



## Department of Free Radical Pathophysiology

---

**Head of the department:**

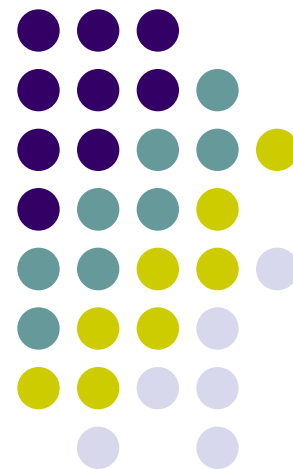
**Antonín Lojek**

*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

---

# REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU A DUSÍKU A METODY JEJICH STANOVENÍ



# REAKTIVNÍ METABOLITY KYSLÍKU A DUSÍKU



- běžně vznikají v organismu
- fyziologický i patologický účinek
- volné radikály, látky neradikálové povahy
- volné radikály – atomy a molekuly, obsahující nepárový elektron, vznikají odejmutím či přijetím elektronu
- reaktivní částice, řetězová reakce

# ZDROJE VOLNÝCH RADIKÁLŮ

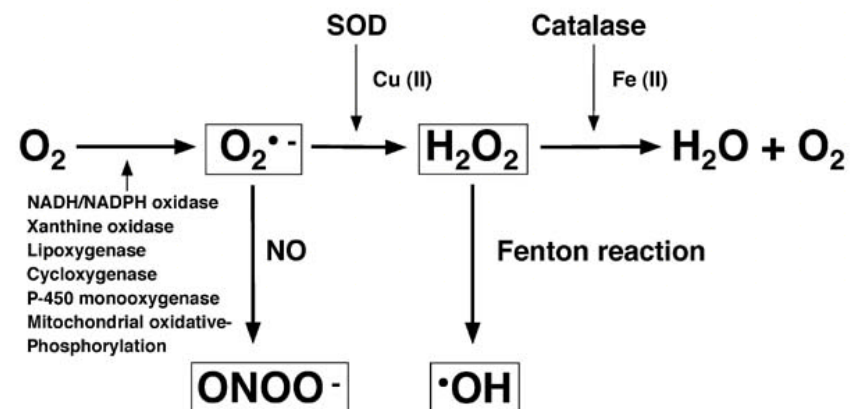


## ENDOGENNÍ

- 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



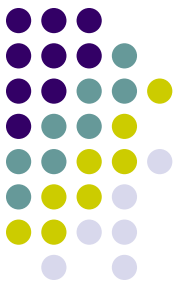
# REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU A DUSÍKU



Volné radikály		Látky neradikálové povahy	
<b>Reaktivní formy kyslíku</b>			
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	$^1O_2$
<b>Reaktivní formy dusíku</b>			
Oxid dusnatý	$NO\cdot$	Peroxynitrit	$ONOO\cdot$
Oxid dusičitý	$NO_2\cdot$	Dusitany	$NO_2^-$
		Dusičnany	$NO_3^-$
		Nitrosyl	$NO^+$

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

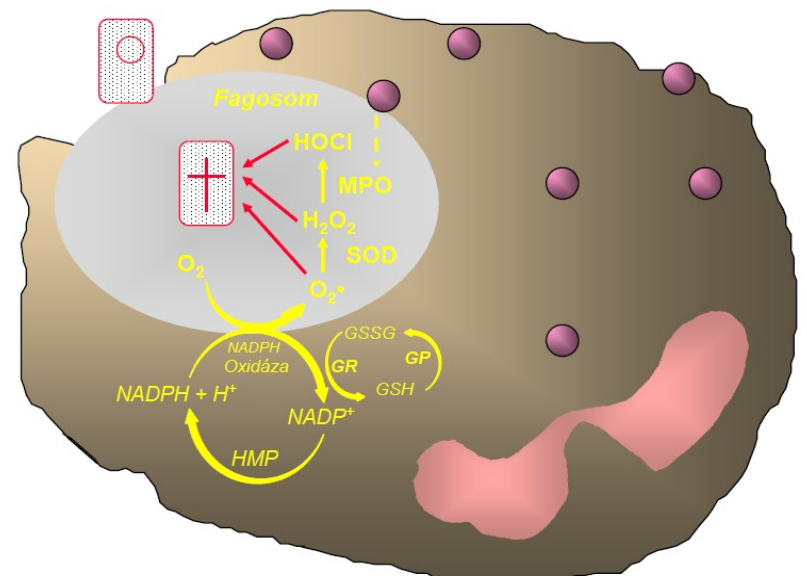
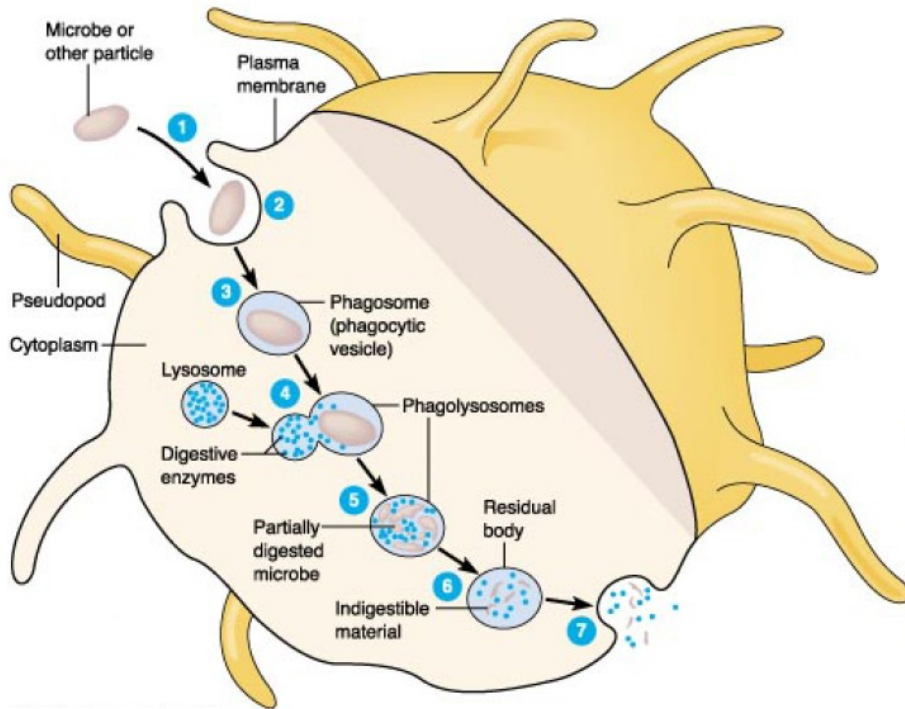
# ZABÍJEČSKÉ MECHANISMY FAGOCYTŮ



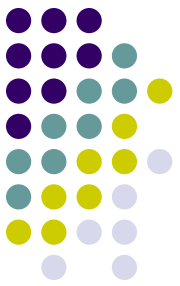
Acidification	pH= $\sim$ 3.5–4.0, bacteriostatic or bactericidal
Toxic oxygen-derived products	Superoxide $O_2^-$ , hydrogen peroxide $H_2O_2$ , singlet oxygen $^1O_2^*$ , hydroxyl radical $OH^*$ , hypohalite $OCl^-$
Toxic nitrogen oxides	Nitric oxide NO
Antimicrobial peptides	Defensins and cationic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

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

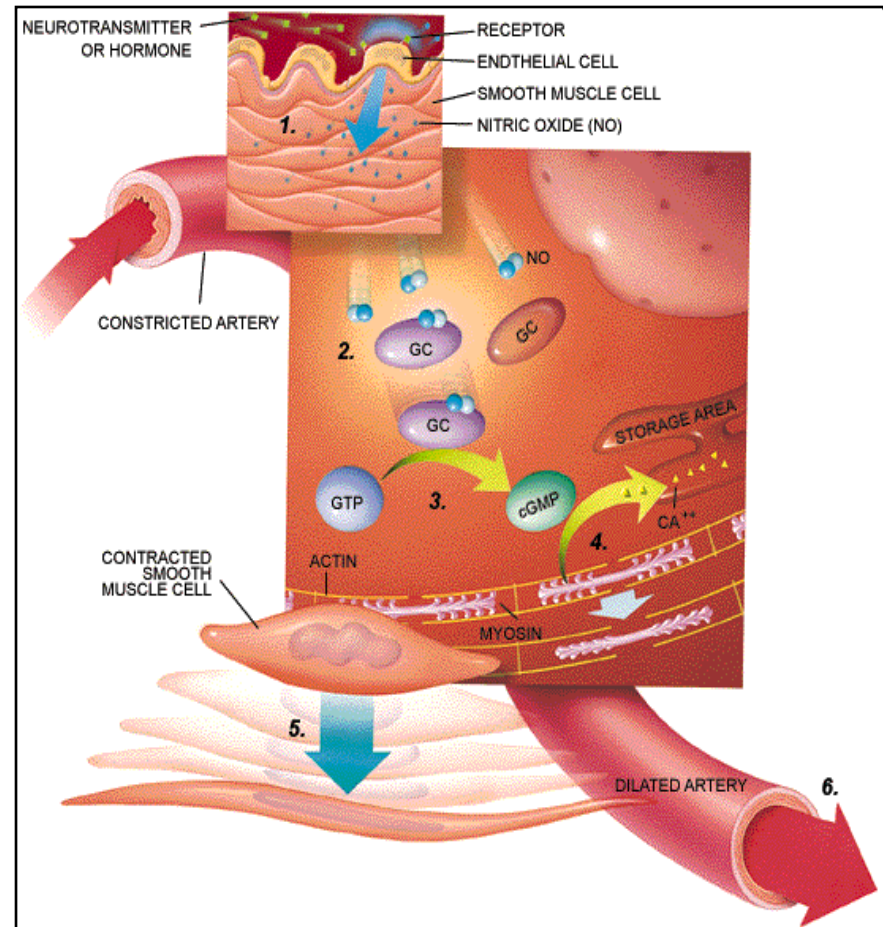
# FAGOCYTÓZA A OXIDATIVNÍ VZPLANUTÍ



# FYZIOLOGICKÝ VÝZNAM NO



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





# OXIDAČNÍ STRES A POŠKOZENÍ BIOMOLEKUL



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

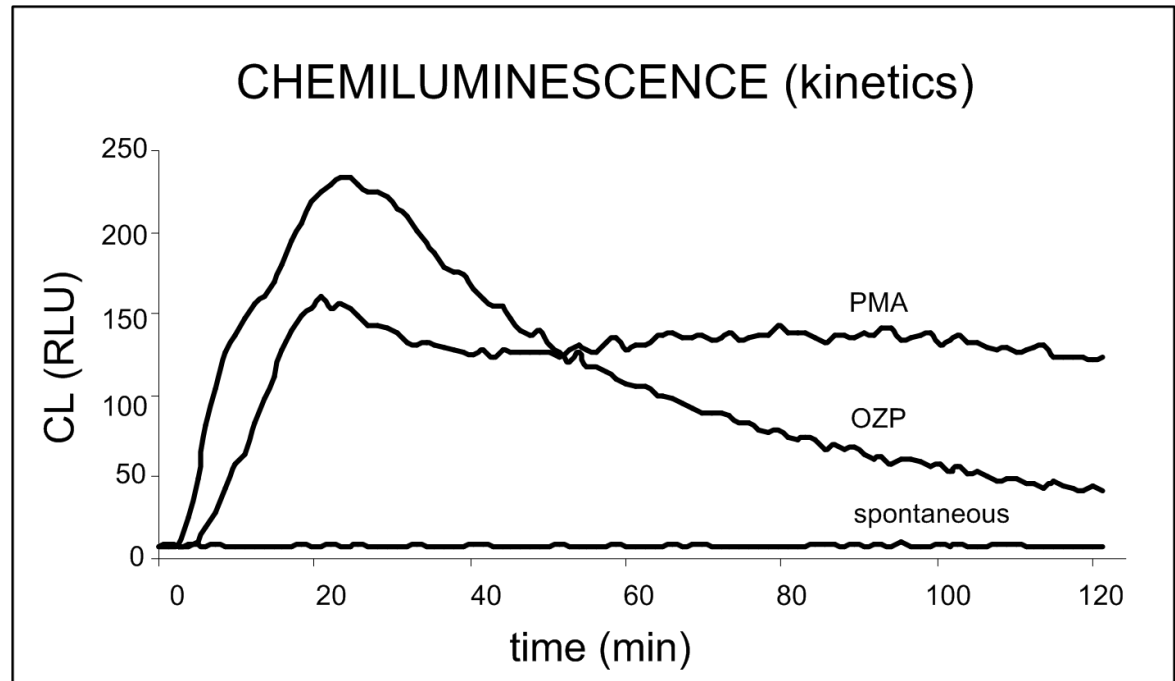
<i>Cíl</i>	<i>Poškození</i>	<i>Následky</i>
nenasycené mastné kyseliny v lipidech	ztráta dvojných vazeb, tvorba reaktivních metabolitů (peroxydy, aldehydy)	změněná fluidita lipidů, změny v propustnosti membrán, vliv na membránově vázané enzymy, tvorba chemoatraktivních látek pro makrofágy
proteiny	agregace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

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

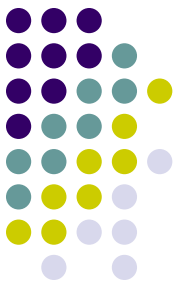
# CHEMILUMINESCENČNÍ DETEKCE METABOLICKÉ AKTIVITY FAGOCYTŮ



- přeměna chemické energie na světelnou (fotony):  
 $\text{luminofor} + \text{RONS} \rightarrow \text{luminofor}^* \rightarrow \text{luminofor} + \text{světlo}$
- luminofory:
  - luminol
  - izoluminol
  - lucigenin
  - pholasin
- aktivátory:
  - OZP
  - PMA
  - fMLP
  - CaI
- stimulace LPS
- luminometr Immunotech LMT01 (citlivý detektor + fotonásobič)



# STANOVENÍ KONCENTRACE NITRITŮ GRIESSOVOU METODOU



- nepřímé spektrofotometrické stanovení nitritů v médiu
  - NO » autooxidace » nitrity, nitráty
  - stanovujeme nitrity po diazotaci sulfanilamidu a kopulaci s N-(1-naftyl)ethylendiaminem
  - měření absorbance při 546 nm
  - výpočet koncentrace nitritů z kalibrační křivky
  - stimulace LPS

