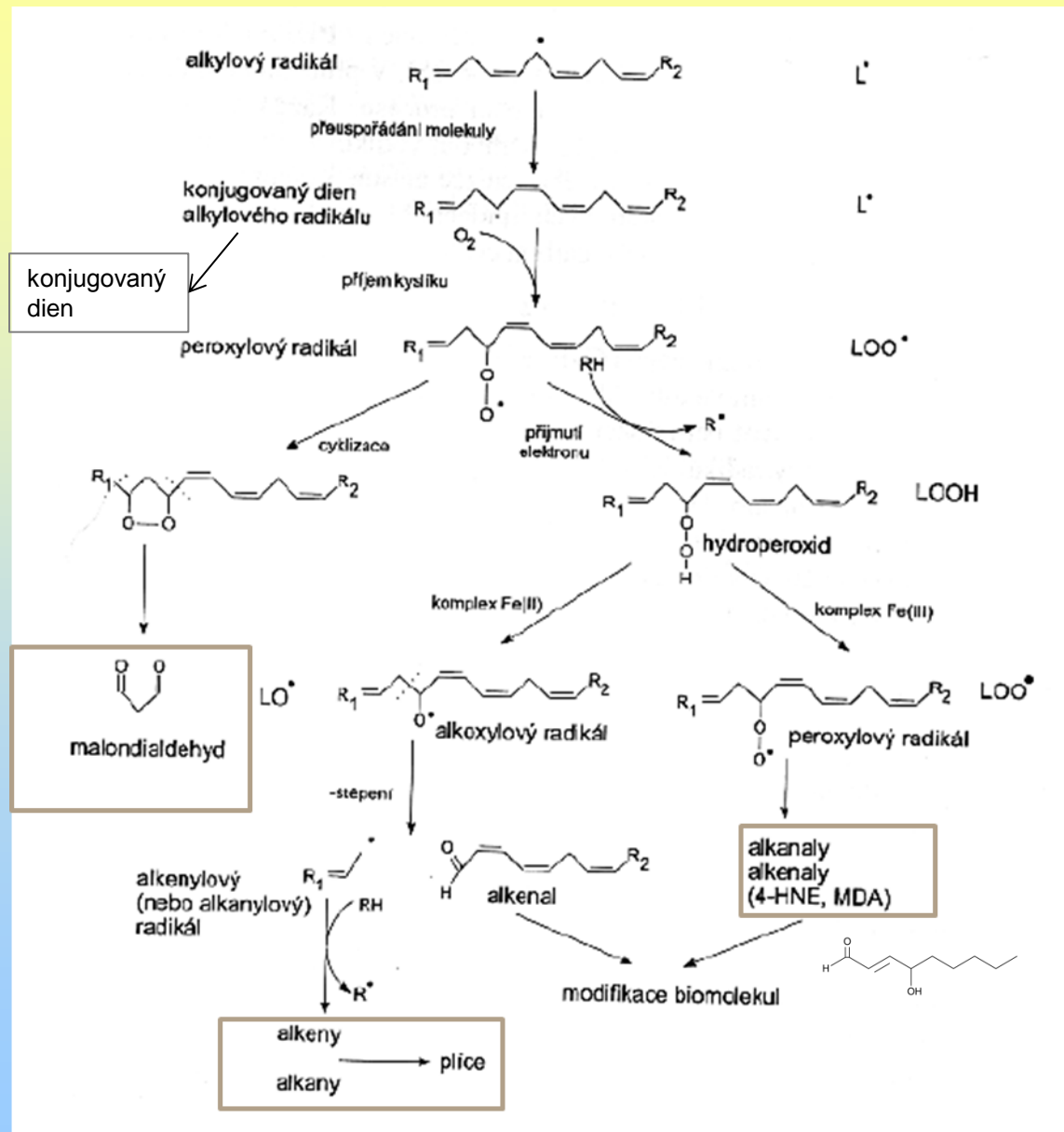




- Stanovení v biologickém materiálu pomocí HPLC - elektrochemická detekce

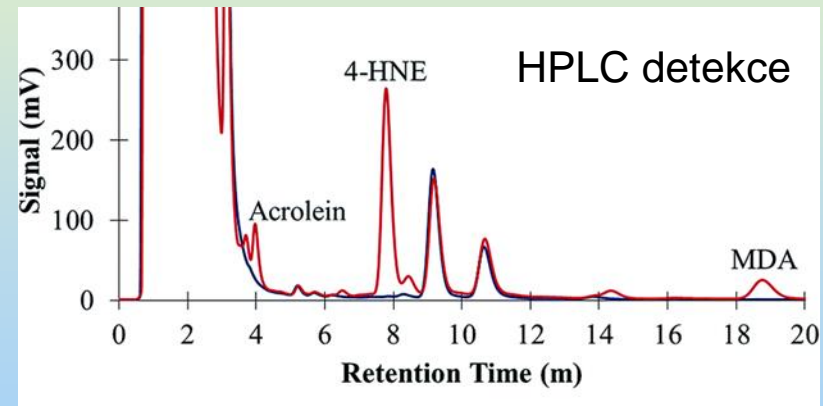
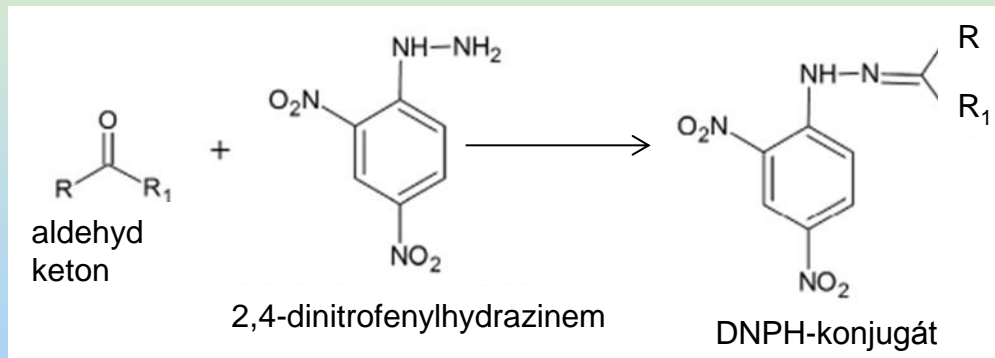
Metody nepřímé – měření produktů oxidačního stresu

- Stanovení produktů lipoperoxidace



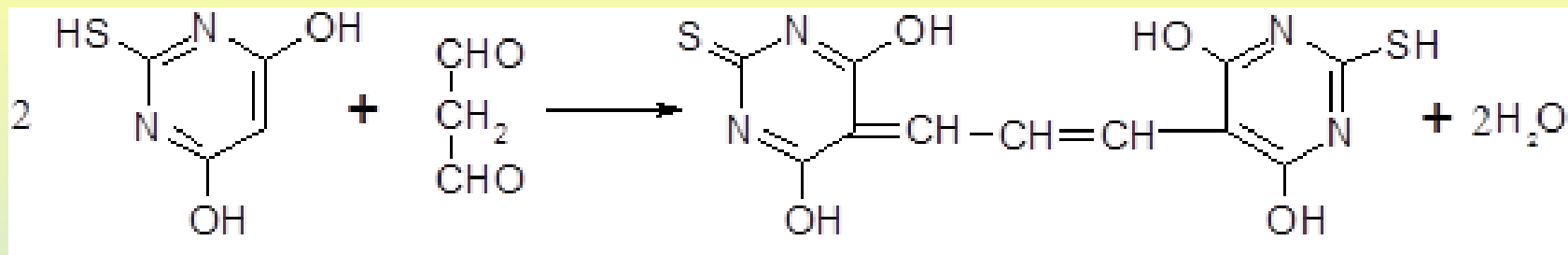
Metody nepřímé – měření produktů oxidačního stresu

- Stanovení produktů lipoperoxidace (LP)
 - Stanovení konjugovaných dienů spektrofotometricky (210 nm)
 - Stanovení 4-hydroxy-2-nonenalu spektrofotometricky (370 nm) nebo HPLC - elektrochemická detekce



- Stanovení vydechovaných těkavých uhlovodíků (etan, propan) plynovou chromatografií
- Stanovení produktů LP IČ spektroskopií

Stanovení MDA kyselinou thiobarbiturovou



TBA

MDA

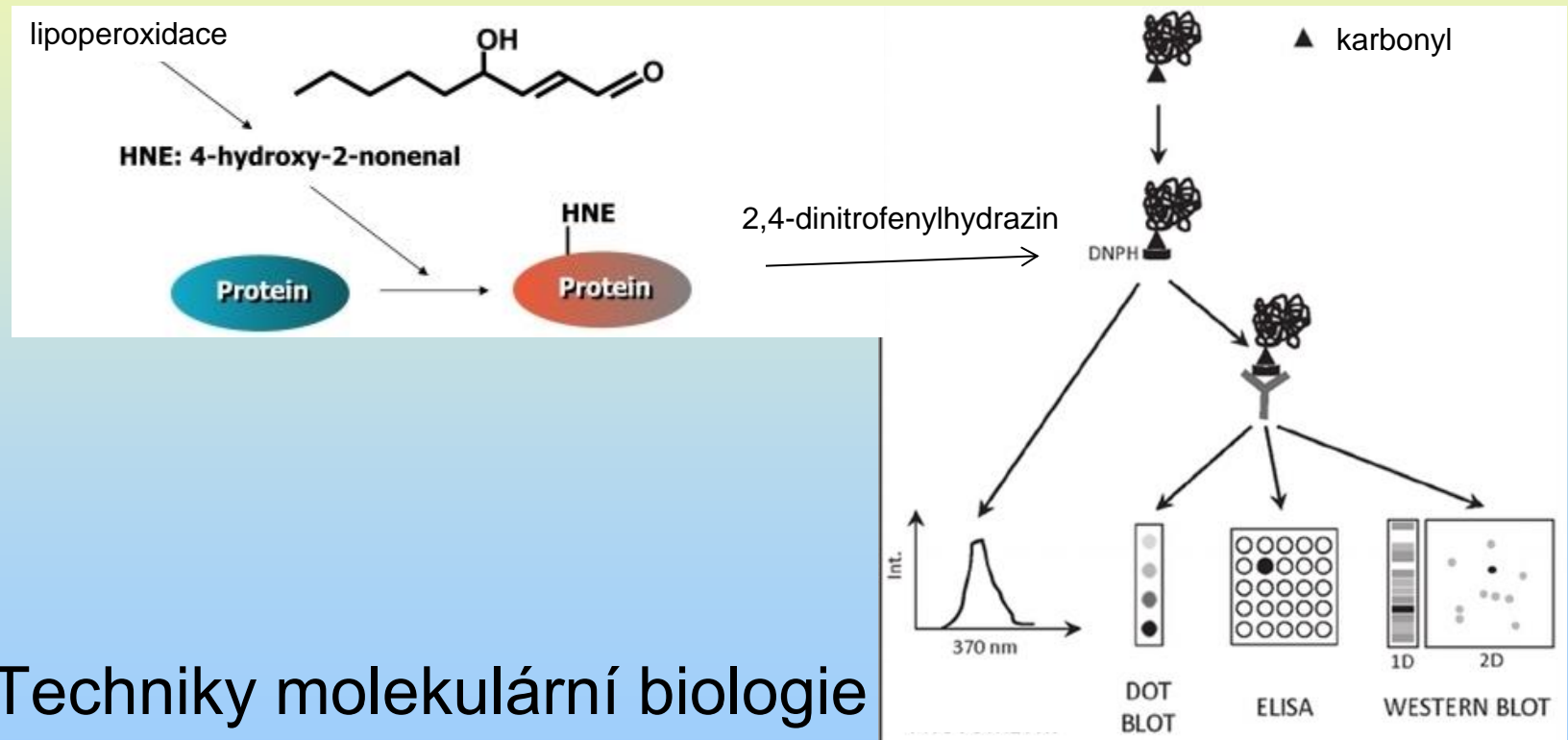


Patton, S. and G. W. Kurtz. 2-Thiobarbituric acid as a reagent for detecting milk fat oxidation. *J. Dairy Sci.* 34:669–674.1951.

spektrofotometrické stanovení (532 nm)

Metody nepřímé – měření produktů oxidačního stresu

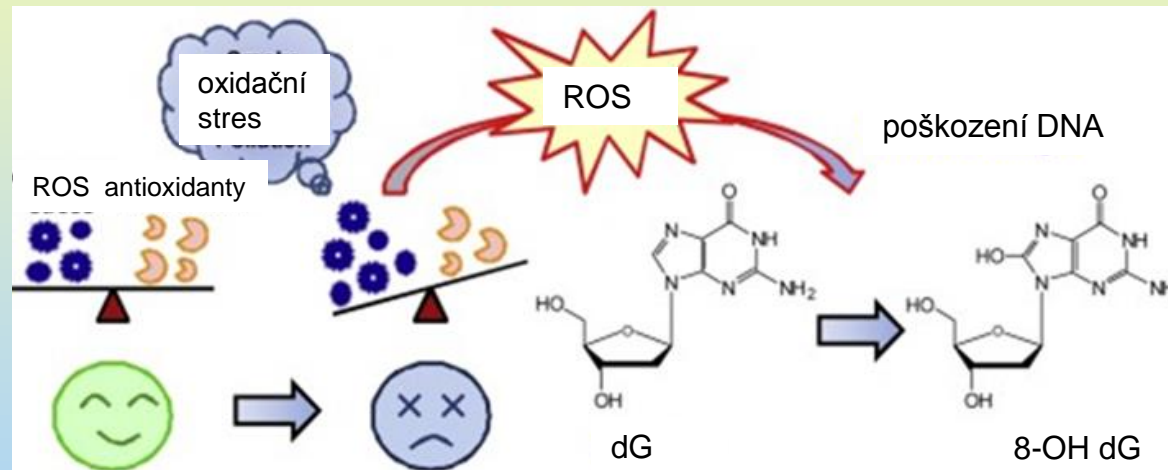
- Stanovení oxidačně poškozených proteinů (spektrofotometricky, 370 nm)



- Techniky molekulární biologie

Metody nepřímé – měření produktů oxidačního stresu

- Stanovení oxidačně poškozených sacharidů
- Stanovení oxidačně poškozených NK



– HPLC - elektrochemická detekce, ELISA metody