

FARMACEUTICKÁ FAKULTA UK
V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd



Účinky antioxidantů přírodního původu v modelu glykace proteinů

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.

Hradec Králové 2007

Klára Švehlová

Děkuji prof. MUDr. Jaroslavu Dršatovi, CSc. za jeho odborné vedení, cenné rady a připomínky a pomoc při zpracování této diplomové práce.

OBSAH

1.	ABSTRAKT	4
2.	ÚVOD	5
3.	SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	6
3.1	NEENZYMOVÁ GLYKACE	6
3.2	AGE PREKURZORY	7
3.3	AGE PRODUKTY	8
3.4	METHYLGLYOXAL	12
3.5	ASPARTÁTAMINOTRASFERÁZA	13
3.6	ELEKTRONOVÁ SPEKTROSKOPIE BÍLKOVIN	15
3.6.1	<i>Absorpční spektroskopie</i>	15
3.6.2	<i>Fluorescenční spektroskopie</i>	16
3.7	TERAPEUTICKÉ MOŽNOSTI OVLIVNĚNÍ AGES	17
3.7.1	<i>Antioxidanty přírodního původu</i>	18
3.7.1.1	Hydroxyskořicové kyseliny	19
4.	CÍLE PRÁCE	22
5.	MATERIÁL A METODIKA	23
5.1	POUŽITÝ MATERIÁL	23
5.2	POUŽITÁ ZAŘÍZENÍ.....	23
5.3	METODIKA.....	24
5.3.1	<i>Příprava reagensů</i>	24
5.3.1.1	Příprava pufru	24
5.3.1.2	Příprava enzymu	24
5.3.1.3	Příprava roztoků hydroxyskořicových kyselin (HCA)	24
5.3.1.4	Příprava roztoku methylglyoxalu	24
5.3.2	<i>Příprava inkubačních směsí pro:</i>	25
5.3.2.1	Sledování vlivu MGO na aktivitu AST	25
5.3.2.2	Sledování účinku jednotlivých antioxidantů na aktivitu AST a její glykaci MGO	26
5.3.2.3	Sledování stability jednotlivých HCA.....	26
5.3.2.4	Sledování vlivu HCA na fluorescenci Trp zbytků v molekule AST (zhášení fluorescence) ...	26
5.3.2.5	Sledování vlivu HCA na profil UV-VIS absorpčního spektra AST	27
5.3.3	<i>Měření katalytické aktivity AST pomocí kinetické UV metody</i>	28
5.3.4	<i>Měření stability jednotlivých HCA</i>	29
5.3.5	<i>Měření fluorescence Trp zbytků v molekule AST (zhášení fluorescence)</i>	29
5.3.6	<i>Měření vlivu HCA na profil UV-VIS absorpčního spektra AST</i>	29
6.	VÝSLEDKY	30
6.1	SLEDOVÁNÍ Vlivu MGO NA AKTIVITU AST	30
6.2	SLEDOVÁNÍ ÚČINKU JEDNOTLIVÝCH ANTIOXIDANTŮ NA AKTIVITU AST A JEJÍ GLYKACI MGO	32
6.2.1	<i>Kyselina o-kumarová</i>	33
6.2.2	<i>Kyselina p-kumarová</i>	35
6.2.3	<i>Kyselina kávová</i>	37
6.2.4	<i>Kyselina rozmarýnová</i>	39
6.3	SLEDOVÁNÍ STABILITY JEDNOTLIVÝCH HCA.....	41
6.4	SLEDOVÁNÍ Vlivu HCA NA FLUORESCENCI TRP ZBYTKŮ V MOLEKULE AST (ZHÁŠENÍ FLUORESCENCE)	46
6.5	SLEDOVÁNÍ Vlivu HCA NA PROFIL UV-VIS ABSORPČNÍHO SPEKTRA AST	56
7.	DISKUZE	58
8.	ZÁVĚRY	64
9.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	65
10.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	67

1. ABSTRAKT

Účinky antioxidantů přírodního původu v modelu glykace proteinů

V diplomové práci jsem se zabývala přímým a nepřímým vlivem antioxidantů přírodního původu (hydroxyskořicových kyselin) na aktivitu enzymu aspartátaminotransferázy a vztahy mezi strukturou jednotlivých kyselin a jejich účinkem. Používala jsem nový model glykace aspartátaminotransferázy methylglyoxalem, který na katedře biochemických věd FaF UK HK dosud nebyl zkoušen. Zjistila jsem vztah mezi strukturou vybraných hydroxyskořicových kyselin a jejich účinkem. Se zvyšujícím se počtem hydroxylových skupin se zvyšoval antiglykační účinek. Methylglyoxalový model glykace se osvědčil a lze jej využívat i při dalších experimentech s jinými látkami. Dále jsem pozorovala interakce mezi kyselinami a samotným enzymem pomocí absorpční a fluorescenční spektroskopie. Ze získaných spekter je patrná interakce jednotlivých kyselin s enzymem, pravděpodobně se váží pouze na jeho proteinovou část, nikoli na koenzym. Účinek všech hydroxyskořicových kyselin byl závislý na jejich koncentraci.

ABSTRACT

The effects of natural antioxidants in the model of protein glycation

In my diploma thesis, I was concerned with direct and indirect effects of antioxidants of natural origin (hydroxycinnamic acids, HCAs) on the catalytic activity of aspartate aminotransferase as well as structure-activity relationship of individual HCAs. I used new model of methylglyoxal-induced glycation of aspartate aminotransferase, which has not been tested at the Department of Biochemical Science, Faculty of Pharmacy so far. I observed the structure-activity relationship of selected HCAs. Their antiglycation effect increased with the increasing number of hydroxyl groups. The methylglyoxal model of glycation proved to be suitable for further research of other compounds. Further, I observed the interactions between HCAs and the molecule of enzyme itself using absorption and fluorescence spectroscopy. Those interactions were apparent at the acquired spectra. HCAs bind most probably only to the protein part of the enzyme and not to the coenzyme. The effect of all HCAs was concentration-dependent.

2. ÚVOD

Tato diplomová práce byla vytvořena na katedře biochemických věd FaF UK v Hradci Králové, kde se už mnoho let skupina prof. Dršaty a doktorky Boušové zabývá tématem neenzymových glykací bílkovin a vlivem potenciálních antioxidantů na zpomalení těchto glykací a jejich přímým účinkem na enzym.

Tato problematika je velice aktuální v souvislosti s představami o mechanismech stárnutí a diabetu. Hyperglykémie u diabetiků urychluje glykační reakce a rozvoj diabetických mikro- a makrovaskulárních komplikací. Situaci dále zhoršuje oxidační stres a volné radikály vyvíjející se během glykačních pochodů. Kromě cukrů se glykačních procesů účastní také vysoce reaktivní α -dikarboonylové sloučeniny, mezi nimi i methylglyoxal (MGO).

V mé práci jsem používala model glykace aspartátaminotransferázy (AST) výše zmíněným methylglyoxalem, který dosud na katedře nebyl zkoušen. Tento oxoaldehyd má velmi silné glykační vlastnosti a jeho reaktivita je namířena přednostně proti argininovým, méně už lysinovým a cysteinovým zbytkům. Enzym aspartátaminotransferáza je snadno dostupný ve vysoce čistém stavu a je stabilní v podmínkách dlouhodobé inkubace. Sledovala jsem změny aktivity enzymu pod vlivem MGO kinetickou UV metodou.

Klinické a epidemiologické studie rovněž prokazují korelaci mezi antioxidační aktivitou látek přijímaných v potravě a prevencí některých onemocnění např. kardiovaskulárních chorob, karcinogeneze, neurologických poruch nebo procesů stárnutí. Z tohoto důvodu je na výzkum antioxidantů kladen velký důraz. V mé práci jsem sledovala jak přímý tak nepřímý vliv potenciálních antioxidantů na aktivitu enzymu a jeho glykaci methylglyoxalem. Srovnávala jsem účinky v přírodě se běžně vyskytujícími hydroxyskořicových kyselin a jejich interakcí s enzymem pomocí kinetické UV metody a fluorescenčních a absorpčních spekter.

3. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

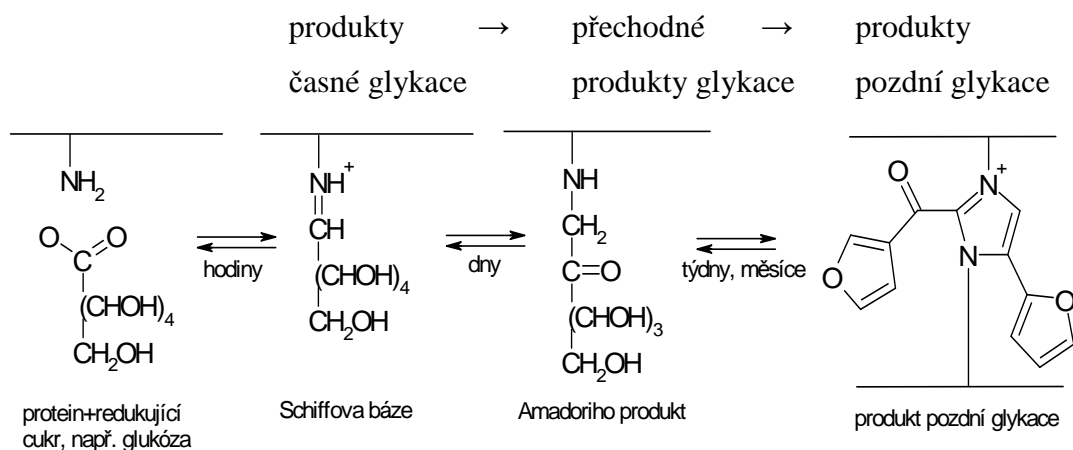
3.1 Neenzymová glykace

Neenzymová glykace je posttranslační proces, kterým dochází k modifikaci proteinů a možnému poškození tkání v živém organismu (Dršata a kol. 2002). Sled glykačních reakcí je zahájen vazbou aldehydové skupiny redukujícího cukru na ϵ -aminoskupiny lysinu v proteinu za vzniku **Schiffovy báze** (early glycated product), která může být buď v aldiminové formě s otevřeným řetězcem nebo ve stabilnější formě s glykosylovaným kruhem. Tato časná fáze je reverzibilní, závislá na počtu reaktivních ϵ -aminoskupin lysinových zbytků v proteinu, typu a koncentraci cukru a biologickém poločase proteinu (Dolhofer a kol. 1982). Probíhá řádově hodiny.

Během dní pak dochází k přesmyku na **Amadoriho produkt** (intermediate glycated product) s kovalentní vazbou (má charakter ketoaminu). Tento produkt je do jisté míry reverzibilní, i když rovnováha je posunuta ve směru jeho tvorby. Tento sled reakcí se nazývá **Maillardova reakce** (obr. 1) (Bierhaus a kol. 1998) a prvně byla popsána v roce 1912 L. C. Maillardem, který zahříval aminokyselinu glycin s glukózou a po 10 minutách pozoroval změnu barvy roztoku nejprve do žluta a později tmavohněda.

Za týdny až měsíce, v tzv. pozdní fázi, nezávisle na přítomnosti glukózy, vznikají ireverzibilní **produkty pokročilé glykace** (AGEs – advanced glycation end-products). Jedná se o heterogenní skupinu látek vytvořenou z intermediárních produktů cyklickou kondenzací, dehydratací a oxidační reakcí za spoluúčasti volných kyslíkových radikálů (Holeček a Racek 1995). Pokud glykaci doprovází oxidace, proces se nazývá glykoxidace (Singh a kol 2001).

Pod vlivem neenzymových glykací a reaktivních forem kyslíku (ROS) generovaných při oxidačním stresu, dochází ke změnám funkce tkání a buněčných proteinů. Tyto změny jsou zodpovědné za fyziologické stárnutí, ale i za komplikace při diabetu a při degenerativních onemocněních jako jsou revmatoidní artritida, amyloidóza, Alzheimerova choroba a další neurodegenerativní onemocnění (Bakala H. 2003).



Obr. 1: Schéma Maillardovy reakce a tvorby AGEs (Janebová a kol. 1999)

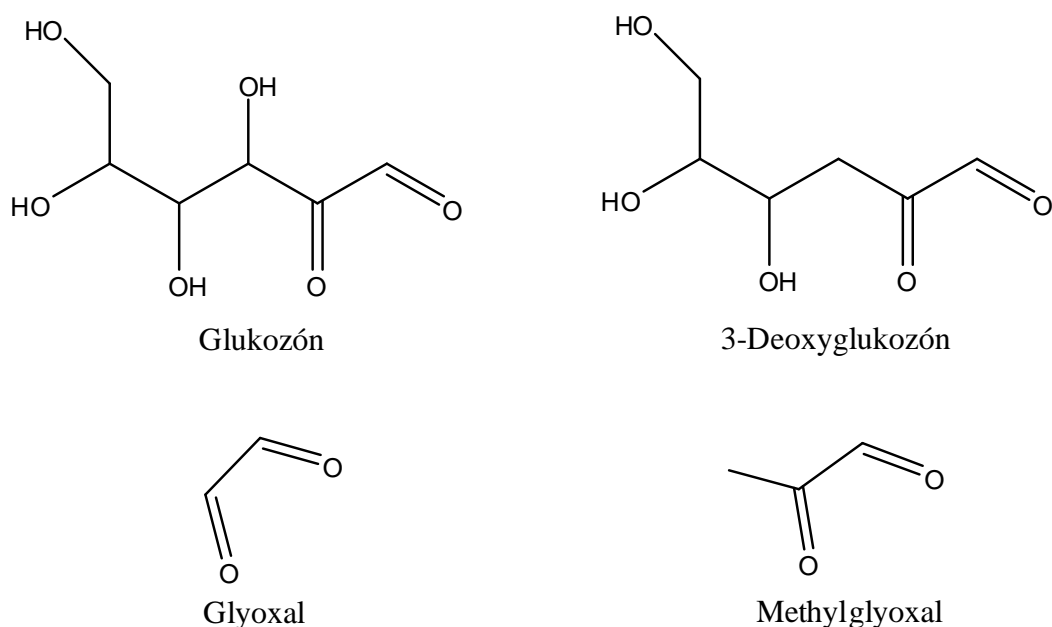
Klinicky významné jsou především glykace proteinů s dlouhou životností, zvláště **tkáňových proteinů** jako důsledek nekompenzovaného diabetu mellitu. Tvorba AGEs vede k nevratným změnám ve struktuře bazálních membrán cév, sítnici, oční čočky, ledvin, periferních nervů, pohybového aparátu a kůže (kolagenu, elastinu). Tyto změny přispívají k chronickým komplikacím nekompenzovaného diabetu a spolu s hyperglykemií vytvářejí podmínky pro vznik systémových infekčních onemocnění a diabetických gangrén. Mnohé důsledky glykací **plazmatických proteinů** jsou díky jejich kratšímu biologickému poločasu pro organismus méně klinicky závažné. Je však známo, že glykace mohou negativně ovlivnit biochemické a imunologické funkce řady plazmatických proteinů a mohou též inhibovat katalytické aktivity některých plazmatických enzymů (Beránek a Palička 1998).

Ze všech přirozeně se vyskytujících cukrů má glukóza nejpomalejší glykační schopnost, intracelulární cukry jako např. fruktóza, threóza, glukóza-6-fosfát a glyceraldehyd-3-fosfát vytvářejí AGEs mnohem rychleji. Při nadbytku glukózy nabývá na významu **polyolová cesta**, jejímž klíčovým enzymem je aldózareduktáza. Během ní se glukóza přeměňuje na sorbitol, dále na fruktózu a glyceraldehyd-3-fosfát a tím se potencuje tvorba AGEs (King a Brownlee 1996).

3.2 AGE prekurzory

Kromě redukujících cukrů se mohou na tvorbě AGEs podílet i další prekurzory obsahující karbonylovou skupinu. Důležité postavení mezi nimi mají vysoce reaktivní α -dikarbonylové sloučeniny (**methyglyoxal**, **3-deoxyglukozón - 3-DG**, **glukozón**,

glyoxal - GO) (obr. 2). Spolu s dalšími aldehydy a ketony (dehydroaskorbát, malondialdehyd, akrolein) jsou v literatuře označovány jako reaktivní karbonylové sloučeniny a jejich hromadění je popisováno jako **karbonylový stres**. Tyto látky jsou nepřetržitě produkovány metabolismem všech základních živin (Miyata a kol. 1999; Jakuš 2003). Vyjmenované α -dikarbonylové sloučeniny mohou navíc vznikat během celého glykoxidačního procesu. **3-deoxyglukozón** vzniká neoxidativním přesmykem Amadoriho produktu a fragmentací fruktóza-3-fosfátu, intermediátu polyolové cesty. **Glyoxal** se tvoří autooxidativní degradací glukózy katalyzovanou přechodnými kovy jako jsou měď a železo (Wolffova cesta), lipoperoxidací a fragmentací Shiffovy báze (Namikiho cesta). Poslední jmenovanou cestou vzniká i **methylglyoxal** (viz dále) (Singh a kol. 2001; Jakuš 2003).

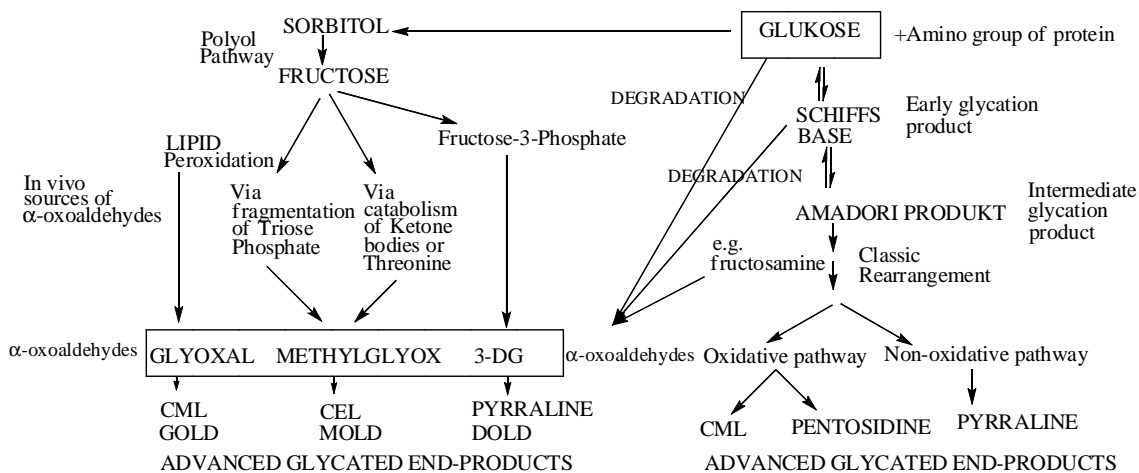


Obr 2: Struktura AGE prekurzorů (Jakuš 2003)

3.3 AGE produkty

Na tvorbě AGEs se tedy podílejí nejenom redukující cukry, ale i prekurzory AGEs v podobě dikarbonylových sloučenin (obr. 3). Celý proces je urychlen volnými radikály, které se tvoří hlavně při oxidačním stresu. Proteiny modifikované pokročilou glykací mají mnohem větší molekulovou hmotnost než proteiny z kterých vznikly a tedy i odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti (změna rozpustnosti, nižší izoelektrický bod,

negativnější náboj, rezistence k proteolytickým enzymům, zvýšená rezistence k tepelné denaturaci, snadná chemická hydrolýza a relativní stabilita vůči působení kyslíku) (Wu a Tu 1996).



Obr. 3: Glykační dráhy (Singh a kol.2001)

Mnohé vytvářejí příčné vazby mezi aminokyselinami bílkovin (cross-link), často tvoří chromofory a některé fluoreskují. Přesná struktura všech produktů pokročilé glykace *in vivo* není známa, avšak některé byly definovány jako modelové AGEs. Jedná se převážně o heterocyklické sloučeniny umístěné na konci nebo uprostřed modifikovaných proteinových řetězců: 2-(2-furoyl)-4,(5)-(2-Furanyl)-1H-imidazol (**FFI**), 1-alkyl-2-formyl-3,4-diglukosyl-pyrrol (**AFGP**), 5-hydroxymethyl-1-alkyl-pyrrol-2-karbaldehyd (**pyrralin**), imidazo(4,5-6)pyridinium (**pentosidin**) vznikající reakcí lysinových a argininových zbytků Amadoriho produktu, N-ε-(karboxymethyl)lysin (**CML**), N-ε-karboxyethyllysin (**CEL**), karboxymethylarginin (**CMA**), **vesperlysin**. Tzv. bis-lysyl imidazolové cross-linky vznikají reakcí aminokyselin s GO (**GOLD**), MGO (**MOLD**) resp. 3-DG (**DOLD**). Arginin-lysin cross-linky odvozené od GO a MGO jsou pak **GODIC** a **MODIC** (obr. 4) (Wells Knecht 1996).

Mezi stabilní fluoreskující AGE cross-linky patří pentozidin, crossliny, vesperlysin a fluorolink.

Nefluoreskující cross-linky zahrnují GOLD, MOLD, DOLD, GODIC, MODIC, AFGP a glukosepan.

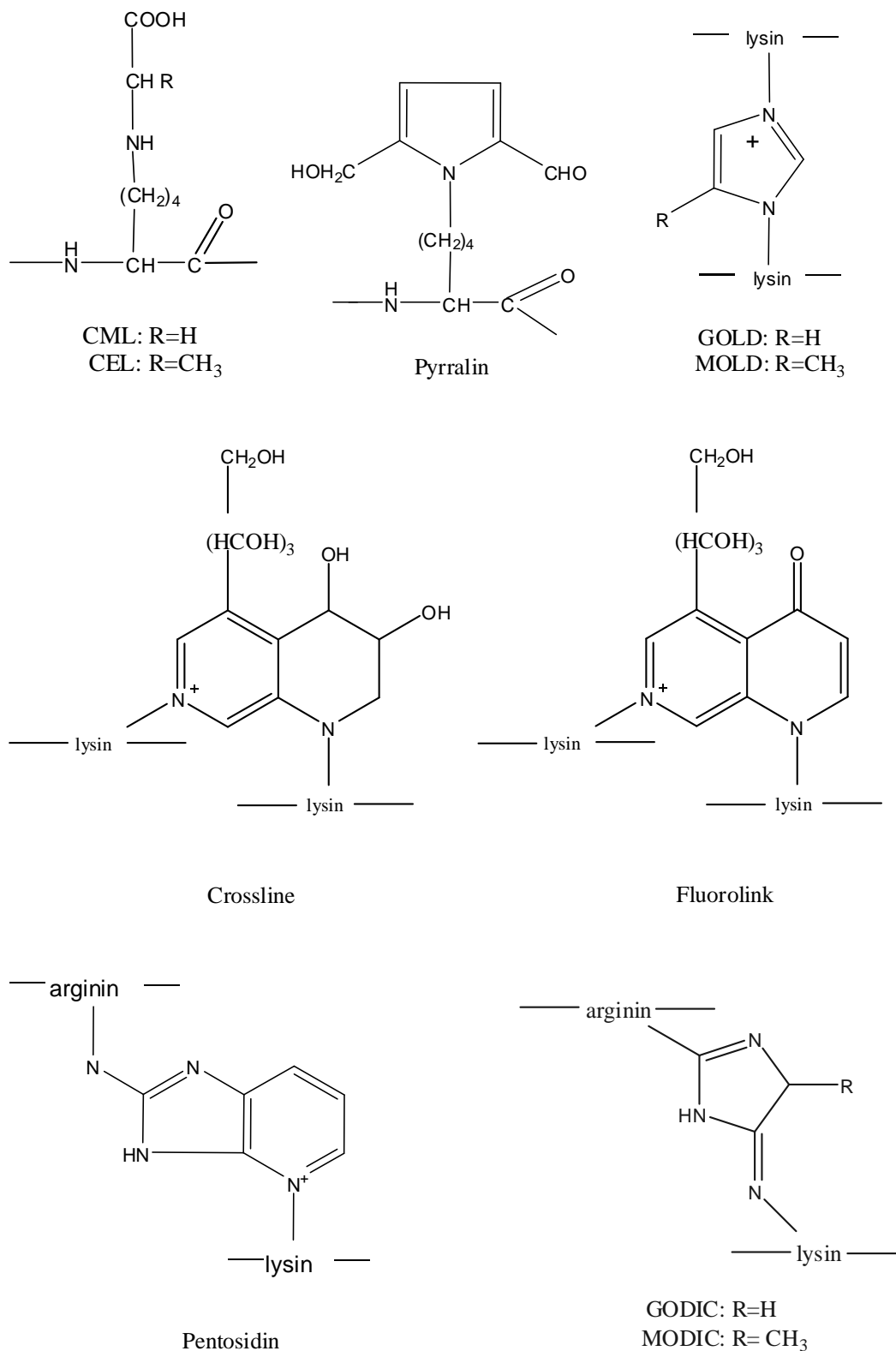
AGE nevytvářející cross-linky jsou pyrralin, CML, CEL, imidazolony, fluoreskující hydroimidazolony a argpyrimidin (Ahmed 2005; Jakuš 2003).

Pentosidin a CML jsou označovány jako glykoxidační produkty a jsou hlavními biomarkery oxidačního stresu a poškození proteinů s dlouhým biologickým poločasem (Singh a kol. 2001). Studie *in vitro* ukázaly, že hydroxylový radikál generovaný z H₂O₂ účinkem Fe²⁺ iontů vede k tvorbě CML (Nagai a kol. 1997).

Interakce produktů pozdní glykace s buňkami organismu se uskutečňuje, vzhledem k jejich heterogenní struktuře, prostřednictvím několika různých vazebných míst na receptorech – makrofágové scavengerové receptory typu I a II, receptor pro AGE (RAGE), oligosaccharyl transferáza-48 (AGE-R1), 80K-H fosfoprotein (AGE-R2) a galektin-3 (AGE-R3) (Stitt a kol. 1997). Nejdůležitější a nejvíc prostudovaný je RAGE nacházející se na povrchu velké skupiny buněk (buňky hladkého svalstva, monocyty, makrofágy, endoteliální buňky, podocyty, astrocyty, mikroglie). Při normální homeostáze se vyskytují jen ve velmi malém počtu, za patologických stavů (např. diabetická vaskulopatie) ale dochází k jejich up-regulaci. Interakce AGE-RAGE spouští signální dráhu zahrnující tvorbu volných radikálů, aktivaci prozánětlivého transkripčního faktoru NF-κB a také zvýšení exprese samotného RAGE (Hudson a Wendt 2005).

AGE je degradováno specifickými AGE receptory na tkáňových makrofázích (Singh a kol. 2001). Po degradaci jsou malé rozpustné AGE peptidy uvolněny a následně eliminovány ledvinami v závislosti na normální clearance kreatininu. Zhoršení renálních funkcí vede ke kumulaci AGEs a následně k možným poruchám endotelu a z nich plynoucím vaskulárním onemocněním. (Boel a kol. 1995). Pokud jsou renální funkce narušené a nedochází k vylučování AGE, vzniklé meziproducty rychle reagují s cílovými strukturami, např. kolagenem a LDL, a kovalentně se na ně váží a vytvářejí tzv. druhou generaci AGE proteinů (Vlassara 1997). Dochází tak k recyklaci AGEs. V poslední době bylo stále častěji poukazováno na to, že scavengerové receptory na povrchu jaterních Kupfferových a endoteliálních buněk, jsou důležitými mediátory v endocytickém příjmu AGE proteinů z plazmy (Smedsrod a kol. 1997). Poruchy v tomto systému nebo zvýšená produkce AGE nebo obojí mohou přispět k jejich hromadění nezávisle na renálních funkcích (Sano a kol. 1998). Studie *in vitro* naznačují, že k eliminaci AGE z plazmy může přispět také insulin cestou aktivace tyrosinkinázy a „substrátu pro inzulinový receptor“ (IRS) a fosfatidylinositol-3OHkinázy (PI3kinasa) (Sano a kol. 1998). Tato cesta se pokládá za vazoprotektivní a vede ke zvýšení NO a

usnadnění insulinem zprostředkovaného transportu glukózy v adipocytech a kostní svalovině (Hsueh a Law 1998). Jaterní endoteliální buňky, které mají na povrchu makrofágové scavengerové receptory, vykazují insulinem zprostředkovaný vzestup v endocytose vázaných AGE. Mechanismus tohoto účinku není ještě přesně znám.



Obr. 4.: Struktura AGE produktů (Baynes 2003)

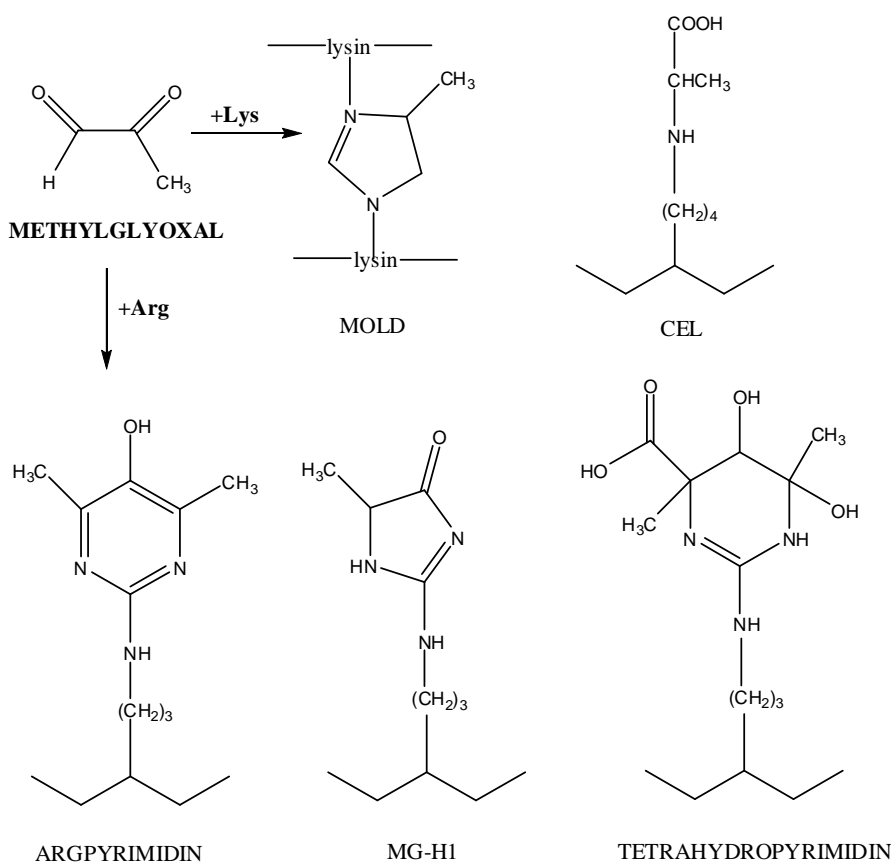
3.4 Methylglyoxal

Methylglyoxal (též pyruvaldehyd či 2-oxopropanal) je nažloutlá kapalina s charakteristickým štiplavým zápachem. Je to fyziologický metabolit tvořící se nepřetržitě ve všech živých buňkách, zároveň ale představuje jedno z nejsilnějších glykačních činidel. Vzniká především v cytosolu a to několika mechanismy. Rozpad fosfoenoldiolátové formy triosafosfátů, glyceraldehyd-3-fosfátu a dihydroxyacetonfosfátu, se považuje za převládající (Thornalley 1996). Předpokládá se, že MGO hraje významnou roli při vaskulárních komplikacích diabetu (jeho hladina je zvýšená) a může ovlivnit i energetický metabolismu buňky modifikací glykolytických dehydrogenáz. (Seidler a Kowalewski 2003)

Cílovým místem pro vazbu methylglyoxalu jsou lysinové zbytky aminokyselin. Výsledné produkty interakce MGO s lysinem zahrnují CEL a lysinové crosslinky (MOLD). Methylglyoxal ale také interaguje s argininovými zbytky za tvorby heterocyklických struktur jako jsou např. argpyrimidin a tetrahydropyrimidin a hydroimidazolony (MGO-H1) (obr. 5) existující ve třech strukturních izomerech (Shipanova a kol. 1997). Hydroimidazolony odvozené od α -dikarboxylových sloučenin jsou podle Thornalleyho měření (2003) u diabetiků nejčastější AGEs vůbec. Argpyrimidin je fluorofor vzniklý kondenzací dvou molekul MGO a následnou reakcí s argininem (Shipanova a kol. 1997). *In vitro* modifikace lidského sérového albuminu (HSA) methylglyoxalem o koncentraci 500 μ M vedla převážně k tvorbě hydroimidazolonu, kdežto při vysoké koncentraci 100 mM se tvořil především argpyrimidin (Ahmed a Thornalley 2002).

Všechny buňky disponují mechanismem, pomocí něhož čelí škodlivým účinkům methylglyoxalu. Jde o enzymatickou detoxifikaci glutathion dependentním glyoxalázovým systémem (Seidler a Kowalewski 2003). Ten se skládá ze dvou enzymů-glyoxalázy I (GLX I) a glyoxalázy II (GLX II) a katalytického množství glutathionu (GSH). MGO nejprve kondenzuje s GSH a vzniklý hemithioacetal je poté konvertován GLX I na laktoylglutathion. Tento thioester je následně hydrolyzován GLX II za vzniku D-laktátu a regenerace glutathionu. Cíleně zvýšená exprese GLX I vedla k výraznému snížení vzniku intracelulárních AGEs u buněčných kultur v hyperglykemických podmínkách (Shinohara a kol. 1998). Během glykace aminokyselin MGO se vyvíjí také superoxidový anion. Předpokládá se podle klinických

studí, že vývoj diabetu typu 2 by také mohl být zpomalen větším příjmem antioxidantů v potravě (Montonen a kol. 2004).



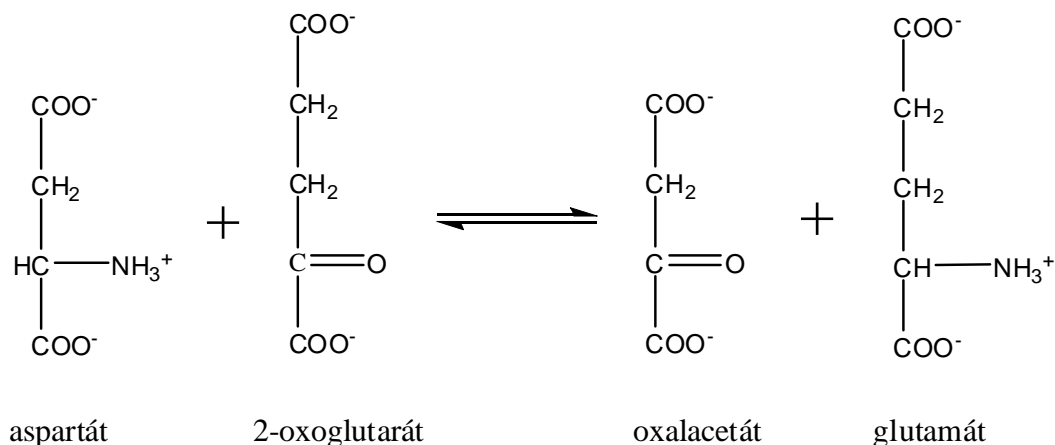
Obr 5: AGEs odvozené od MGO (Bourajjaj a kol. 2003)

3.5 Aspartátaminotrasferáza

AST patří do skupiny transferáz a je klíčovým enzymem metabolismu aminokyselin. Katalyzuje ping-pongovou reakci přenosu aminoskupiny z aspartátu na 2-oxoglutarát za vzniku oxalacetátu a glutamátu (obr 6). AST zprostředkovává spojení mezi metabolismem aminokyselin a sacharidů a podílí se na transportu redukčních ekvivalentů skrz membránu mitochondrií jako součást malát-aspartátového kyvadla (Dršata a kol. 2002).

Katalytická aktivita enzymu je v buňkách zprostředkována dvěma izoenzymy, cytosolickým a mitochondriálním, které se liší primární strukturou. Proteinová část enzymu je složena ze dvou identických, nekovalentně vázaných podjednotek vážících

jednu molekulu koenzymu na lysinovém zbytku 258 obou podjednotek. (Dršata a kol. 2002; Boušová a kol. 2005; Beránek a kol. 2002).



Obr 6: Metabolická cesta přenosu aminoskupiny katalyzovaná AST

(<http://www.brenda.uni-koeln.de/>)

Koenzym AST se vyskytuje ve dvou formách, jako pyridoxal-5'-fosfát a pyridoxamin-5'-fosfát. První forma koenzymu se vyskytuje před začátkem transaminační reakce nebo po jejím skončení. Přeměna na pyridoxamin-5'-fosfát probíhá během reakce, kdy se aspartát navázaný na koenzym přeměňuje na oxalacetát a jeho aminoskupina zůstane navázána na koenzymu, který se tím změní na pyridoxamin-5'-fosfát.

Bez ohledu na metabolickou roli, představuje enzym vhodný model pro studium glykací, protože jeho molekula obsahuje 15 – 20 lysinových zbytků, které se mohou účastnit glykace. Glykace AST reaktivními monosacharidy jako je fruktóza a glukóza je doprovázena snížením katalytické aktivity v závislosti na koncentraci a aktivitě glykačního agens (Boušová a kol. 2005). Seidler a Kowalewski (2003) předpokládali, že 6 lysinových zbytků v molekule AST je glykováno a konformační změny ve struktuře vedou ke ztrátě aktivity enzymu.

AST jako modelový enzym pro pozorování vlivu různých glykačních agens (fruktóza, glukóza, ribóza, 2-oxoglutarát) na aktivitu enzymu používali Dršata a kol. (2001) a dále Boušová a kol. (2005) pro sledování vlivu přírodních antioxidantů (fenolické sloučeniny, flavonoidy,) na aktivitu enzymu a jeho glykaci fruktózou. Na její

práci jsem navazovala při sledování vlivu potenciálních antioxidantů, hydroxyskořicových kyselin, na aktivitu enzymu a jeho glykaci methylglyoxalem. AST jako model pro zkoušení glykačního účinku glycerinaldehydu a ribosa-5-fosfátu používala i skupina Seidlera a Seibela (2000). Seidler a Kowalewski (2003) také pracovali na modelu glykace cytosolické AST methylglyoxalem podobně jako já, ale změny ve struktuře pozorovali pomocí fluorescenčních spekter.

3.6 Elektronová spektroskopie bílkovin

3.6.1 Absorpční spektroskopie

Všechny molekuly interagují s elektromagnetickým zářením. V oblastech UV záření a viditelného světla mají fotony dostatečnou energii k excitaci elektronů – přeskoku do energeticky bohatšího molekulového orbitalu. Má-li k tomuto přeskoku dojít, musí být energie fotonu rovna rozdílu energií základního a excitovaného stavu. Do oblastí vlnových délek 200 až 800 nm se absorpční maxima dostávají díky delokalizaci elektronů (konjugace, aromatické systémy). Uskutečňují se zde především přechody typu $\pi \rightarrow \pi^*$. Absorpční spektrum je spojité, elektron může přeskočit na vícero vibračních hladin excitovaného stavu a absorpční pás se takto rozšiřuje. Oproti plynnému skupenství je spektrální šíře dále zvětšována solvatací (počet možných hladin je vyšší). Pravděpodobnost a tedy intenzita absorbance jednotlivých přechodů je relativně dána překryvem vlnových funkcí. Dalším efektem solventu je posun λ_{\max} podle jeho polaritý (solvatochromní posuny). Podle směru změny se rozlišuje posun červený (bathochromní, k vyšším vlnovým délkám) a modrý (hypsochromní, k nižším vlnovým délkám). Tento jev spočívá v rozdílné elektrostatické interakci mezi molekulami rozpouštědla a dipólem chromoforu, přesněji v rozdílné míře stabilizace základního a excitovaného stavu solventem. Roli hraje změna velikosti dipólu chromoforu během excitace, tzn. typ přechodu (lokalizace molekulových orbitalů).

V molekulách bílkovin se nachází vícero chromoforů, z nichž jsou významné absorpční pásy tryptofanu (280 nm) a tyrosinu (274). Příspěvek tryptofanu je dominantní. Tyto aromatické systémy však vykazují minimální posuny λ_{\max} v závislosti na polaritě okolí. Tryptofan exponovaný vodě jeví pouze málo patrný červený posun vůči stejnému zbytku zanořeném v hydrofobním jádře bílkoviny. Změny konformace

nebo denaturace proteinu se přesto mohou na tvaru a poloze absorpčního spektra projevit. Absorpční spektroskopie je tedy do určité míry použitelná pro strukturální studie. Může se jednat o **stabilitní měření** či **sledování vazby ligandu, zkoumání vazebných míst** apod. (Vostrý 2006)

3.6.2 Fluorescenční spektroskopie

Fluorescenční spektroskopie je protipólem spektroskopie absorpční. Excitovaný elektron svoji energii ztrácí, což se může uskutečňovat několika způsoby. Po absorpci fotonu ($\sim 10^{-15}$ s) se elektron ve všech případech rychle vrací na nejnižší vibrační hladinu excitovaného stavu uvolněním tepla (vnitřní konverze, $\sim 10^{-12}$ s). Pokud je tato hladina energeticky blízko nebo dokonce níže než nevyšší vibrační hladina základního stavu, dojde k další vnitřní konverzi a elektron se vrací do základního stavu. Pokud má ale tato hladina výrazně nižší energii, elektron v ní po určitou dobu zůstává ($\sim 10^{-8}$ s). Nyní může elektron vyzářit foton (fluorescence), předat energii okolním molekulám či atomům (zhášení) nebo přejít do triplexového stavu (tzv. intersystem crossing) a následně vyzářit foton (fosforescence, $\sim 10^{-1}$ s, v roztoku zřídka). Během trvání excitovaného stavu může být fluorofor kovalentně modifikován a ztratit fluorescenční vlastnosti (photobleaching). V případě **fluorescence** se elektron vrací na jednu z vibračních hladin základního stavu. Doba, po kterou elektron setrvá v excitovaném stavu před emisí fotonu, se nazývá doba života fluorescence (fluorescence lifetime, τ). Vyzářený foton má vždy nižší energii než absorbovaný, fluorescenční spektrum je tedy vždy posunuto do červené oblasti (Stokesův posun). Doba života fluorescence dovoluje oproti absorpci reorientaci molekul solventu, což snižuje energii excitovaného stavu. Z toho vyplývá výrazně vyšší citlivost polohy emisního maxima k polaritě rozpouštědla. Obecně pak vysokou citlivost fluorescenčních měření ve srovnání s absorpčními podtrhuje samotná povaha diskutovaných jevů – vznik „něčeho malého“ versus úbytek „něčeho velkého“.

Při fluorescenčních experimentech se sleduje závislost intenzity emitovaného záření na různých parametrech – vlnové délce excitačního či emisního záření (klasické fluorescenční spektrum), času, koncentraci zhášeče apod. Absolutním měřítkem intenzity fluorescence je tzv. kvantový výtěžek – poměr počtu emitovaných kvant ku absorbovaným neboli pravděpodobnost, že elektron ztratí energii zářivým způsobem. Intenzita se nejčastěji vyjadřuje v relativních jednotkách (AU – arbitrary units).

Zhášení fluorescence (snižování intenzity fluorescence) může být způsobeno řadou endogenních i exogenních molekul (zhášecí). Kolizní (dynamický) mechanismus zahrnuje kontakt fluoroforu a zhášecí během excitovaného stavu a pokles doby života fluorescence. Pokud fluorofor vytváří se zhášecí permanentní nefluoreskující komplex, jedná se o statické zhášení. Závislost intenzity záření na koncentraci zhášecí vyjadřuje tzv. **Stern-Volmerův diagram**.

Za fluorescenční vlastnosti proteinů zodpovídají aromatické aminokyseliny. Jelikož je podíl tryptofanu na emisi fotonů dominantní, používá se pro vnitřní fluorescenci bílkovin také termín tryptofanová fluorescence. Tyrosin a fenylalanin jsou velmi slabé fluorofory. Využití tyrosinové fluorescence v praxi se omezuje jen na „beztryptofanové“ bílkoviny. Fluorofory jsou také některé prostetické skupiny bílkovin či kofaktorů enzymů (porfyrity, NAD apod.). Jejich fluorescenčních (někdy i zhášecích) vlastností lze využít při vazebných studiích (Vostrý 2006).

Konformační změny AST pod vlivem různých koncentrací MGO zkoumali Seidler a kol. (2002) pomocí fluorescenční spektroskopie. Intenzita fluorescence se vlivem MGO snižovala a emisní maximum se posouvalo k vyšším vlnovým délkám. Stejným způsobem sledovali Jiang Min (2004) interakce lidského sérového albuminu s vybranými hydroxyskořicovými kyselinami. Potvrdili, že se zvyšující se koncentrací vybraných hydroxyskořicových kyselin intenzita fluorescence klesá a že afinita HCAs k proteinu (HSA) klesá se snižujícím se počtem hydroxylových skupin. V mé práci jsem fluorescenční spektra využívala ke studiu interakcí mezi hydroxyskořicovými kyselinami a AST.

3.7 Terapeutické možnosti ovlivnění AGEs

Zájem o terapeutický potenciál a prevenci tvorby AGE produktů se stále zvyšuje (Jakuš 2003). Patologické působení produktů pozdní glykace je možné ovlivnit **inhibicí jejich tvorby, stimulací jejich degradace a blokováním receptoru RAGE**. Kromě farmakologických zásahů je možná alternativní podpůrná léčba v podobě antioxidantů, které blokují vznik AGEs oxidační cestou, inhibují lipoperoxidaci a působí proti oxidačnímu stresu (Janebová a kol. 1999).

3.7.1 Antioxidanty přírodního původu

Velká pozornost se věnuje potenciálním antioxidantům přírodního původu, protože jejich množství obsažené v rostlinách je značné a jejich denní příjem často dosahuje i jednoho gramu (Slanina a Táborská 2004). Epidemiologické studie ukazují, že rostlinná potrava chrání organismus před degenerativními onemocněními jako je např. rakovina a kardiovaskulární nemoci. Rostlinná potrava obsahuje vlákninu, vitamíny, fytosteroly, karotenoidy a organické kyseliny, které mají zdraví prospěšný efekt, ale i **polyfenoly**, které jsou považovány za velice efektivní protektivní agens. Předpokládá se, že na protektivním účinku polyfenolů se podílí schopnost zhášet reaktivní kyslíkové radikály a omezovat jejich tvorbu chelatací iontů přechodných kovů, především kationů železa, které jsou schopny generovat vysoce reaktivní hydroxylové radikály. Polyfenoly chrání lipoproteiny o velmi nízké hustotě před oxidační modifikací, která je považována za jeden z klíčových dějů při rozvoji aterosklerózy.

Polyfenoly představují širokou paletu sloučenin, které jsou rozděleny do několika skupin: fenolické kyseliny (hydroxybenzoové kyseliny, hydroxykořicové kyseliny), flavonoidy (antokyaniny, proantokyanidiny, flavonoly ,flavony, izoflavony, flavanoly, flavanony), stilbeny, lignany (Manach a kol. 2005).

Denní příjem polyfenolů je mnohem vyšší než příjem antioxidantů jako jsou tokoferoly, karoteny nebo askorbová kyselina. Rovněž v testech antioxidantní aktivity polyfenoly často předčí vitamíny nebo endogenní antioxidanty jako je např. kyselina močová. Hlavními zdroji polyfenolů jsou především nápoje (víno, káva, čaj, ovocné džusy), čokoláda a ovoce. Na celkovém příjmu polyfenolů se flavonoidy podílí asi ze dvou třetin, fenolové kyseliny přibližně jednou třetinou a ostatní polyfenoly (lignany a stilbeny) tvoří minoritní podíl. V rostlinách se flavonoidy vyskytují převážně jako β -glykosidy, kde cukernou složku mohou tvořit nejčastěji glukóza nebo rhamnóza, méně častá je kyselina glukuronová nebo galaktóza (Slanina a Táborská 2004).

Hlavním místem resorpce polyfenolů v trávicím traktu je tenké a tlusté střevo. Existují však důkazy, že některé polyfenoly přijímané v nápojích se mohou částečně resorbovat již v dutině ústní. Po vypití zeleného čaje byla koncentrace katechinů ve slinách o dva řády vyšší než v plazmě. Přestože se některé flavonoidy resorbují z trávicího traktu ve formě glykosidů, odštěpení polární složky je nezbytné pro prostou difúzi většiny polyfenolů přes kartáčový lem buněk tenkého střeva. Polyfenoly, které nejsou resorbovány v tenkém střevě, se dostávají do tlustého střeva, kde jsou

metabolizovány střevními bakteriemi. Dochází převážně k hydrolytickým a redukčním reakcím (Slanina a Táborská 2004).

Po resorpci jsou polyfenoly konjugovány s kyselinou glukuronovou buňkami střevní mukózy, dále mohou být v játrech nebo i v jiných tkáních konjugovány s kyselinou glukuronovou, sírovou nebo glycinem. Methylace katechol-O-methyltransferázou (COMT) probíhá v játrech nebo v ledvinách. UDP-glukuronyltransferázy jsou lokalizovány v membránách endoplazmatického retikula, fenolsulfotransferázy jsou cytosolové enzymy. Předpokládá se, že konjugované polyfenoly díky své amfipatické struktuře mohou být lokalizovány na povrchu LDL-lipoproteinů a účinně tak bránit jejich oxidační modifikaci.

Polyfenoly se vylučují z organismu převážně ve formě polárních ve vodě dobře rozpustných konjugátů močí a žlučí. Předpokládá se, že může docházet k enterohepatálnímu oběhu polyfenolů, který prodlužuje vylučování polyfenolů z organismu.

Množství polyfenolů v krevní plazmě a moči se stanovuje většinou vysokoúčinnou plynovou chromatografií s elektrochemickou, fluorescenční nebo hmotnostní detekcí. Detekce v UV oblasti je méně vhodná s ohledem na nedostatečnou citlivost a specifitu detekce.

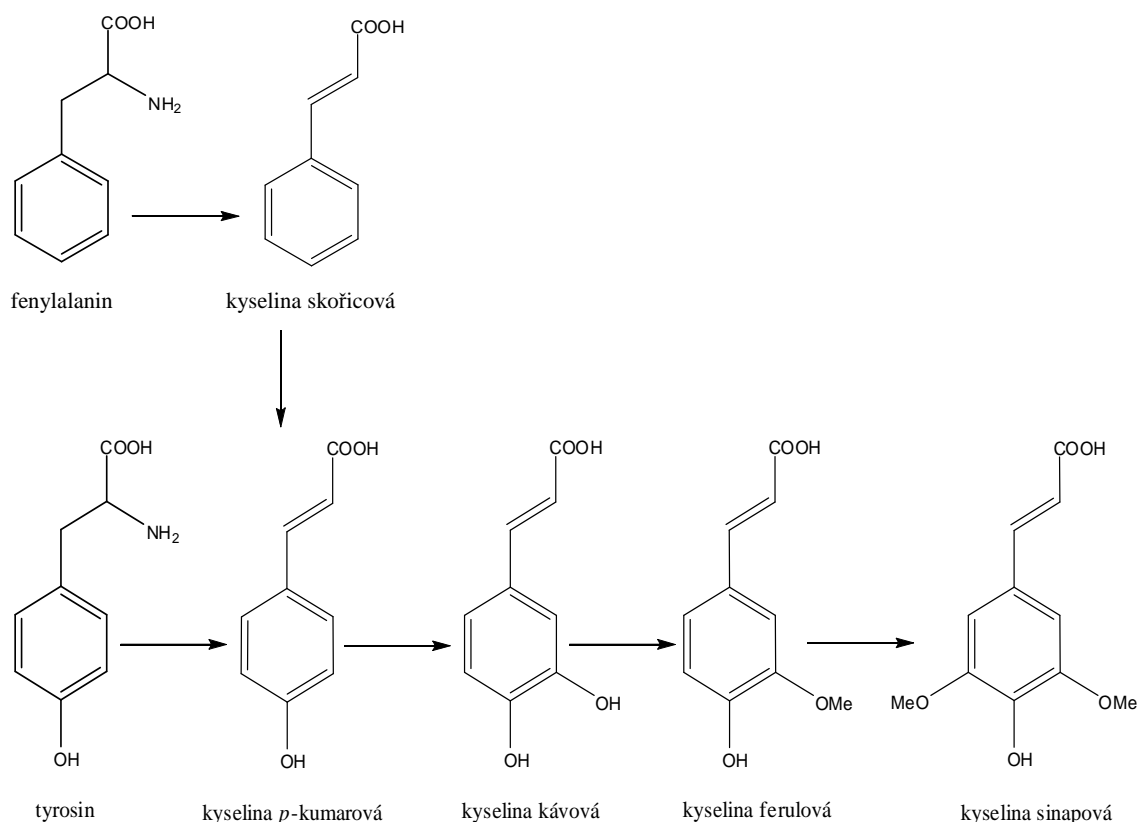
Rostlinné polyfenoly, i přesto že představují významnou část antioxidantů přítomných v naší potravě, mohou mít i řadu nepříznivých účinků. Zejména ve vysokých koncentracích mohou působit prooxidačně, mutagenně, genotoxicky či strumigenně. Dlouhodobý efekt a bezpečnost příjmu rostlinných polyfenolů v dávkách, které převyšují jejich obsah v potravinách, není známa (Slanina a Táborská 2004).

3.7.1.1 Hydroxyskořicové kyseliny

Hydroxyskořicové kyseliny se spolu s hydroxybenzoovými kyselinami řadí k fenolickým kyselinám. Kyseliny hydroxyskořicové jsou syntetizovány cestou kyseliny šikimové (Rice-Evans a kol. 1997). Deaminací fenylalaninu enzymem fenylalaninammoniumlyáza (PAL) vzniká kyselina skořicová a deaminací tyrosinu enzymem tyrosinammoniumlyáza (TAL) vzniká kyselina *p*-kumarová. Další HCAs vznikají přímou hydroxylací skořicové kyseliny (Dewick 2002) (obr 7).

Oproti hydroxybenzoovým kyselinám je antioxidační účinek hydroxyskořicových kyselin vyšší, potencovaný vsunutím ethylenové skupiny mezi fenylový kruh a

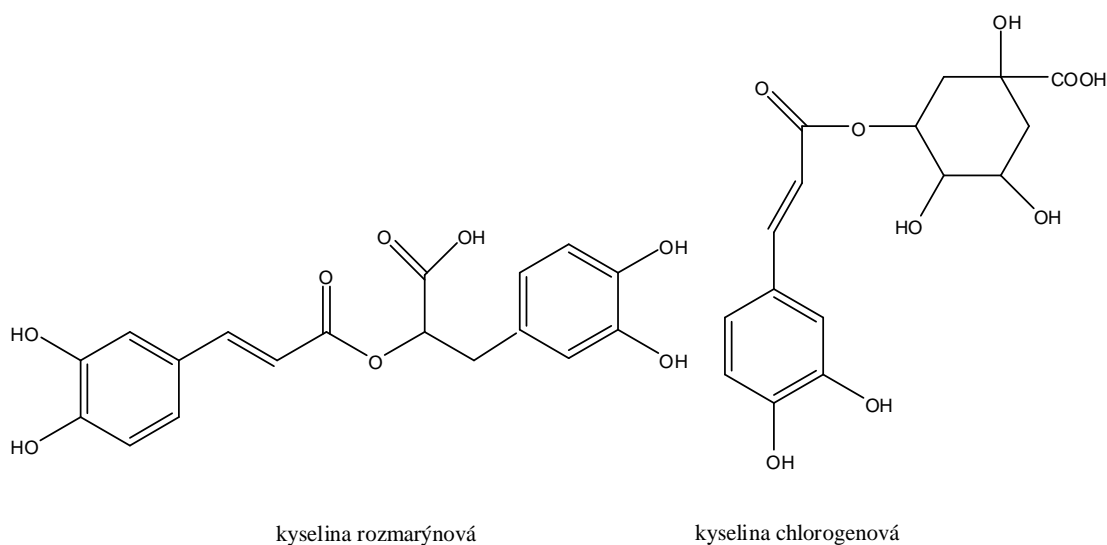
karboxylovou skupinu (Rice-Evans a kol. 1996). Antioxidační efekt také zvyšuje hydroxylová skupina (*o*, *m*, *p*-kumarová). Při srážce s radikálem dojde k odejmutí H[•] atomu za vzniku fenoxyllového radikálu. Ten je rezonančně stabilizován delokalizací tohoto nepárového elektronu po celé molekule včetně postranního řetězce. Antioxidační a antiradikálovou aktivitu zvyšuje další hydroxylová skupina v poloze *ortho* (myšleno OH skupiny k sobě navzájem – kyselina kávová). Methylace OH skupiny aktivitu snižuje vlivem mírné destabilizace (kyselina ferulová, sinapová) (Sroka a Cisowski 2002). Aktivitu také zvyšuje esterifikace kyselinou chinovou (kyselina chlorogenová) (obr. 8).



Obr 7: Biosyntéza hydroxyskořicových kyselin v rostlinách (Rice-Evans a kol. 1996)

Hydroxyskořicové kyseliny jsou skupinou látek široce distribuovaných v rostlinné říši. Obvykle existují jako estery organických kyselin a sacharidů, nebo jsou navázané na proteiny a jiné polymery buněčné stěny. Jen malý počet z nich existuje ve volné formě. Nejrozšířenější z nich jsou **kyselina kávová** a **chlorogenová**. Můžeme je najít hlavně v bramborách, vyšší koncentrace je ve slupce než v samotném těle hlízy. Tyto fenolické sloučeniny jsou zodpovědné za enzymatické hnědnutí brambor. Za barvu a

vůni jsou zodpovědné i u kávových zrn, kde představují 5-10 % jejich váhy (Chen a Ho 1997). Olthof a kol. (2001) ukázali, že esterifikace kyseliny kávové (kyselina chlorogenová) sníží absorpci. Kyselina chlorogenová se absorbuje v tlustém střevě po hydrolyze mikrobiálními esterázami. Kyselina kávová je v tlustém střevě dehydroxylována, přednostně v poloze *para*, za vzniku kyseliny ***m*-kumarové** (Slanina a Táborská 2004). Zda je kyselina chlorogenová v lidské plazmě přítomna jako konjugovaná či nikoli není dosud jasné. Nardini a kol. (2002) v plazmě našli pouze kyselinu kávovou. Je to možná způsobeno úpravou vzorku, kam se přidává β -glukuronidáza z *Helix pomatia* k rozštěpení konjugátů, ale obsahuje také esterázy které mohou vést k rozštěpení kyseliny chlorogenové na její stavební prvky. Neporušené chlorogenové kyseliny byly však detekovány v nízké koncentraci v moči (Olthof a kol. 2001). Kyselina kávová se metabolizuje COMT v játrech na **kyselinu ferulovou**. V potravě je kyselina ferulová součástí vlákniny, kde je esterovou vazbou vázána na hemicelulózy (Slanina a Táborská 2004). Tato vazba brání absorpci kyseliny u krys (Manach a kol. 2005). Kern a kol. (2003) měřili u lidí urinární exkreci a plazmatickou koncentraci metabolitů ferulové kyseliny po příjmu cereálií. Z kinetických dat mohli vydedukovat, že k absorpci kyseliny z cereálií dochází hlavně v tenkém střevě. Jako volná se kyselina ferulová vyskytuje v pivu a bramborech a v této formě může být i efektivně absorbována. (Manach a kol. 2005). Fenylestery kyseliny kávové a ferulové jsou přítomny i v propolisu. **Kyselina rozmarýnová** a **sinapová** se většinou vyskytují společně s ostatními hydroxyskořicovými kyselinami (Spilková a Dušek 1996).



Obr 8.: Další deriváty kyseliny skořicové

4. CÍLE PRÁCE

1. Zavedení modelu glykace methylglyoxalem a navržení optimálního časového rozmezí pokusu a koncentrací AST a MGO pro další měření.
2. Prověření stability používaných hydroxyskořicových kyselin.
3. Zjištění vlivu potenciálních antioxidantů na aktivitu AST a jejich účinek na zpomalení glykace enzymu methylglyoxalem. Srovnání účinku HCAs podle polohy a počtu hydroxylových skupin
4. Sledování interakcí HCAs s molekulou enzymu pomocí absorpčních spekter.
5. Sledování interakcí mezi HCAs a enzymem pomocí fluorescenčních spekter a z nich vycházejících Stern-Volmerových diagramů.

5. MATERIÁL A METODIKA

5.1 Použitý materiál

Aspartátaminotransferasa AST	Roche Diagnostics GmbH, Germany
Methylglyoxal (MGO), 40% roztok 5,55 M	Sigma-Aldrich GmbH, Germany
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát p.a.	Penta Chrudim
Dihydrogen fosforečnan sodný dihydrát p.a.	Lachema Neratovice
Azid sodný p.a.	Lachema Neratovice
Kyselina ferulová, sinapová, rozmarýnová, chlorogenová, kávová, <i>o</i> -kumarová, <i>m</i> -kumarová, <i>p</i> -kumarová	Sigma-Aldrich GmbH, Germany
Ultračistá voda	Katedra biochemických věd
Methanol pro HPLC	Sigma-Aldrich GmbH, Germany

5.2 Použitá zařízení

Chlazená centrifuga Biofuge Stratos Heraeus
Digitální váhy Sartorius CP 225D
pH metr inoLab pH Level 2
Fluorescenční spektrofotometr Perkin-Elmer LS 50B
Spektrofotometr Helios β
Spektrofotometr Hewlett Packard 8453
Inkubátor Memmert

5.3 Metodika

5.3.1 Příprava reagensií

5.3.1.1 Příprava pufru

Používala jsem 0,1 M fosfátový pufr o pH 7,4 s přídavkem 0,05% azidu sodného jako protimikrobní látky. Pufr jsem připravovala smísením 810 ml 0,2 M vodného roztoku $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a 190 ml 0,2 M vodného roztoku $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ s 1000 ml ultračisté vody. Po přidání a rozpuštění 1g azidu sodného jsem získala 0,05% roztok. Následně jsem zkontrolovala a popřípadě upravila pH připraveného pufru na hodnotu 7,4 pomocí pH metru.

5.3.1.2 Příprava enzymu

AST o koncentraci 10 mg/ml jsem centrifugovala 20 minut při 8°C při 5000 otáčkách za minutu. Supernatant jsem odpipetovala a peletu, ve které se vyskytoval enzym, jsem přenesla do 10 ml 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,4, čímž jsem získala zásobní roztok AST o koncentraci 1 mg/ml. Pro další měření jsem zásobní roztok AST ředila podle požadavků metody.

5.3.1.3 Příprava roztoků hydroxyskořicových kyselin (HCA)

Roztoky příslušných koncentrací jsem získala rozpuštěním přesné navážky látky v odpovídajícím množství methanolu.

5.3.1.4 Příprava roztoku methylglyoxalu

40% roztok methylglyoxalu jsem si naředila odpovídajícím množstvím ultračisté vody tak, abych získala 2 mM, 1 mM, 0,5 mM a 0,1 mM roztok.

5.3.2 Příprava inkubačních směsí pro:

5.3.2.1 Sledování vlivu MGO na aktivitu AST

K měření byly použity tři koncentrace AST (5, 25 a 50 $\mu\text{g/ml}$) a čtyři koncentrace MGO (50, 250, 500, 1000 $\mu\text{mol/l}$). Inkubační směsi byly připraveny podle níže uvedených tabulek a během čtyřhodinového experimentu inkubovány při 37°C.

Zkumavka	ml enzymu 10 $\mu\text{g/ml}$	ml pufru	ml MGO 0,1 mM	ml MGO 0,5 mM	ml MGO 1 mM	ml MGO 2 mM
AST (5 $\mu\text{g/ml}$)	0,5	0,5	0	0	0	0
AST (5 $\mu\text{g/ml}$) + MGO (50 μM)	0,5	0	0,5	0	0	0
AST (5 $\mu\text{g/ml}$) + MGO (250 μM)	0,5	0	0	0,5	0	0
AST (5 $\mu\text{g/ml}$) + MGO (500 μM)	0,5	0	0	0	0,5	0
AST (5 $\mu\text{g/ml}$) + MGO (1000 μM)	0,5	0	0	0	0	0,5

Zkumavka	ml enzymu 50 $\mu\text{g/ml}$	ml pufru	ml MGO 0,1 mM	ml MGO 0,5 mM	ml MGO 1 mM	ml MGO 2 mM
AST (25 $\mu\text{g/ml}$)	0,5	0,5	0	0	0	0
AST (25 $\mu\text{g/ml}$) + MGO (50 μM)	0,5	0	0,5	0	0	0
AST (25 $\mu\text{g/ml}$) + MGO (250 μM)	0,5	0	0	0,5	0	0
AST (25 $\mu\text{g/ml}$) + MGO (500 μM)	0,5	0	0	0	0,5	0
AST (25 $\mu\text{g/ml}$) + MGO (1000 μM)	0,5	0	0	0	0	0,5

Zkumavka	ml enzymu 100 $\mu\text{g/ml}$	ml pufru	ml MGO 0,1 mM	ml MGO 0,5 mM	ml MGO 1 mM	ml MGO 2 mM
AST (50 $\mu\text{g/ml}$)	0,5	0,5	0	0	0	0
AST (50 $\mu\text{g/ml}$) + MGO (50 μM)	0,5	0	0,5	0	0	0
AST (50 $\mu\text{g/ml}$) + MGO (250 μM)	0,5	0	0	0,5	0	0
AST (50 $\mu\text{g/ml}$) + MGO (500 μM)	0,5	0	0	0	0,5	0
AST (50 $\mu\text{g/ml}$) + MGO (1000 μM)	0,5	0	0	0	0	0,5

5.3.2.2 *Sledování účinku jednotlivých antioxidantů na aktivitu AST a její glykaci MGO*

Směsi byly připraveny podle níže uvedené tabulky a po dobu měření inkubovány při 37°C. Před vlastním měřením se směsi ještě dále naředily na koncentraci vhodnou ke stanovení, viz. měření katalytické aktivity AST pomocí kinetické UV metody.

Zkumavka	μl enzymu 0,01 mg/ml	μl HCA	μl MGO 1 mM	μl pufru	Celkový objem v μl
AST	1000	0	0	1000	2000
AST + MGO	1000	0	1000	0	2000
AST + HCA	1000	2	0	1000	2000
AST + HCA + MGO	1000	2	1000	0	2000

5.3.2.3 *Sledování stability jednotlivých HCA*

Inkubační směsi pro sledování stability HCA jsem připravovala ze zásobních roztoků jednotlivých kyselin v čas potřeby smísením 1 ml pufru s 5 μl zásobního roztoku HCA (10 mM) v kyvetě. Vzniklý roztok HCA měl koncentraci 50 μM. Během třítydenního experimentu byla část zásobních roztoků inkubována při pokojové teplotě a část při 4°C.

5.3.2.4 *Sledování vlivu HCA na fluorescenci Trp zbytků v molekule AST (zhášení fluorescence)*

Inkubační směsi pro pozorování zhášení fluorescence tryptofanových zbytků v molekule AST vlivem HCA jsem připravovala postupným přidáváním roztoku HCA do kyvety obsahující roztok AST (0,45 mg/ml) podle následující tabulky. Po každém přidavku jsem směs 5 minut inkubovala za stálého míchání při 37°C.

Zkumavka	μl enzymu 0,45 mg/ml	μl HCA 1 mM	μl HCA 5 mM	μl HCA 10 mM	konečná koncentrace HCA μM
AST	3000	0	0	0	0,0
+ HCA	0	1,5	0	0	0,5
+ HCA	0	1,5	0	0	1,0
+ HCA	0	4,5	0	0	2,5
+ HCA	0	7,5	0	0	5,0
+ HCA	0	0	1,5	0	7,5
+ HCA	0	0	1,5	0	10,0
+ HCA	0	0	9	0	25,0
+ HCA	0	0	0	7,5	50,0
+ HCA	0	0	0	15	100,0

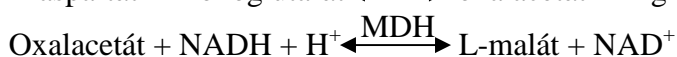
5.3.2.5 Sledování vlivu HCA na profil UV-VIS absorpčního spektra AST

Inkubační směsi pro sledování vlivu HCA na profil UV-VIS absorpčního spektra AST jsem připravovala podle následujícího rozpisu. Po každém přidavku jsem směs důkladně promíchala a inkubovala 5 minut při pokojové teplotě.

Zkumavka	μl enzymu 0,45 mg/ml	μl HCA 1 mM	μl HCA 10 mM	konečná koncentrace HCA μM
AST	1000	0	0	0,0
+ HCA	0	0,5	0	0,5
+ HCA	0	0,5	0	1,0
+ HCA	0	1,5	0	2,5
+ HCA	0	2,5	0	5,0
+ HCA	0	2,5	0	7,5
+ HCA	0	2,5	0	10,0
+ HCA	0	0	1,5	25,0
+ HCA	0	0	2,5	50,0
+ HCA	0	0	5,0	100,0

5.3.3 Měření katalytické aktivity AST pomocí kinetické UV metody

AST katalyzuje přeměnu L-aspartátu a 2-oxoglutarátu na oxalacetát a L-glutamát. Oxalacetát je dále přeměňován malátdehydrogenázou na L-malát při současné přeměně NADH na NAD⁺. Princip metody spočívá ve fotometrickém stanovení úbytku NADH při 340 nm, který je přímo úměrný vzniku oxalacetátu a tedy i aktivitě AST.



Jednotlivá činidla jsem do inkubační směsi přidávala v pořadí dle následující tabulky:

Odměřit v ml	Vzorek
Pracovní roztok	1,00
Sérum	0,10
Promíchá se a inkubuje se 10 minut při 37°C	
Činidlo 2	0,10
Promíchá se, inkubuje se 2 minuty při 37°C a měří se absorbance v 1 minutových intervalech po dobu nejméně 3 minut. Vypočte se průměrná změna absorbance za 1 minutu.	

Pozn. : Pracovní roztok: Obsah lahvičky s činidlem 1 (enzym – MDH, NADH) se rozpustí ve 100 ml roztoku činidla 3 (substrát - L-aspartát) a po rozpuštění se přidají 2 tablety činidla 4 (aktivátor - pyridoxal-5-fosfát)

Činidlo 2: startér – 2-oxoglutarát

Na začátku každého pokusu bylo třeba stanovit optimální ředění inkubačních směsí tak, aby jejich aktivita odpovídala lineární oblasti měřitelnosti metody (do 7 $\mu\text{kat/l}$) a zároveň byla dostatečně vysoká a dala se stanovit v průběhu celého pokusu. Optimální ředění jsem určovala z výsledků získaných při naředění směsi obsahující enzym samotný na několik různých koncentrací. K naředění jsem používala 0,1 M fosfátový pufr s přídatkem azidu. Vybrané ředění jsem připravovala vždy v triplikátu a ze získaných dat jsem vypočítala průměrnou hodnotu a směrodatnou odchylku. Měření jsem prováděla na spektrofotometru He λ ios β na katedře biochemických věd FaF UK za použití Sady činidel AST-UV 400 P, BIO-LA-TEST.

5.3.4 Měření stability jednotlivých HCA

Inkubační směsi pro měření stability jednotlivých HCA jsem připravovala dle popisu uvedeného výše v čas potřeby z jednotlivých zásobních roztoků těchto kyselin. Část zásobních roztoků jsem během třítydenního experimentu uchovával v lednici při 4°C a část při pokojové teplotě. Absorpční spektra inkubačních směsí jsem zaznamenávala na spektrofotometru Hewlett Packard 8453 na katedře biofyziky a fyzikální chemie FaF UK v rozsahu vlnových délek 190 až 550 nm.

5.3.5 Měření fluorescence Trp zbytků v molekule AST (zhášení fluorescence)

Do kyvety jsem si napipetovala 3 ml roztoku AST (0,45 mg/ml) a v pětiminutových intervalech za stálého míchaní a inkubace při 37°C jsem přidávala roztoky HCA tak, abych získala požadovanou koncentraci (viz. tabulka výše). Měření jsem prováděla na fluorescenčním spektrofotometru Perkin-Elmer LS 50B na katedře biochemických věd FaF UK při excitační vlnové délce 295 nm. Emisní spektra byla proměřena v rozsahu vlnových délek 315 – 500 nm. Excitační i emisní štěrbinu byla nastavena na 5 nm a rychlost skenování byla 200 nm/minutu.

5.3.6 Měření vlivu HCA na profil UV-VIS absorpčního spektra AST

K 1 ml roztoku AST (0,45 mg/ml) jsem v pětiminutových intervalech přidávala podíly HCA dle výše uvedené tabulky tak, abych získala požadovanou koncentraci HCA. Inkubační směs jsem pokaždé po přidání podílu HCA důkladně promíchala. Absorpční spektra inkubačních směsí jsem zaznamenávala na spektrofotometru Hewlett Packard 8453 na katedře biofyziky a fyzikální chemie FaF UK ve vlnových délkách od 190 do 550 nm. Směs byla inkubována při pokojové teplotě.

6. VÝSLEDKY

6.1 *Sledování vlivu MGO na aktivitu AST*

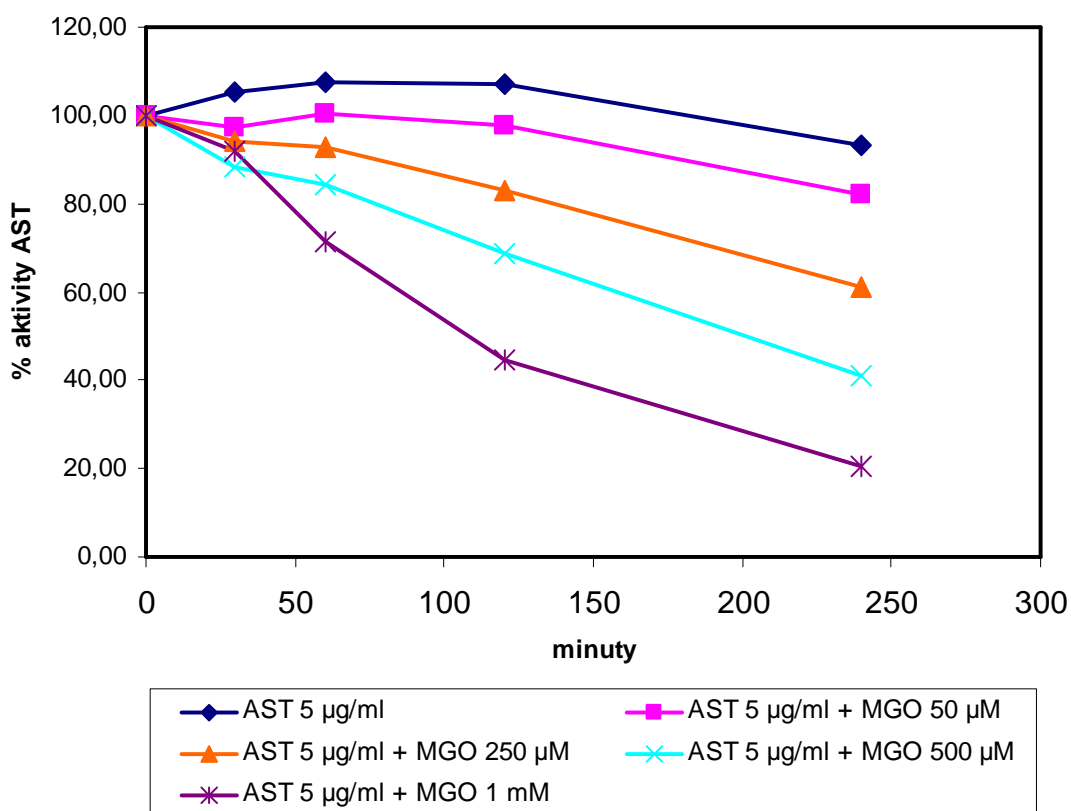
Vliv methylglyoxalu na aktivitu AST byl patrný ve všech inkubačních směsích. Míra poklesu aktivity AST (5, 25 a 50 µg/ml) korelovala se zvyšující se koncentrací MGO (50, 250, 500 µM a 1 mM). Z toho je patrné, že nejsilnější glykační účinek vykazuje MGO o nejvyšší zkoušené koncentraci (1 mM). Výsledky jsou dokumentovány v tabulkách 1 a 2 a v obrázku 9.

Tabulka 1: Vliv různých koncentrací MGO (50, 250, 500 µM a 1 mM) na aktivitu AST (5, 25, 50 µg/ml) v průběhu čtyřhodinové inkubace při 37°C. Měřeno kinetickou UV metodou. Výsledky jsou vyjádřeny enzymové aktivity AST (µkat/l) v průběhu inkubace. Hodnoty představují průměr ze tří měření ± směrodatná odchylka (SD).

Vzorek Inkubace při 37°C (minuty)	Aktivita AST (µkat/l)				
	0	30	60	120	240
AST 5 µg/ml	3,664 ± 0,2052	3,862 ± 0,0762	3,939 ± 0,0634	3,918 ± 0,0458	3,424 ± 0,1189
AST 5 µg/ml + MGO 50 µM	3,926 ± 0,0242	3,820 ± 0,0242	3,936 ± 0,0441	3,844 ± 0,0320	3,218 ± 0,0229
AST 5 µg/ml + MGO 250 µM	3,822 ± 0,0510	3,598 ± 0,2437	3,550 ± 0,0584	3,173 ± 0,0419	2,343 ± 0,0079
AST 5 µg/ml + MGO 500 µM	3,775 ± 0,0732	3,342 ± 0,0835	3,188 ± 0,0286	2,591 ± 0,0121	1,553 ± 0,0199
AST 5 µg/ml + MGO 1 mM	3,635 ± 0,0645	3,334 ± 0,0210	2,591 ± 0,0539	1,627 ± 0,1066	0,748 ± 0,1009
AST 25 µg/ml	2,407 ± 0,0832	2,203 ± 0,1197	2,346 ± 0,0137	2,037 ± 0,0897	2,626 ± 0,1364
AST 25 µg/ml + MGO 50 µM	1,847 ± 0,0616	1,920 ± 0,1991	1,881 ± 0,1258	2,017 ± 0,0719	1,876 ± 0,0857
AST 25 µg/ml + MGO 250 µM	1,751 ± 0,01964	1,915 ± 0,0242	1,957 ± 0,0827	1,939 ± 0,1977	1,471 ± 0,0363
AST 25 µg/ml + MGO 500 µM	2,214 ± 0,1677	1,860 ± 0,0912	1,791 ± 0,1618	1,479 ± 0,2242	1,220 ± 0,1475
AST 25 µg/ml + MGO 1 mM	2,444 ± 0,1647	1,728 ± 0,2148	1,593 ± 0,1421	1,001 ± 0,2522	0,555 ± 0,0919
AST 50 µg/ml	3,244 ± 0,0464	2,813 ± 0,1716	2,879 ± 0,1034	2,901 ± 0,1268	4,018 ± 0,2260
AST 50 µg/ml + MGO 50 µM	2,919 ± 0,1625	3,100 ± 0,1387	2,647 ± 0,0407	2,655 ± 0,1309	2,829 ± 0,1072
AST 50 µg/ml + MGO 250 µM	3,207 ± 0,3575	2,980 ± 0,1151	2,639 ± 0,4464	2,544 ± 0,2367	2,124 ± 0,1421
AST 50 µg/ml + MGO 500 µM	3,310 ± 0,2165	2,766 ± 0,3638	2,530 ± 0,3089	2,309 ± 0,2342	1,659 ± 0,1309
AST 50 µg/ml + MGO 1 mM	3,096 ± 0,1815	2,581 ± 0,1046	1,873 ± 0,2932	1,371 ± 0,1950	0,903 ± 0,3625

Tabulka 2: Vliv různých koncentrací MGO (50, 250, 500 μM a 1 mM) na aktivitu AST v průběhu čtyřhodinové inkubace při 37°C. Koncentrace enzymu v inkubační směsi byla 5 $\mu\text{g/ml}$. Měřeno kinetickou UV metodou. Výsledky jsou procentuálním vyjádřením aktivit inkubačních směsí v čase 0. Stejným způsobem jsem zpracovala výsledky ostatních koncentrací AST (25 a 50 $\mu\text{g/ml}$).

Vzorek Inkubace 37°C (minuty)	Procentuální vývoj aktivity AST				
	0	30	60	120	240
AST 5 $\mu\text{g/ml}$	100,00	105,41	107,50	106,92	93,44
AST 5 $\mu\text{g/ml}$ + MGO 50 μM	100,00	97,31	100,27	97,91	81,97
AST 5 $\mu\text{g/ml}$ + MGO 250 μM	100,00	94,13	92,88	83,00	61,30
AST 5 $\mu\text{g/ml}$ + MGO 500 μM	100,00	88,52	84,46	68,65	41,15
AST 5 $\mu\text{g/ml}$ + MGO 1 mM	100,00	91,72	71,29	44,77	20,57



Obr. 9: Vliv různých koncentrací MGO (50, 250, 500 μM a 1 mM) na aktivitu AST v průběhu čtyřhodinové inkubace při 37°C. Koncentrace enzymu v inkubační směsi byla 5 $\mu\text{g/ml}$. Měřeno kinetickou UV metodou. Výsledky jsou procentuálním vyjádřením aktivit inkubačních směsí v čase 0. Stejným způsobem jsem zpracovala výsledky ostatních koncentrací AST (25 a 50 $\mu\text{g/ml}$).

6.2 Sledování účinku jednotlivých antioxidantů na aktivitu AST a její glykaci MGO

Tabulka 3: Vliv jednotlivých HCA (1 μM a 5 μM) na glykaci AST methylglyoxalem (MGO 0,5 mM) v průběhu čtyřhodinové inkubace při 37°C. Koncentrace enzymu v inkubačních směsích byla 5 $\mu\text{g/ml}$. Měřeno kinetickou UV metodou. Výsledky jsou vyjádřeny enzymové aktivitou AST ($\mu\text{kat/l}$) v průběhu inkubace. Hodnoty představují průměr ze tří měření \pm SD.

Vzorek Inkubace při 37°C (minuty)	Aktivita AST ($\mu\text{kat/l}$)		
	0	120	240
AST 5 $\mu\text{g/ml}$	2,169 \pm 0,0320	1,841 \pm 0,1187	2,063 \pm 0,1192
AST 5 $\mu\text{g/ml}$ + MGO 0,5 mM	2,002 \pm 0,0399	1,070 \pm 0,1101	0,679 \pm 0,0562
AST 5 $\mu\text{g/ml}$ + OK 1 μM	1,894 \pm 0,1143	1,585 \pm 0,0824	1,691 \pm 0,1022
AST 5 $\mu\text{g/ml}$ + OK 5 μM	1,725 \pm 0,0955	1,514 \pm 0,1167	1,601 \pm 0,1681
AST 5 $\mu\text{g/ml}$ + OK 1 μM + MGO 0,5 mM	1,617 \pm 0,0756	0,827 \pm 0,2015	0,573 \pm 0,0399
AST 5 $\mu\text{g/ml}$ + OK 5 μM + MGO 0,5 mM	1,545 \pm 0,0363	0,829 \pm 0,0320	0,568 \pm 0,0573
AST 5 $\mu\text{g/ml}$	3,899 \pm 0,0900	3,553 \pm 0,3390	4,282 \pm 0,1704
AST 5 $\mu\text{g/ml}$ + MGO 0,5 mM	3,764 \pm 0,0363	2,797 \pm 0,1110	1,928 \pm 0,0255
AST 5 $\mu\text{g/ml}$ + PK 1 μM	3,566 \pm 0,1936	3,379 \pm 0,0891	3,741 \pm 0,0993
AST 5 $\mu\text{g/ml}$ + PK 5 μM	3,432 \pm 0,0286	3,373 \pm 0,2381	3,701 \pm 0,2144
AST 5 $\mu\text{g/ml}$ + PK 1 μM + MGO 0,5 mM	3,236 \pm 0,1648	2,235 \pm 0,1252	1,659 \pm 0,0528
AST 5 $\mu\text{g/ml}$ + PK 5 μM + MGO 0,5 mM	2,914 \pm 0,2152	2,045 \pm 0,0677	1,614 \pm 0,0183
AST 5 $\mu\text{g/ml}$	3,500 \pm 0,1558	2,747 \pm 0,4905	2,824 \pm 0,1271
AST 5 $\mu\text{g/ml}$ + MGO 0,5 mM	3,540 \pm 0,0873	2,037 \pm 0,2973	1,366 \pm 0,1239
AST 5 $\mu\text{g/ml}$ + CA 1 μM	3,122 \pm 0,0649	2,488 \pm 0,4105	2,568 \pm 0,2781
AST 5 $\mu\text{g/ml}$ + CA 5 μM	3,202 \pm 0,0835	2,211 \pm 0,1752	2,066 \pm 0,0813
AST 5 $\mu\text{g/ml}$ + CA 1 μM + MGO 0,5 mM	2,737 \pm 0,3627	2,187 \pm 0,2608	1,387 \pm 0,0476
AST 5 $\mu\text{g/ml}$ + CA 5 μM + MGO 0,5 mM	2,798 \pm 0,1962	1,984 \pm 0,0925	1,220 \pm 0,0964
AST 5 $\mu\text{g/ml}$	3,500 \pm 0,1558	2,747 \pm 0,4905	2,824 \pm 0,1271
AST 5 $\mu\text{g/ml}$ + MGO 0,5 mM	3,540 \pm 0,0873	2,037 \pm 0,2973	1,366 \pm 0,1239
AST 5 $\mu\text{g/ml}$ + RA 1 μM	3,048 \pm 0,1303	2,433 \pm 0,1246	2,327 \pm 0,0255
AST 5 $\mu\text{g/ml}$ + RA 5 μM	2,747 \pm 0,2378	2,805 \pm 0,5041	2,673 \pm 0,0616
AST 5 $\mu\text{g/ml}$ + RA 1 μM + MGO 0,5 mM	2,655 \pm 0,0629	1,633 \pm 0,0419	1,220 \pm 0,0704
AST 5 $\mu\text{g/ml}$ + RA 5 μM + MGO 0,5 mM	2,449 \pm 0,7905	1,950 \pm 0,2265	1,252 \pm 0,0704

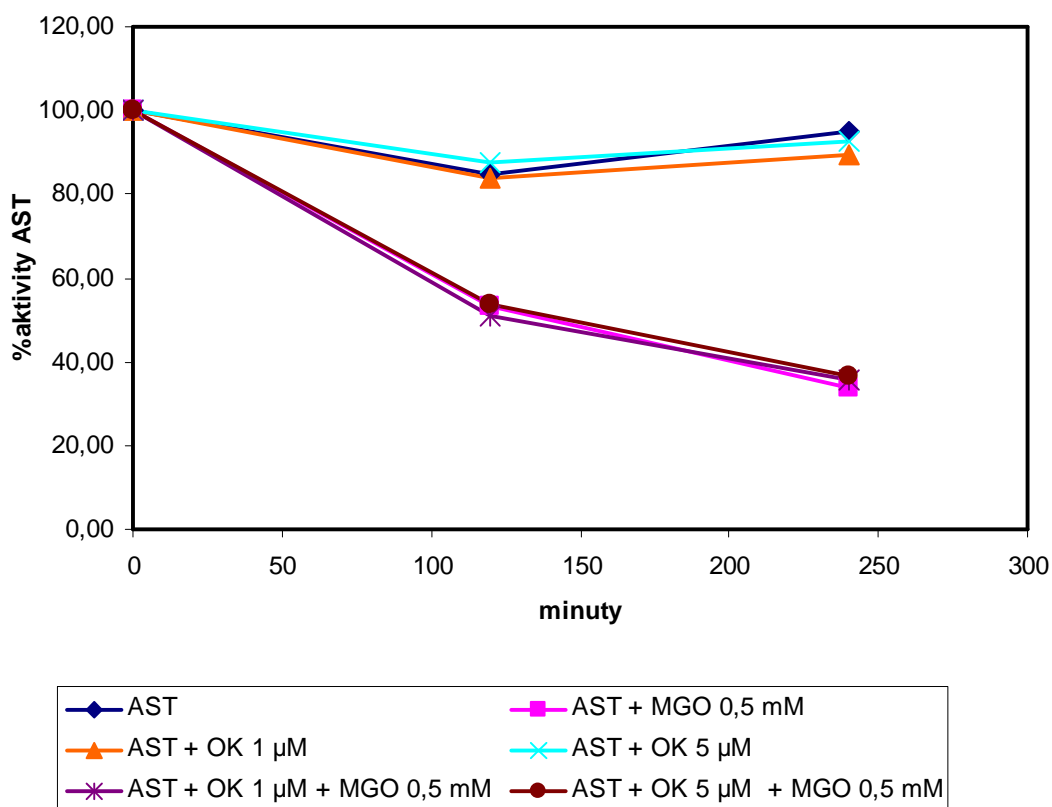
6.2.1 Kyselina *o*-kumarová

Kyselina *o*-kumarová neovlivňovala aktivitu AST v kontrolním vzorku a to ani v jedné zkoušené koncentraci.

Kyselina *o*-kumarová neměla žádný pozitivní účinek na glykaci AST methylglyoxalem. Výsledky jsou dokumentovány v tabulce 4 a v obrázku 10.

Tabulka 4: Vliv kyseliny *o*-kumarové (1 μ M a 5 μ M) na glykaci AST methylglyoxalem (MGO 0,5 mM) v průběhu čtyřhodinové inkubace při 37°C. Koncentrace enzymu v inkubační směsi byla 5 μ g/ml. Měřeno kinetickou UV metodou. Výsledky jsou procentuálním vyjádřením aktivit inkubačních směsí v čase 0.

Vzorek Inkubace při 37°C (minuty)	Procentuální vývoj aktivity AST		
	0	120	240
AST	100,00	84,90	95,13
AST + MGO 0,5 mM	100,00	53,43	33,91
AST + OK 1 μ M	100,00	83,68	89,26
AST + OK 5 μ M	100,00	87,75	92,80
AST + OK 1 μ M + MGO 0,5 mM	100,00	51,14	35,46
AST + OK 5 μ M + MGO 0,5 mM	100,00	53,68	36,75



Obr. 10: Vliv kyseliny *o*-kumarové (1 μ M a 5 μ M) na glykaci AST methylglyoxalem v průběhu čtyřhodinové inkubace při 37°C. Koncentrace enzymu v inkubační směsi byla 5 μ g/ml. Měřeno kinetickou UV metodou. Výsledky jsou procentuálním vyjádřením aktivit inkubačních směsí v čase 0.

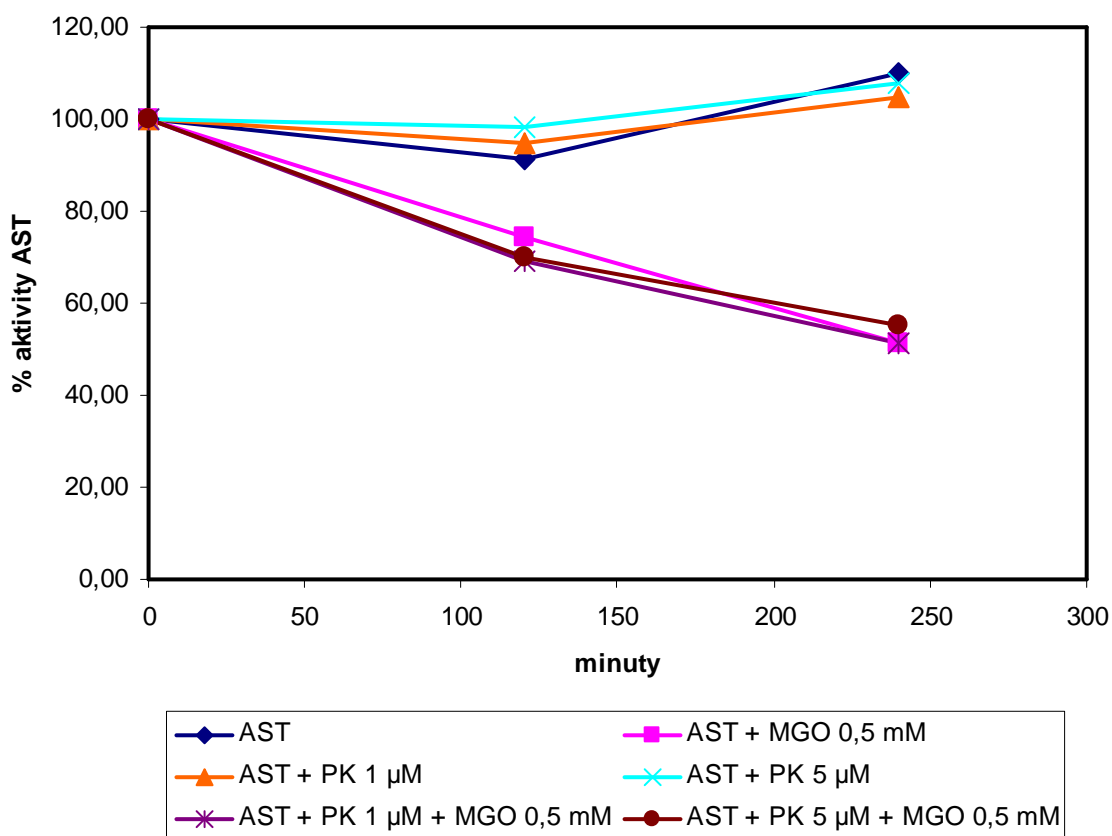
6.2.2 Kyselina *p*-kumarová

Kyselina *p*-kumarová neovlivňovala aktivitu AST v kontrolním vzorku ani v jedné zkoušené koncentraci.

Kyselina *p*-kumarová neměla žádný pozitivní účinek na glykaci AST methylglyoxalem. Výsledky jsou dokumentovány v tabulce 5 a v obrázku 11.

Tabulka 5: Vliv kyseliny *p*-kumarové (1 μ M a 5 μ M) na glykaci AST methylglyoxalem (MGO 0,5 mM) v průběhu čtyřhodinové inkubace při 37°C. Koncentrace enzymu v inkubační směsi byla 5 μ g/ml. Měřeno kinetickou UV metodou. Výsledky jsou procentuálním vyjádřením aktivit inkubačních směsí v čase 0.

Vzorek Inkubace při 37°C (minuty)	Procentuální vývoj aktivity AST		
	0	120	240
AST	100,00	91,12	109,82
AST + MGO 0,5 mM	100,00	74,32	51,23
AST + PK 1 mM	100,00	94,74	104,89
AST + PK 5 mM	100,00	98,31	107,85
AST + PK 1 mM + MGO 0,5 mM	100,00	69,06	51,27
AST + PK 5 mM + MGO 0,5 mM	100,00	70,17	55,39



Obr. 11: Vliv kyseliny *p*-kumarové (1 μ M a 5 μ M) na glykaci AST methylglyoxalem (MGO 0,5 mM) v průběhu čtyřhodinové inkubace při 37°C. Koncentrace enzymu v inkubační směsi byla 5 μ g/ml. Měřeno kinetickou UV metodou. Výsledky jsou procentuálním vyjádřením aktivit inkubačních směsí v čase 0.

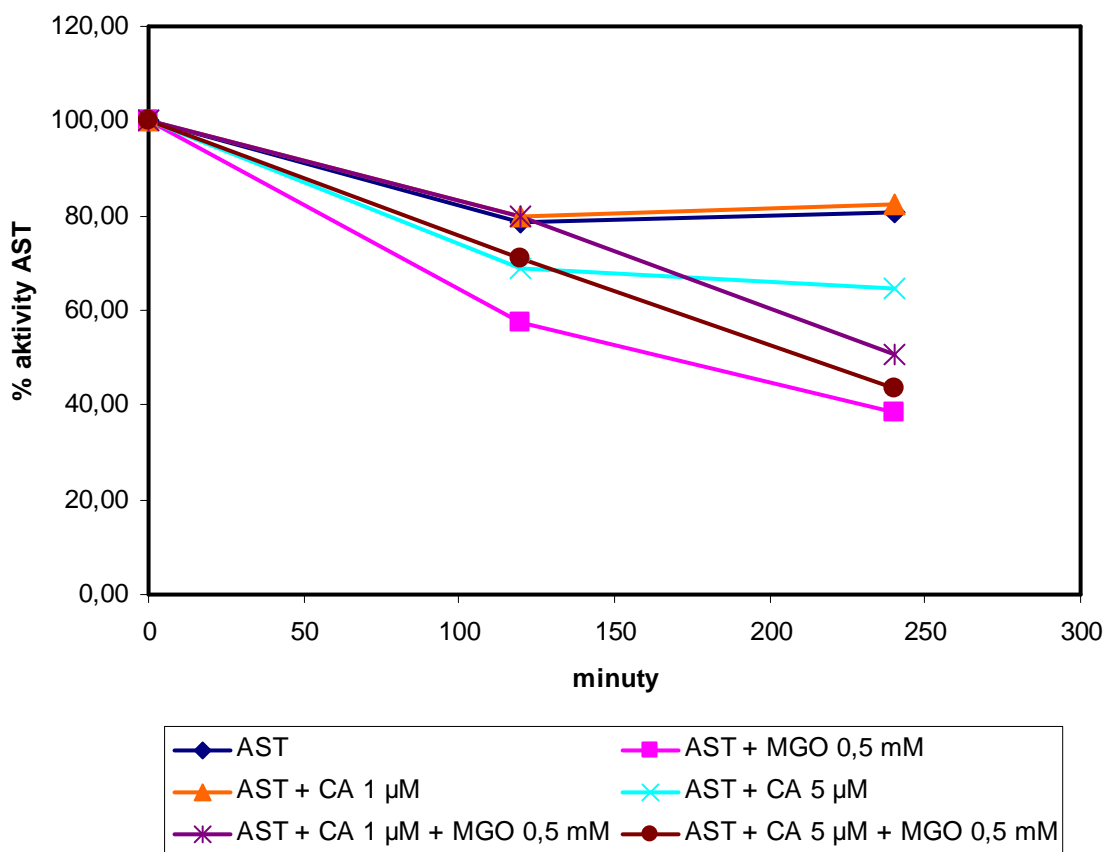
6.2.3 Kyselina kávová

Kyselina kávová 1 μM neovlivňovala aktivitu AST ale v koncentraci 5 μM ji statisticky významně snižovala v intervalu 240 minut.

Kyselina kávová 1 μM zpomalila glykaci AST po 120 minutách i po 240 minutách. V 5 μM koncentraci tento účinek neměla. Výsledky jsou dokumentovány v tabulce 6 a v obrázku 12.

Tabulka 6: Vliv kyseliny kávové (1 μM a 5 μM) na glykaci AST methylglyoxalem (MGO 0,5 mM) v průběhu čtyřhodinové inkubace při 37°C. Koncentrace enzymu v inkubační směsi byla 5 $\mu\text{g/ml}$. Měřeno kinetickou UV metodou. Výsledky jsou procentuálním vyjádřením aktivit inkubačních směsí v čase 0.

Vzorek Inkubace při 37°C (minuty)	Procentuální vývoj aktivity AST		
	0	120	240
AST	100,00	78,49	80,68
AST + MGO 0,5 mM	100,00	57,54	38,58
AST + CA 1 μM	100,00	79,70	82,23
AST + CA 5 μM	100,00	69,06	64,52
AST + CA 1 μM + MGO 0,5 mM	100,00	79,92	50,68
AST + CA 5 μM + MGO 0,5 mM	100,00	70,92	43,63



Obr. 12: Vliv kyseliny kávové (1 μM a 5 μM) na glykaci AST methylglyoxalem v průběhu čtyřhodinové inkubace při 37°C. Koncentrace enzymu v inkubační směsi byla 5 $\mu\text{g/ml}$. Měřeno kinetickou UV metodou. Výsledky jsou procentuálním vyjádřením aktivit inkubačních směsí v čase 0.

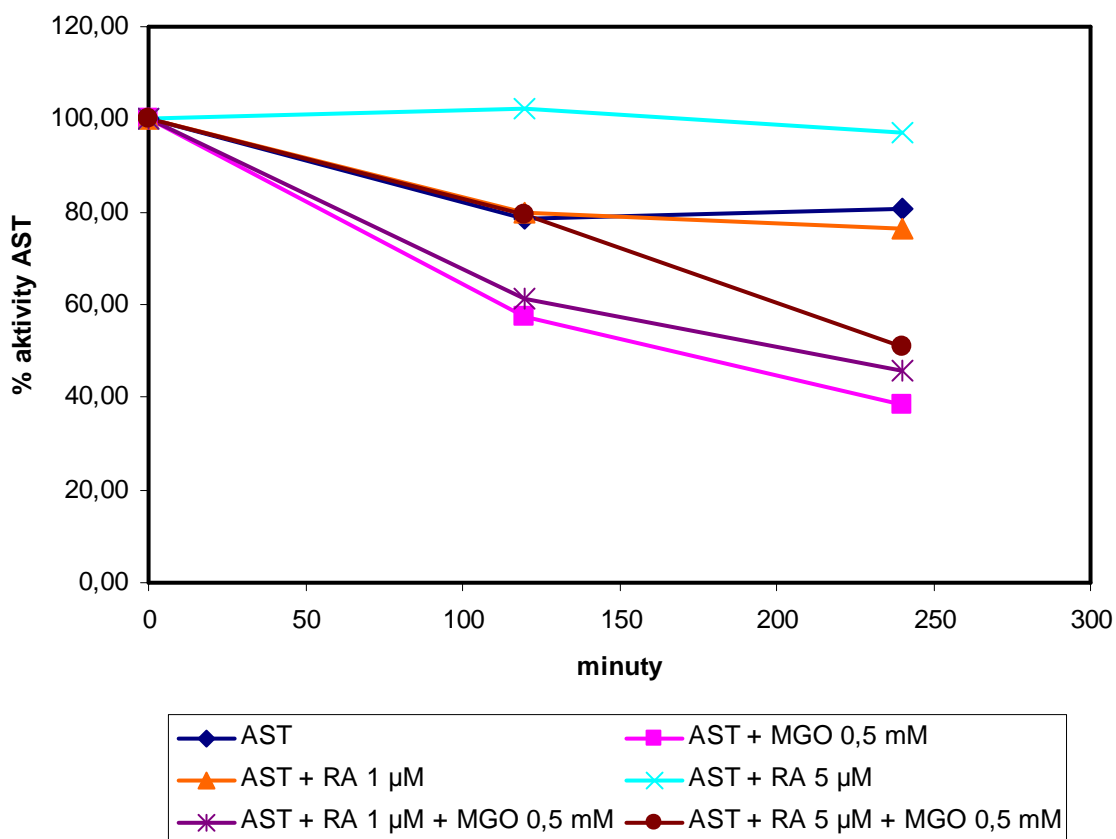
6.2.4 Kyselina rozmarýnová

Kyselina rozmarýnová v koncentraci 1 μM neovlivňovala aktivitu AST, avšak v koncentraci 5 μM ji dokonce zvyšovala.

Kyselina rozmarýnová 5 μM zpomalila glykaci AST po 120 minutách i po 240 minutách. V koncentraci 1 μM ji zpomalila jen po 240 minutách. Výsledky jsou dokumentovány v tabulce 7 a v obrázku 13.

Tabulka 7: Vliv kyseliny rozmarýnové (1 μM a 5 μM) na glykaci AST methylglyoxalem (MGO 0,5 mM) v průběhu čtyřhodinové inkubace při 37°C. Koncentrace enzymu v inkubační směsi byla 5 $\mu\text{g/ml}$. Měřeno kinetickou UV metodou. Výsledky jsou procentuálním vyjádřením aktivit inkubačních směsí v čase 0.

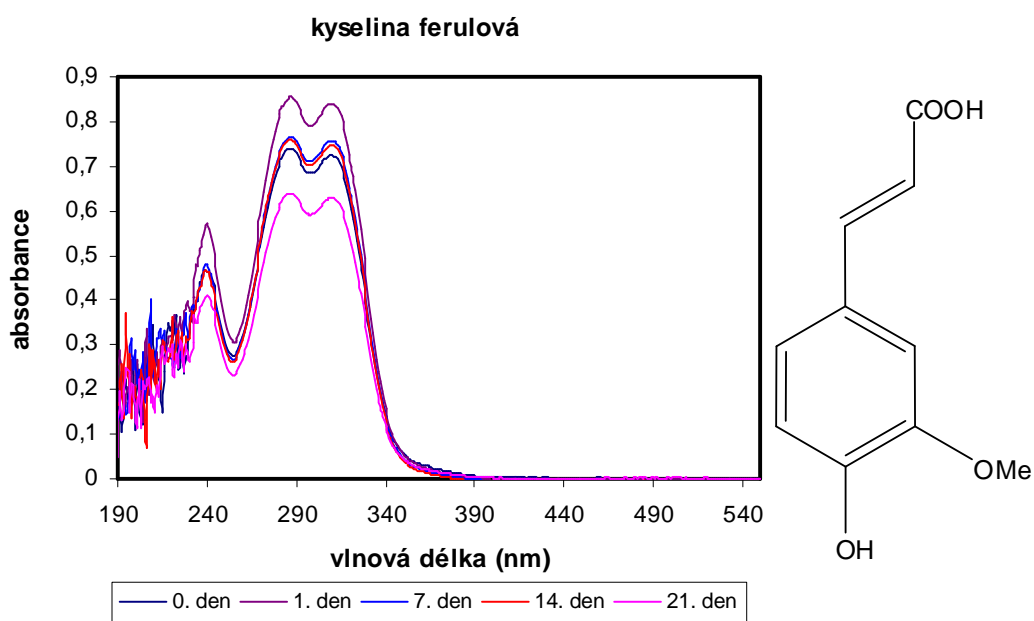
Vzorek Inkubace při 37°C (minuty)	Procentuální vývoj aktivity AST		
	0	120	240
AST	100,00	78,49	80,68
AST + MGO 0,5 mM	100,00	57,54	38,58
AST + RA 1 μM	100,00	79,81	76,34
AST + RA 5 μM	100,00	102,12	97,31
AST + RA 1 μM + MGO 0,5 mM	100,00	61,49	45,97
AST + RA 5 μM + MGO 0,5 mM	100,00	79,61	51,13



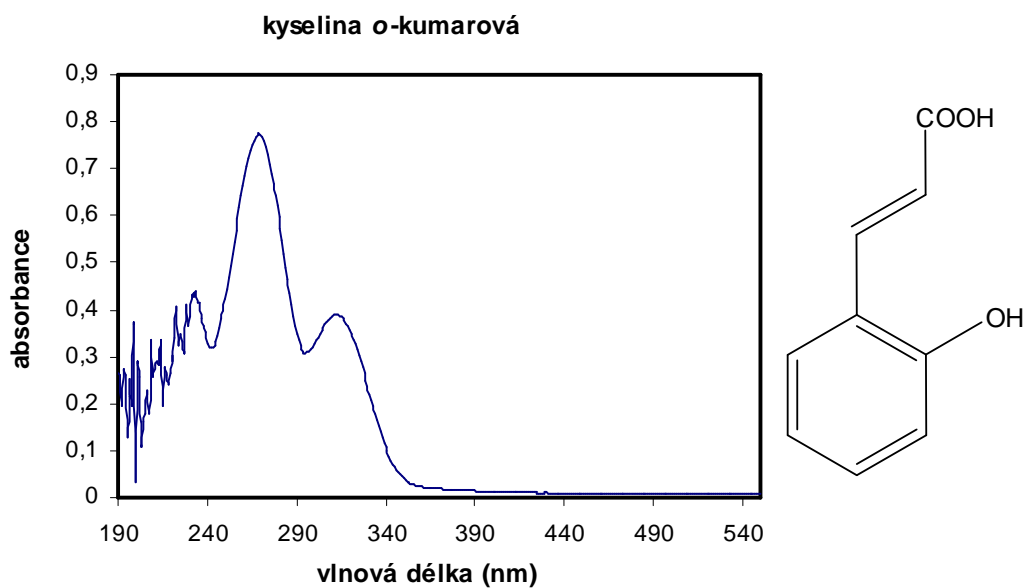
Obr. 13: Vliv kyseliny rozmarýnové (1 μM a 5 μM) na glykaci AST methylglyoxalem v průběhu čtyřhodinové inkubace při 37°C. Koncentrace enzymu v inkubační směsi byla 5 $\mu\text{g/ml}$. Měřeno kinetickou UV metodou. Výsledky jsou procentuálním vyjádřením aktivit inkubačních směsí v čase 0.

6.3 Sledování stability jednotlivých HCA

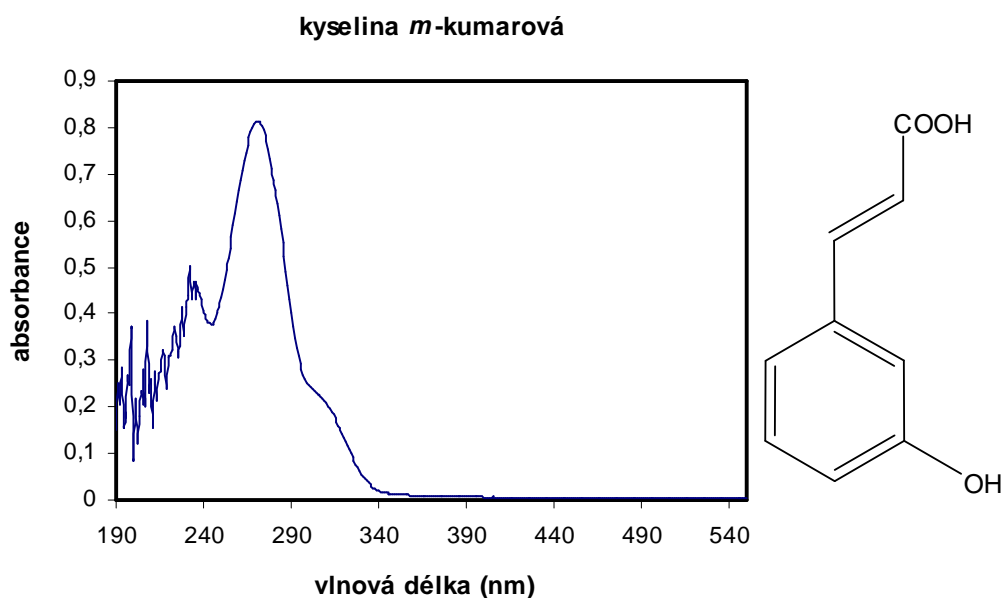
Stabilita jednotlivých kyselin v průběhu 21 dní byla prověřována pomocí UV-VIS spektroskopie ve vlnových délkách 190-550 nm na spektrofotometru Hewlett Packard 8453. V jednotlivých časových intervalech se absorbance měnila bez zjevné závislosti, k posunu vlnových délek však nedošlo. U všech měření byl jako slepý vzorek používán pufr. Výsledky měření při 4°C a 25°C byly obdobné, proto uvádím spektra stabilitní studie jen u jednoho zástupce kyselin (obr. 14)) a u dalších pouze jejich charakterický tvar spektra (obr. 15 až 21).



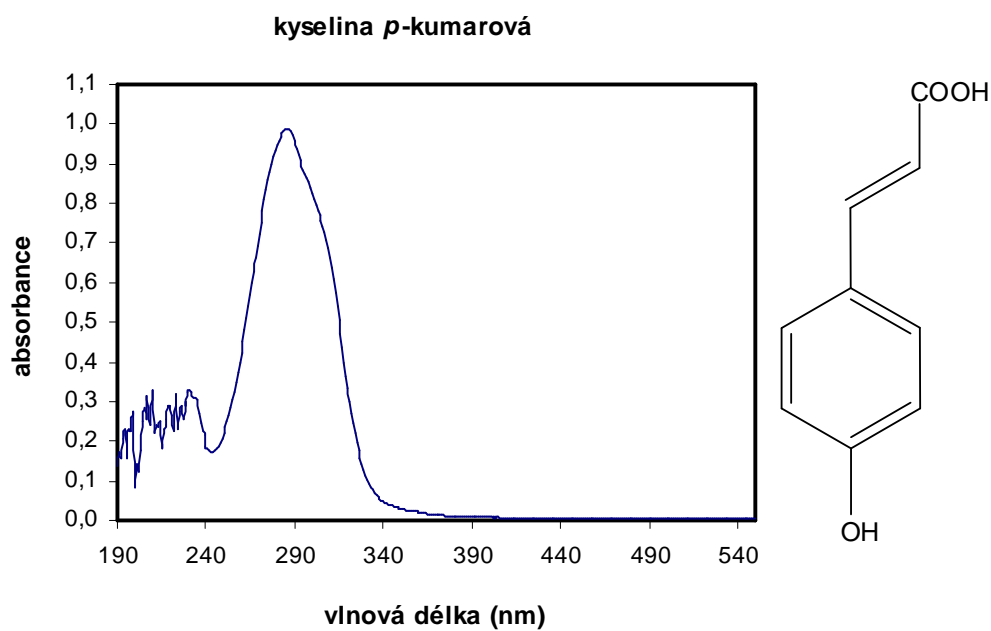
Obr. 14: UV spektra stabilitní studie kyseliny ferulové probíhající 21 dní. Koncentrace HCA byla 50 μ M. Absorpční spektra inkubačních směsí byla zaznamenávána UV-VIS spektrometrem ve vlnových délkách od 190 do 550 nm. Data ostatních kyselin byla zpracována stejným způsobem.



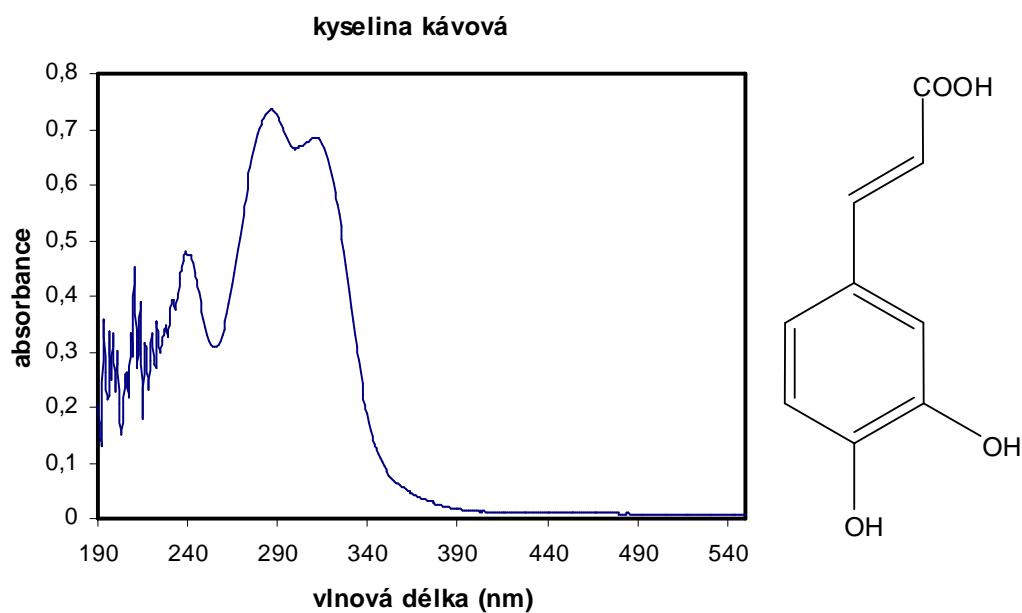
Obr. 15: Charakteristická absorpční křivka kyseliny *o*-kumarové měřená UV-VIS spektrometrem ve vlnových délkách 190-550 nm. Koncentrace kyseliny byla 50 μ M.



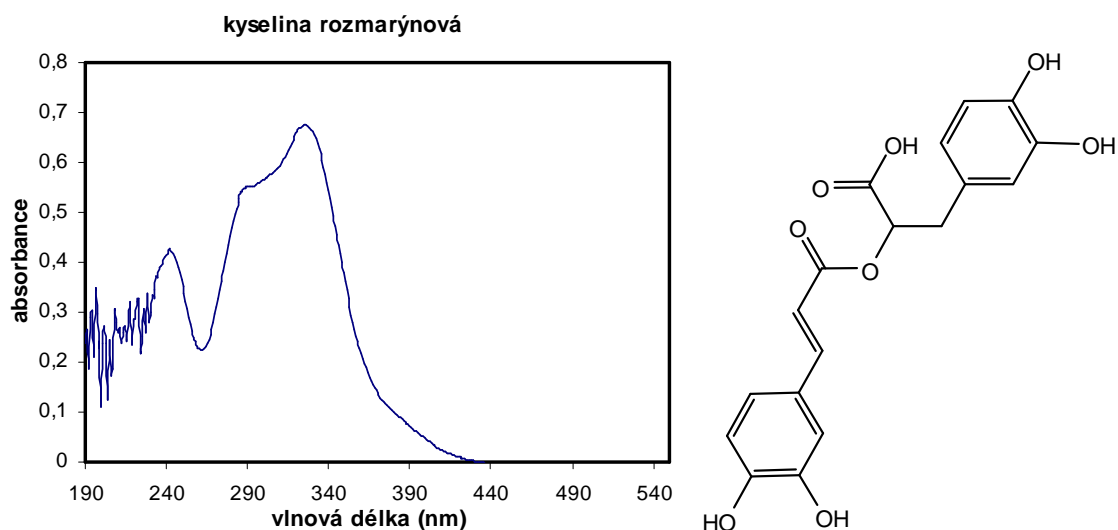
Obr. 16: Charakteristická absorpční křivka kyseliny *m*-kumarové měřená UV-VIS spektrometrem ve vlnových délkách 190-550 nm. Koncentrace kyseliny byla 50 μ M.



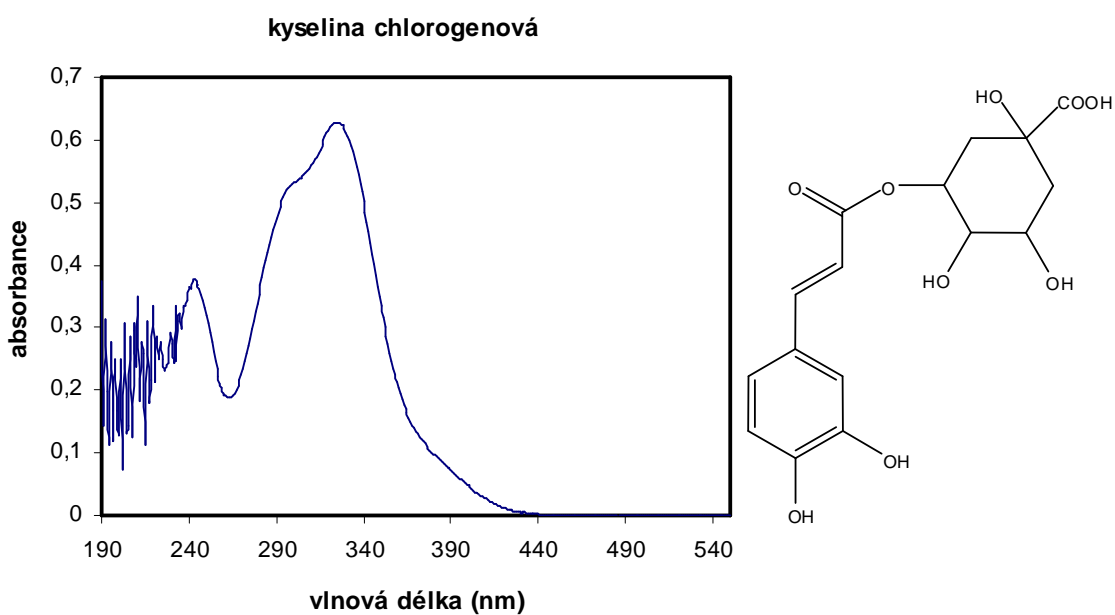
Obr. 17: Charakteristická absorpční křivka kyseliny *p*-kumarové měřená UV-VIS spektrometrem ve vlnových délkách 190-550 nm. Koncentrace kyseliny byla 50 μ M.



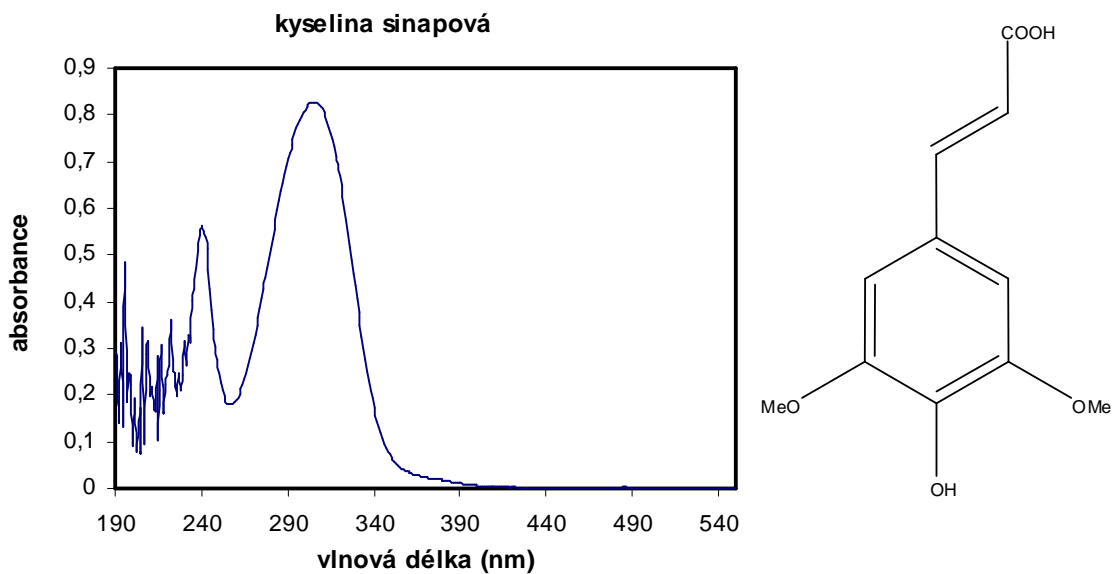
Obr. 18: Charakteristická absorpční křivka kyseliny kávové měřená UV-VIS spektrometrem ve vlnových délkách 190-550 nm. Koncentrace kyseliny byla 50 μ M.



Obr. 19: Charakteristická absorpční křivka kyseliny rozmarýnové měřená UV-VIS spektrometrem ve vlnových délkách 190-550 nm. Koncentrace kyseliny byla 50 μ M.



Obr. 20: Charakteristická absorpční křivka kyseliny chlorogenové měřená UV-VIS spektrometrem ve vlnových délkách 190-550 nm. Koncentrace kyseliny byla 50 μ M.



Obr. 21: Charakteristická absorpční křivka kyseliny sinapové měřená UV-VIS spektrometrem ve vlnových délkách 190-550 nm. Koncentrace kyseliny byla 50 μ M.

6.4 Sledování vlivu HCA na fluorescenci Trp zbytků v molekule AST (zhášení fluorescence)

Všechny kyseliny ve všech zkoušených koncentracích (od 0,5 do 100 μM) snižovaly intenzitu fluorescence (zhášely fluorescenci) Trp zbytků v molekule AST. Jednotlivé kyseliny tedy interagují s AST. Výchozí koncentrace AST byla 0,45 mg/ml. Po přidávání stejných objemů pufru enzym zůstal stabilní. U všech měření byl jako slepý vzorek používán pufr. Spektra jednotlivých inkubačních směsí AST s kyselinami jsou uvedena na obrázcích 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 a 36.

Sestrojením Stern-Volmerova diagramu zhášení fluorescence Trp zbytků v molekule AST působením jednotlivých HCA, vyjádřeno jako závislost poměru I_0/I na koncentraci jednotlivých kyselin, jsem získala informaci, o jaký typ interakce mezi AST a HCA se jedná. Pokud je tato závislost lineární, jedná se o zhášení dynamické nebo statické. Pokud je závislost exponenciální, jedná se o zhášení smíšené, dynamické a statické, při kterém je fluorofor zhášen jednak při srážkách se zhášečem a zároveň s ním tvoří nefluoreskující komplex. I_0 je intenzita fluorescence kontroly (AST) v emisním maximu a I jsou hodnoty intenzity fluorescence vzorků AST po přidání jednotlivých kyselin. Posun maxim fluorescencí Trp zbytků v AST vlivem HCA a data pro sestavení Stern-Volmerova diagramu, jsou uvedena v tabulkách 8 a 9. Stern-Volmerovy diagramy zhášení fluorescence Trp zbytků v molekule AST působením jednotlivých HCA jsou uvedeny na obrázcích 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35 a 37.

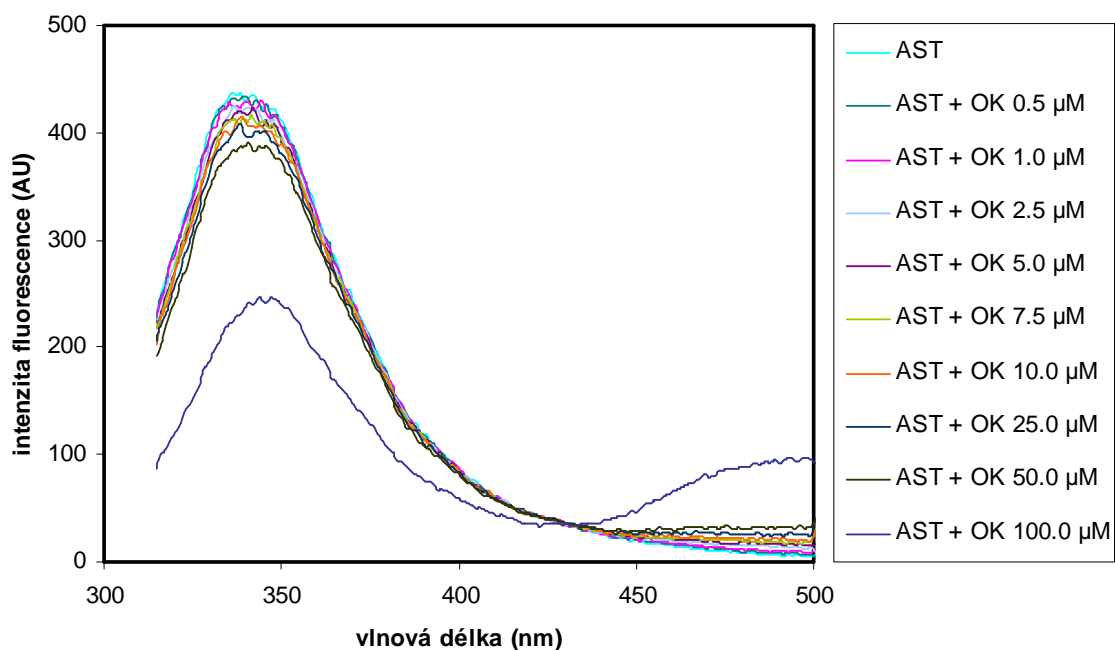
Tabulka 8: Posun maxim fluorescencí Trp zbytků v molekule AST vlivem HCA

Koncentrace HCA (μM)	Maximum fluorescence Trp zbytků v molekule AST (nm)							
	OK	MK	PK	CA	RA	CHA	FA	SA
0,0	342,0	342,5	342,0	341,0	341,5	341,5	341,5	341,5
0,5	342,0	342,5	342,0	341,0	341,0	341,5	341,5	342,0
1,0	342,0	342,0	342,0	341,0	341,5	341,5	342,0	342,0
2,5	342,5	342,0	342,0	342,0	342,0	342,0	342,0	342,0
5,0	342,5	342,0	342,0	342,0	342,0	343,0	342,5	342,0
7,5	342,5	342,0	342,0	342,5	342,0	343,0	343,0	342,0
10,0	342,5	342,0	342,0	343,0	342,0	343,0	343,0	343,0
25,0	342,5	342,0	342,0	343,0	344,0	344,0	344,0	343,0
50,0	346,0	342,5	342,0	344,0	344,5	348,0	350,0	343,0
100,0	346,5	343,5	345,0	346,0	356,0	349,0	349,5	345,0

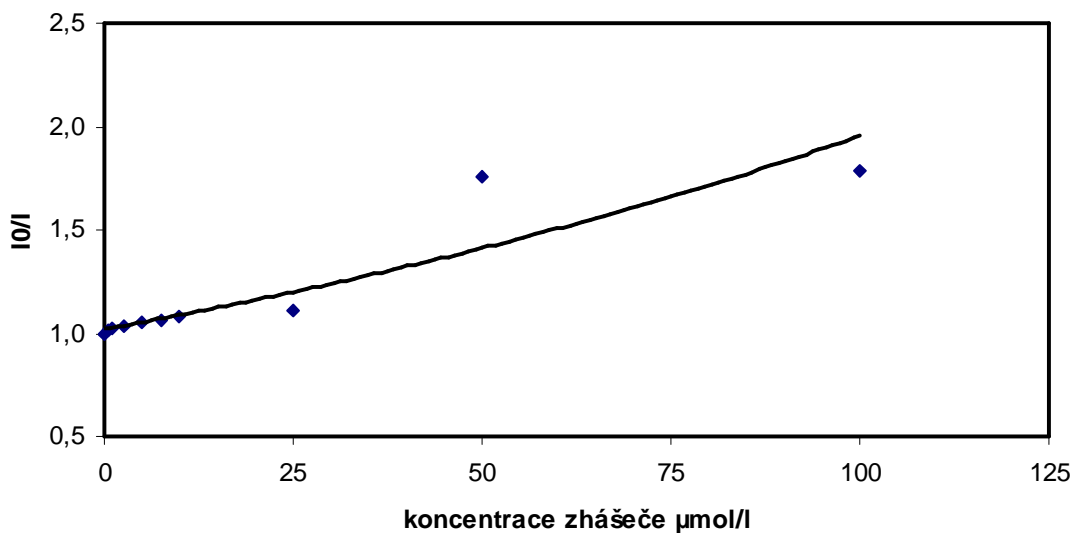
Tabulka 9: Data pro sestrojení Stern-Volmerova diagramu

Koncentrace HCA (μM)	I_0/I							
	OK	MK	PK	CA	RA	CHA	FA	SA
0,0	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
0,5	1,010	1,000	0,994	0,996	1,015	1,007	1,005	1,006
1,0	1,027	1,010	1,018	1,000	1,035	1,030	1,025	1,006
2,5	1,036	1,024	1,018	1,006	1,062	1,053	1,032	1,024
5,0	1,048	1,036	1,052	1,037	1,072	1,075	1,050	1,028
7,5	1,061	1,080	1,054	1,075	1,087	1,097	1,073	1,041
10,0	1,079	1,112	1,084	1,110	1,106	1,174	1,091	1,043
25,0	1,114	1,141	1,093	1,153	1,309	1,236	1,284	1,098
50,0	1,761	1,388	1,130	1,284	1,431	1,885	3,193	1,155
100,0	1,786	4,448	2,481	1,478	4,467	1,972	3,204	1,320

AST + kyselina *o*-kumarová

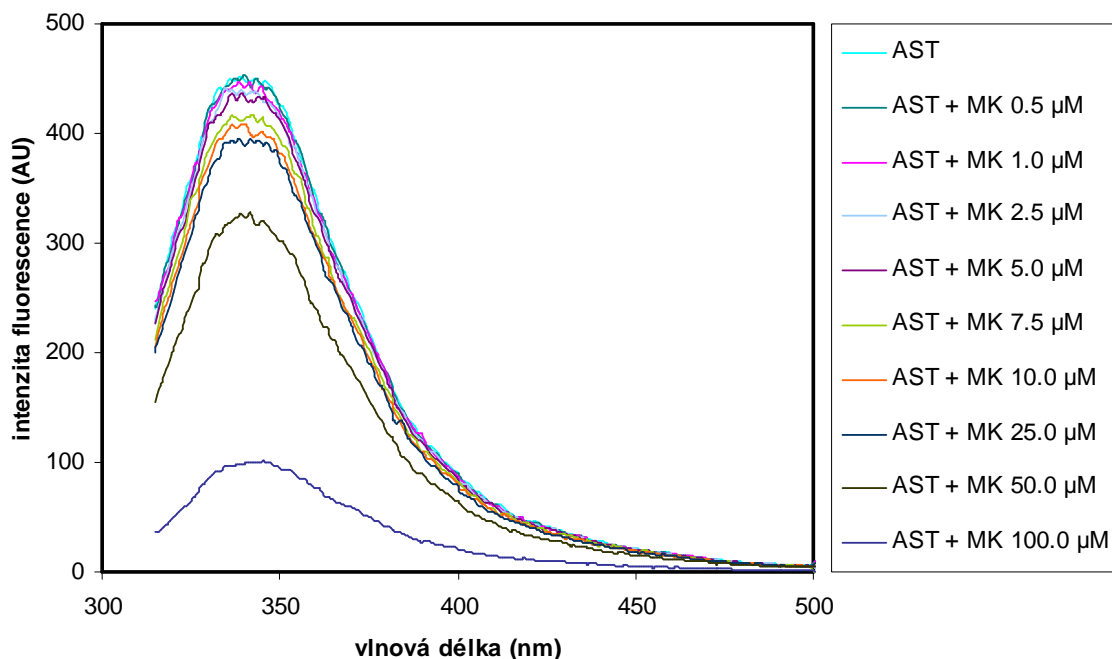


Obr. 22: Vliv jednotlivých koncentrací kyseliny *o*-kumarové (0,5 až 100 μM) na fluorescenční spektrum AST. Měřeno při excitační vlnové délce 295 nm. Emisní spektra byla proměřena v rozsahu vlnových délek 315 – 500 nm. Směsi byly inkubovány při 37°C.

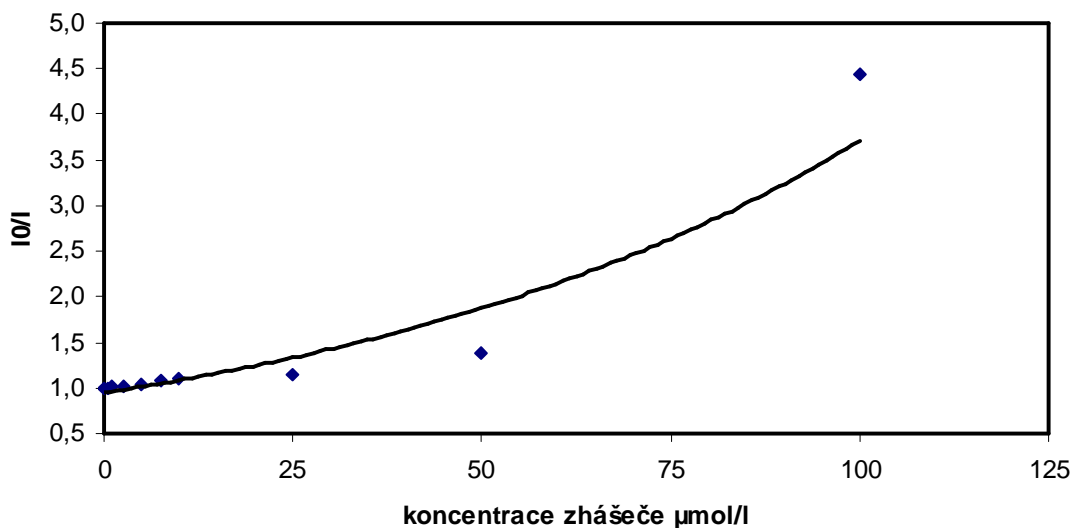


Obr. 23.: Stern-Volmerův diagram zhášení fluorescence Trp zbytků v molekule AST působením kyseliny *o*-kumarové. Vyjádřeno jako závislost poměru I_0/I na koncentraci kyseliny *o*-kumarové. I_0 je intenzita fluorescence kontroly (AST) v emisním maximu a I jsou hodnoty intenzity fluorescence vzorků AST po přidání kyseliny *o*-kumarové.

AST + kyselina *m*-kumarová

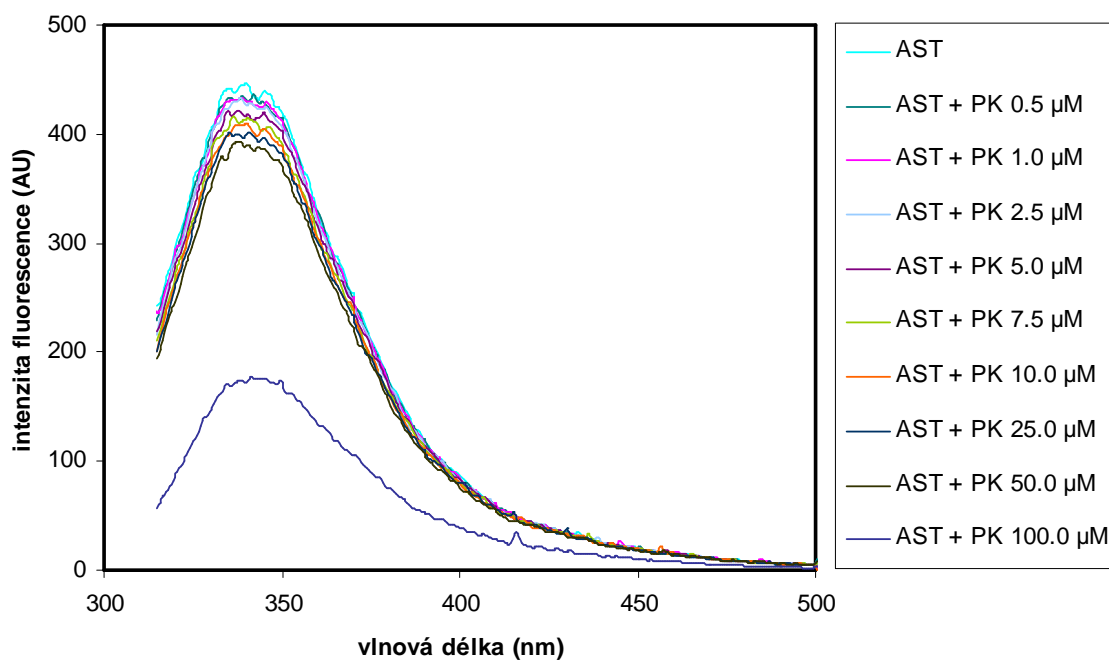


Obr. 24: Vliv jednotlivých koncentrací kyseliny *m*-kumarové (0,5 až 100 μM) na fluorescenční spektrum AST. Měřeno při excitační vlnové délce 295 nm. Emisní spektra byla proměřena v rozsahu vlnových délek 315 – 500 nm. Směsi byly inkubovány při 37°C.

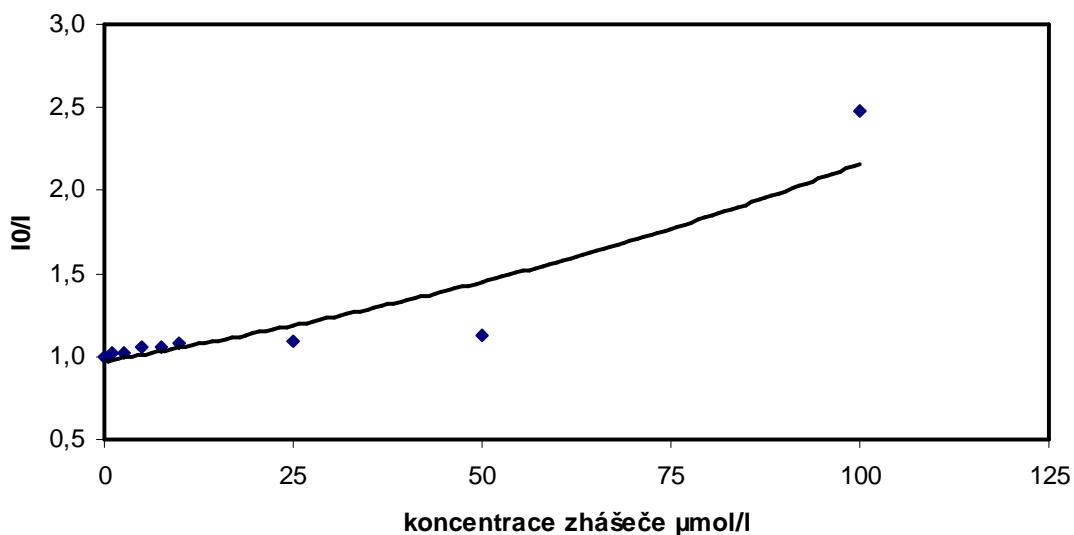


Obr. 25: Stern-Volmerův diagram zhášení fluorescence Trp zbytků v molekule AST působením kyseliny *m*-kumarové. Vyjádřeno jako závislost poměru I_0/I na koncentraci kyseliny *m*-kumarové. I_0 je intenzita fluorescence kontroly (AST) v emisním maximu a I jsou hodnoty intenzity fluorescence vzorků AST po přidání kyseliny *m*-kumarové.

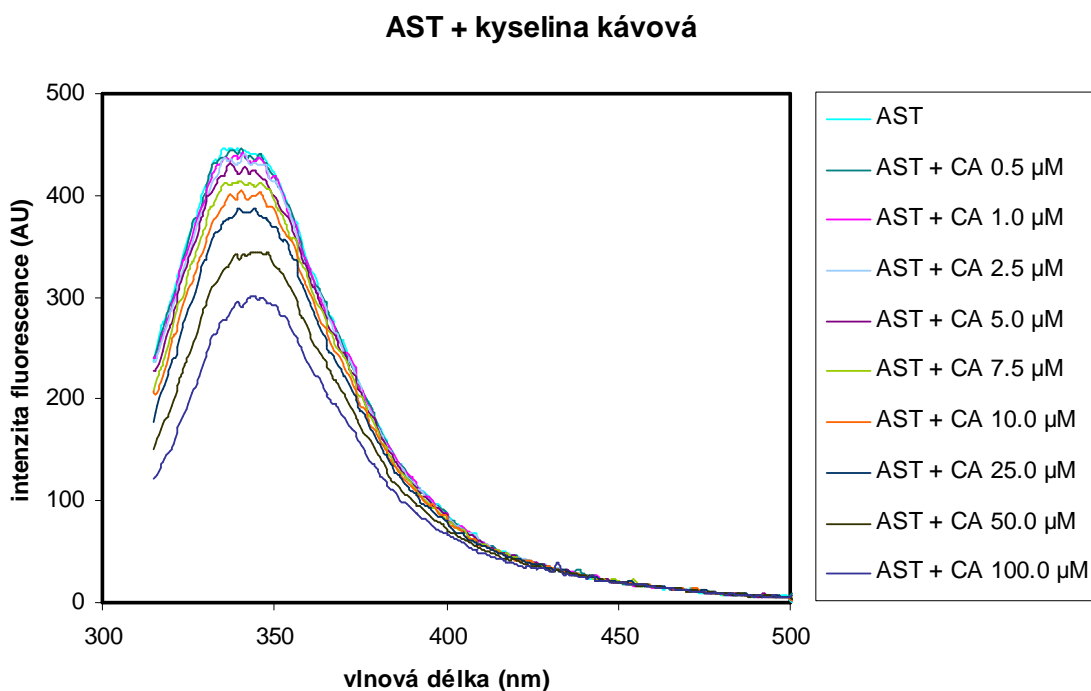
AST + kyselina *p*-kumarová



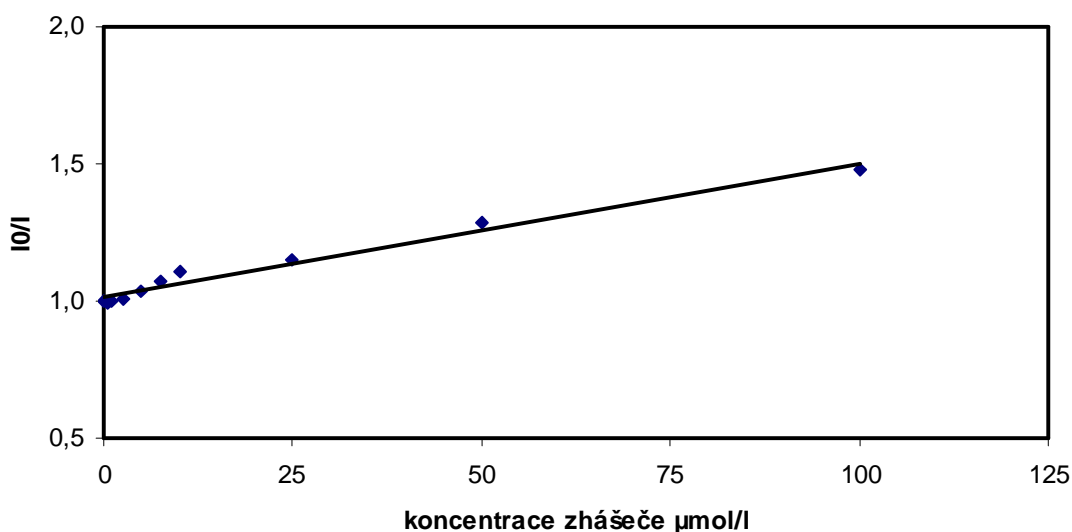
Obr. 26: Vliv jednotlivých koncentrací kyseliny *p*-kumarové (0,5 až 100 μM) na fluorescenční spektrum AST. Měřeno při excitační vlnové délce 295 nm. Emisní spektra byla proměřena v rozsahu vlnových délek 315 – 500 nm. Směsi byly inkubovány při 37°C.



Obr. 27: Stern-Volmerův diagram zhášení fluorescence Trp zbytků v molekule AST působením kyseliny *p*-kumarové. Vyjádřeno jako závislost poměru I_0/I na koncentraci kyseliny *p*-kumarové. I_0 je intenzita fluorescence kontroly (AST) v emisním maximu a I jsou hodnoty intenzity fluorescence vzorků AST po přidání kyseliny *p*-kumarové.

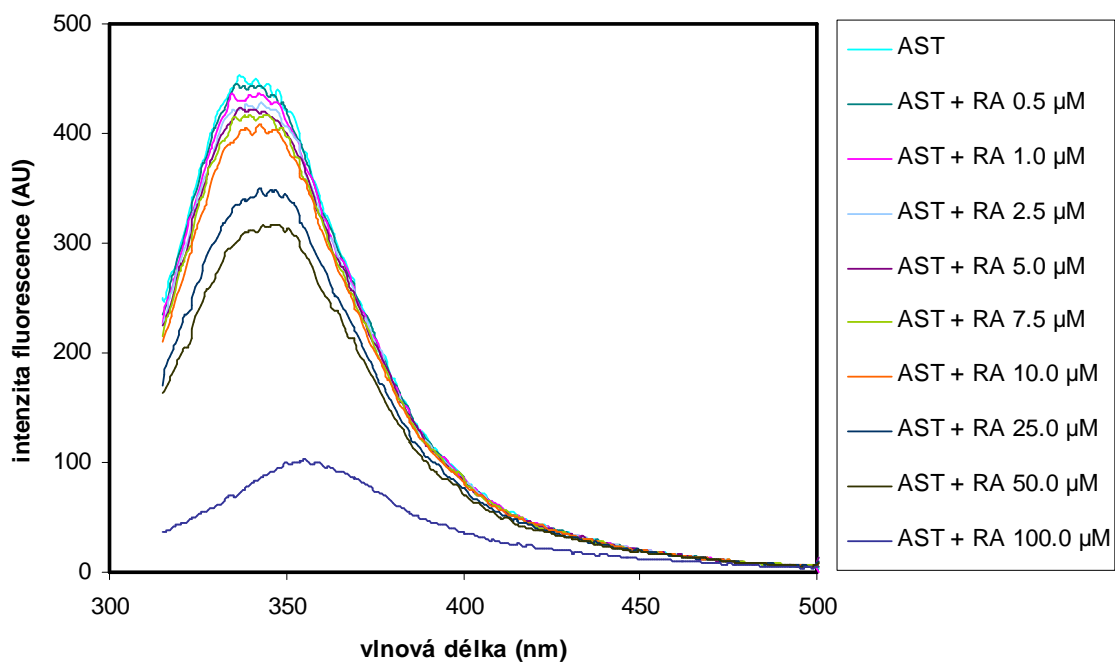


Obr. 28: Vliv jednotlivých koncentrací kyseliny kávové (0,5 až 100 μM) na fluorescenční spektrum AST. Měřeno při excitační vlnové délce 295 nm. Emisní spektra byla proměřena v rozsahu vlnových délek 315 – 500 nm. Směsi byly inkubovány při 37°C

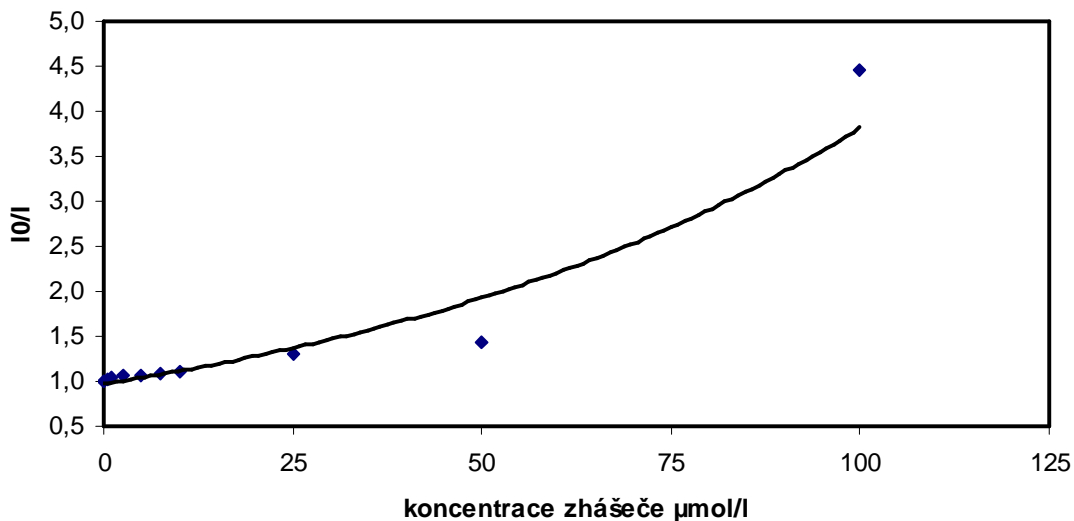


Obr. 29: Stern-Volmerův diagram zhášení fluorescence Trp zbytků v molekule AST působením kyseliny kávové. Vyjádřeno jako závislost poměru I_0/I na koncentraci kyseliny kávové. I_0 je intenzita fluorescence kontroly (AST) v emisním maximu a I jsou hodnoty intenzity fluorescence vzorků AST po přidání kyseliny kávové.

AST + kyselina rozmarýnová

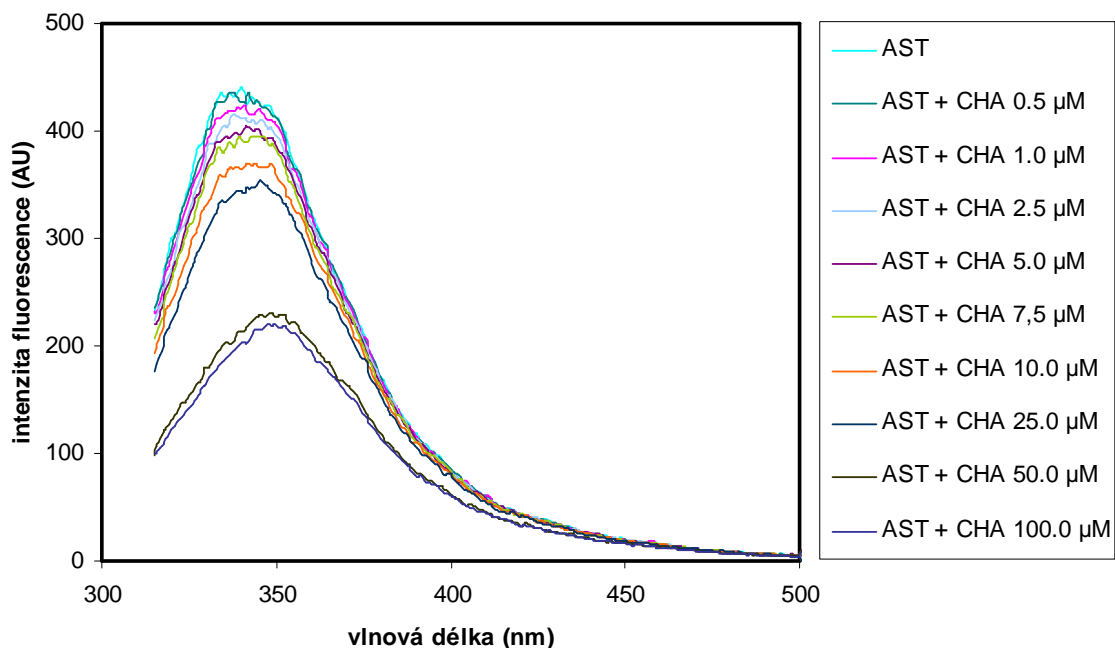


Obr. 30: Vliv jednotlivých koncentrací kyseliny rozmarýnové (0,5 až 100 μM) na fluorescenční spektrum AST. Měřeno při excitační vlnové délce 295 nm. Emisní spektra byla proměřena v rozsahu vlnových délek 315 – 500 nm. Směsi byly inkubovány při 37°C.

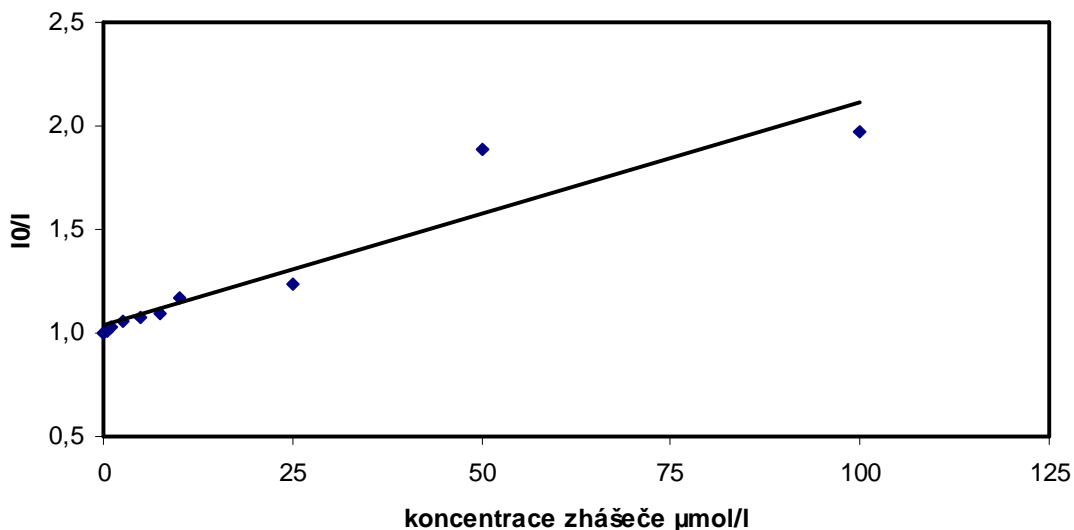


Obr. 31: Stern-Volmerův diagram zhášení fluorescence Trp zbytků v molekule AST působením kyseliny rozmarýnové. Vyjádřeno jako závislost poměru I_0/I na koncentraci kyseliny rozmarýnové. I_0 je intenzita fluorescence kontroly (AST) v emisním maximu a I jsou hodnoty intenzity fluorescence vzorků AST po přidání kyseliny rozmarýnové.

AST + kyselina chlorogenová

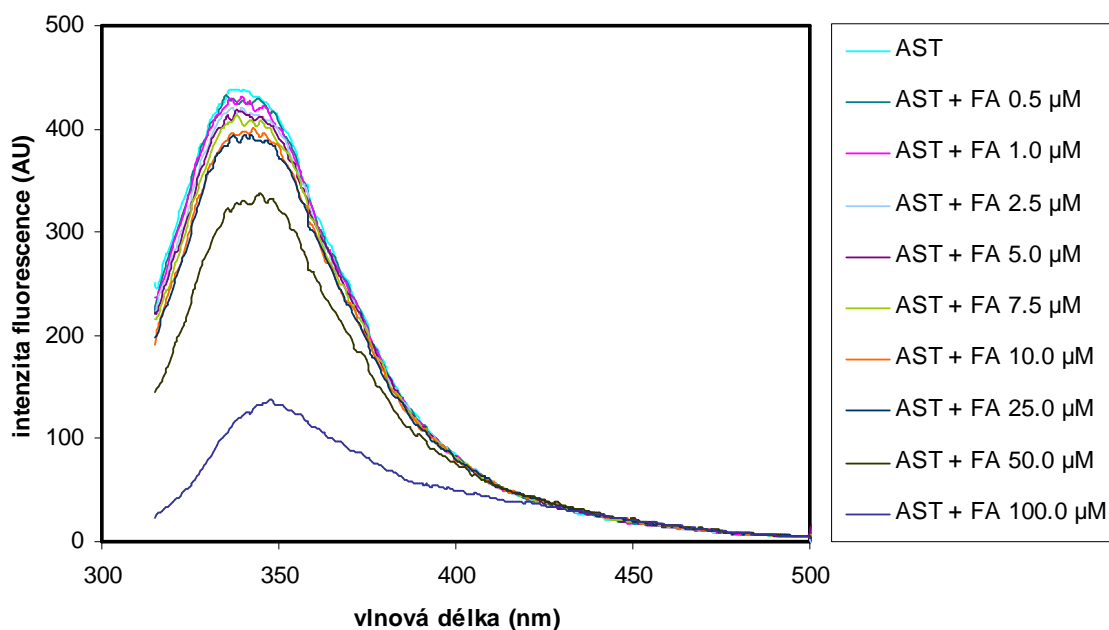


Obr. 32: Vliv jednotlivých koncentrací kyseliny chlorogenové (0,5 až 100 μM) na fluorescenční spektrum AST. Měřeno při excitační vlnové délce 295 nm. Emisní spektra byla proměřena v rozsahu vlnových délek 315 – 500 nm. Směsi byly inkubovány při 37°C.

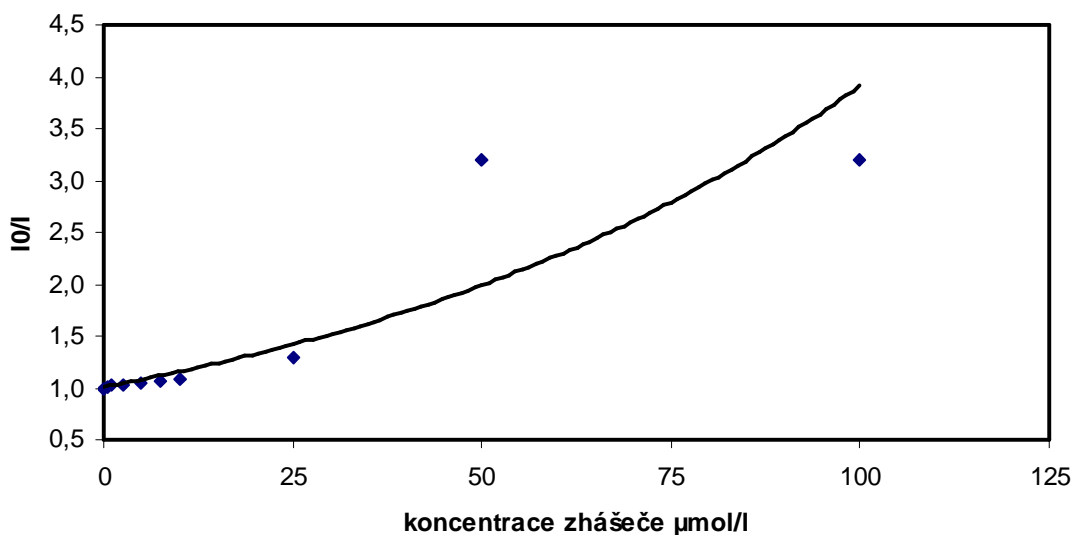


Obr. 33: Stern-Volmerův diagram zhášení fluorescence Trp zbytků v molekule AST působením kyseliny chlorogenové. Vyjádřeno jako závislost poměru I_0/I na koncentraci kyseliny chlorogenové. I_0 je intenzita fluorescence kontroly (AST) v emisním maximu a I jsou hodnoty intenzity fluorescence vzorků AST po přidání kyseliny chlorogenové.

AST + kyselina ferulová

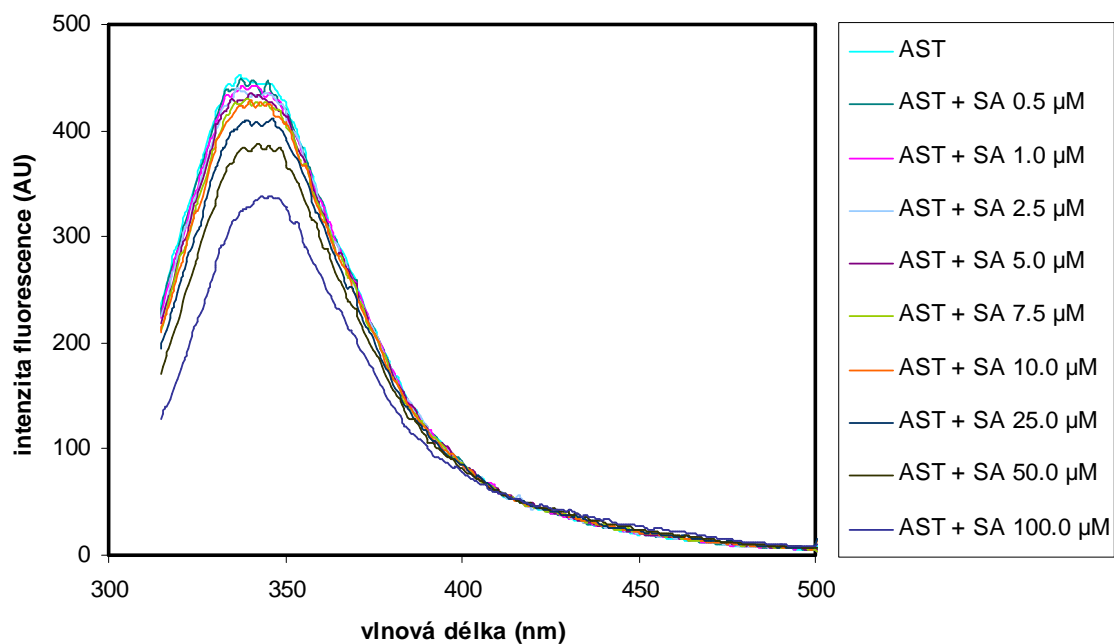


Obr. 34: Vliv jednotlivých koncentrací kyseliny ferulové (0,5 až 100 μM) na fluorescenční spektrum AST. Měřeno při excitační vlnové délce 295 nm. Emisní spektra byla proměřena v rozsahu vlnových délek 315 – 500 nm. Směsi byly inkubovány při 37°C.

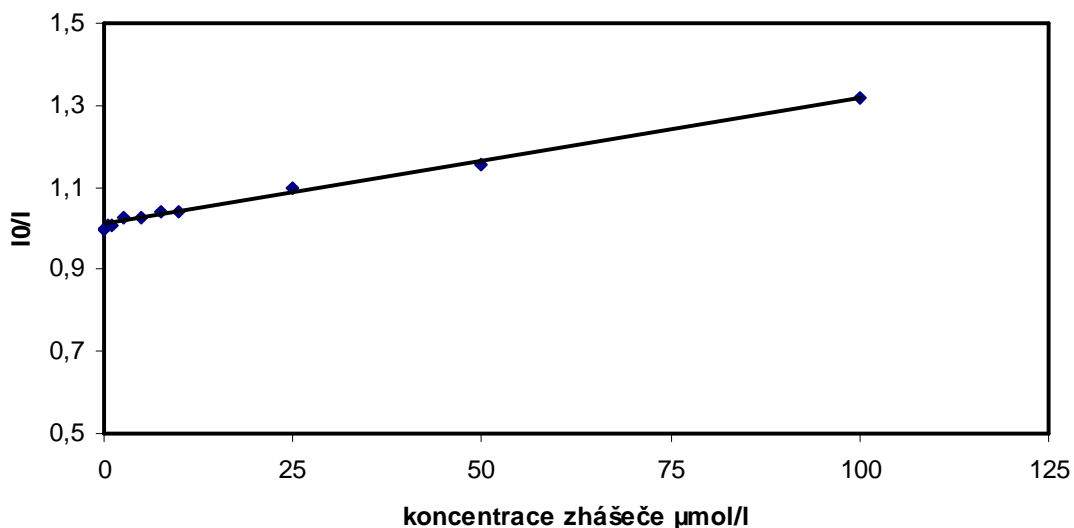


Obr. 35: Stern-Volmerův diagram zhášení fluorescence Trp zbytků v molekule AST působením kyseliny ferulové. Vyjádřeno jako závislost poměru I_0/I na koncentraci kyseliny ferulové. I_0 je intenzita fluorescence kontroly (AST) v emisním maximu a I jsou hodnoty intenzity fluorescence vzorků AST po přidání kyseliny ferulové.

AST + kyselina sinapová



Obr. 36: Vliv jednotlivých koncentrací kyseliny sinapové (0,5 až 100 μM) na fluorescenční spektrum AST. Měřeno při excitační vlnové délce 295 nm. Emisní spektra byla proměřena v rozsahu vlnových délek 315 – 500 nm. Směsi byly inkubovány při 37°C.



Obr. 37: Stern-Volmerův diagram zhášení fluorescence Trp zbytků v molekule AST působením kyseliny sinapové. Vyjádřeno jako závislost poměru I₀/I na koncentraci kyseliny sinapové. I₀ je intenzita fluorescence kontroly (AST) v emisním maximu a I jsou hodnoty intenzity fluorescence vzorků AST po přidání kyseliny sinapové.

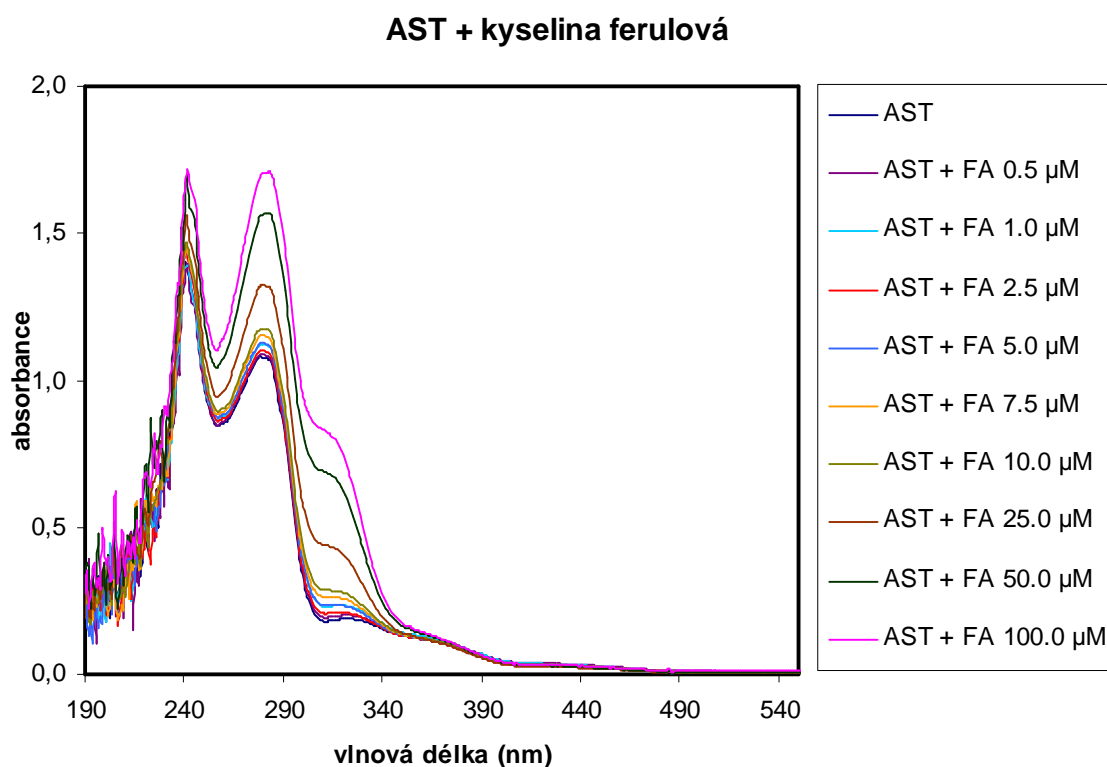
6.5 Sledování vlivu HCA na profil UV-VIS absorpčního spektra AST

Pomocí absorpčních spekter můžeme pozorovat interakce HCAs jak s proteinovou částí enzymu, tak s jeho koenzymem. V kratších vlnových délkách můžeme pozorovat změny v samotné proteinové části enzymu a od 320 nm vlastnosti jeho koenzymu. Celé absorpční spektrum v rozsahu vlnových délek 190 nm až 550 nm ukazuje obr. 38. Se zvyšující se koncentrací HCAs se hodnoty absorbance zvyšovaly.

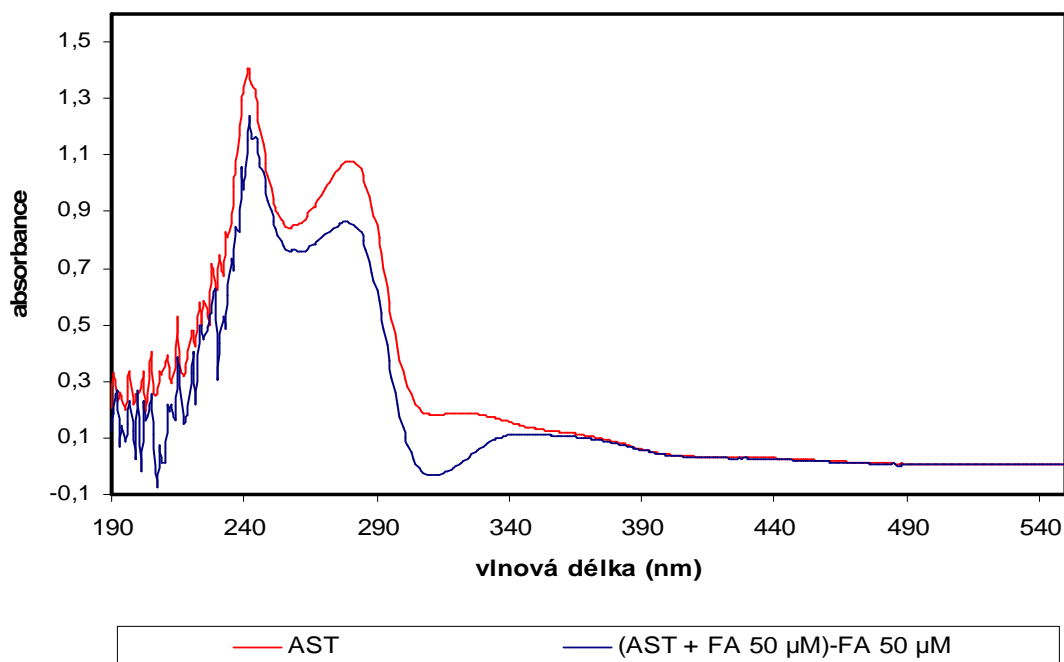
V oblasti vlnových délek od 320 nm patřící koenzymu se se zvyšující se koncentrací HCAs vlnová délka maxim neposouvala (obr. 40).

Absorpční spektra patřící samotné AST a AST s přídatkem HCA o určité koncentraci po odečtení hodnot absorbancí samotné HCA o téže koncentraci ukazuje obrázek 39.

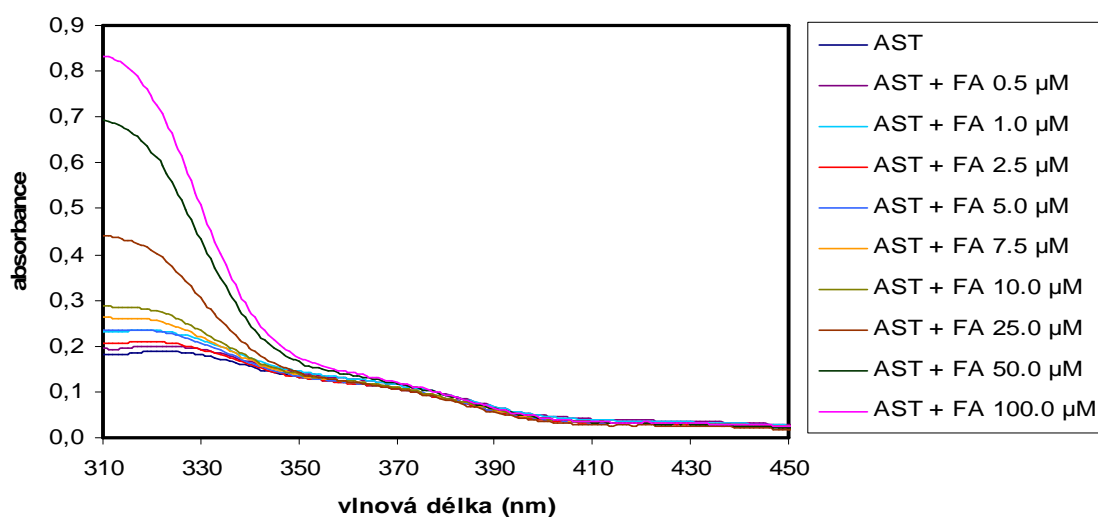
U všech měření byl jako slepý vzorek používán pufr.



Obr. 38: Absorpční spektrum AST (0,45 mg/ml) a směsí AST (0,45 mg/ml) se zvyšující se koncentrací kyseliny ferulové (od 0,5 do 100 µM). Absorpční spektra inkubačních směsí byla zaznamenávána UV-VIS spektrometrem ve vlnových délkách od 190 do 550 nm. Data ostatních kyselin byla zpracována stejným způsobem.



Obr. 39: Absorpční spektra patřící samotné AST a AST s přidavkem kyseliny ferulové o koncentraci 50 μM po odečtení hodnot absorbancí samotné 50 μM kyseliny ferulové. Absorpční spektra inkubačních směsí byla zaznamenávána UV-VIS spektrometrem ve vlnových délkách od 190 do 550 nm. Data ostatních kyselin byla zpracována stejným způsobem.



Obr. 40: Absorpční spektrum AST (0,45 mg/ml) a směsí AST (0,45 mg/ml) se zvyšující se koncentrací kyseliny ferulové (od 0,5 do 100 μM) v absorpční oblasti odpovídající absorpci koenzymu (310 až 450 nm). Absorpční spektra inkubačních směsí byla zaznamenávána UV-VIS spektrometrem. Data ostatních kyselin byla zpracována stejným způsobem.

7. DISKUZE

V této práci byl sledován vliv hydroxyskořicových kyselin na aktivitu aspartátaminotransferázy, její neenzymovou glykaci methylglyoxalem a také na spektrální vlastnosti enzymu.

Jako **glykační činidlo** jsem používala **methylglyoxal**. Na rozdíl od monosacharidů, používaných jako glykační činidla, je metoda s použitím MGO velice rychlá, což má pozitivní vliv na stabilitu používaných látek. Během experimentu je tedy zajištěna stálost nejenom MGO, ale i ostatních reagujících látek, což se promítá i do přesnosti výsledků. V námi používané metodě se vzorky inkubovaly čtyři hodiny při 37°C. V dlouhodobých experimentech prováděných na katedře biochemických věd farmaceutické fakulty UK byla jako glykační činidla používána 50 mM fruktóza, glukóza, glyceraldehyd a ribóza v 0,1 M fosfátovém pufru. Nejpomaleji působila glukóza, kde se ani po dvaceti dnech neobjevily výrazné změny v aktivitě používaného enzymu. Nejrychlejší efekt vykazoval glyceraldehyd, který redukoval aktivitu enzymu již během prvních dvou dnů (Dršata a kol. 2002). Ve srovnání s methylglyoxalem, kde v mém experimentu došlo k inhibici aktivity prakticky do několika hodin, se zdá být interval 48 hodin stále ještě dlouhý.

V úvodních experimentech jsem se snažila nalézt vhodnou koncentraci AST a methylglyoxalu a také určit optimální časové rozmezí pokusu. Zkoušela jsem čtyři koncentrace MGO (50, 250, 500 μ M a 1 mM), kterými jsem působila na AST (5, 25, 50 μ g/ml). Enzymovou aktivitu jsem měřila kinetickou UV metodou v intervalech 0, 0,5, 1, 2 a 4 hodiny. Všechny koncentrace MGO snížily aktivitu AST ve všech měřených intervalech. K největšímu poklesu aktivity došlo v posledním měřeném intervalu (240 minut), který může být tedy považován za rozhodující. Pro další experimenty s HCAs jsem použila AST o koncentraci 5 μ g/ml a 500 μ M MGO, protože pokles aktivity AST v tomto uspořádání experimentu byl dostatečně zřetelný, abychom mohli sledovat vliv látek s potenciálním antiglykačním účinkem, a zároveň nedošlo k úplné ztrátě aktivity enzymu.

Před vlastním měřením potenciálního antioxidačního účinku HCAs jsem pomocí absorpčních spekter těchto kyselin zkoumala jejich **stabilitu**. Měření jsem prováděla s 50 μ M pufovémi roztoky kyselin naředěnými na požadovanou koncentraci těsně před vlastním měřením ze zásobních 10 mM methanolických roztoků uchovávaných při 4°C a 25°C. Jednotlivé kyseliny mají charakteristická spektra s jedním či dvěma maximy. Díky této jejich vlastnosti jsem mohla sledovat případné změny způsobené nestabilitou.

U nejjednodušších hydroxykyselin s jednou hydroxylovou skupinou na benzenovém jádře (*o*-kumarová, *m*-kumarová, *p*-kumarová) se na absorpčním spektru projevuje konjugovaný systém elektronů jako jedno maximum ve vlnových délkách kolem 270 nm. Druhé maximum odpovídající hydroxylové skupině se u kyseliny *o*-kumarové objevuje ve vlnové délce kolem 312 nm. Se změnou polohy OH skupiny od *ortho* k *para* je patrný trend posunu maxima této OH skupiny k nižším vlnovým délkám, až do úplného splynutí obou vln. Je zde tedy patrná závislost charakteru spektra na struktuře - poloze OH. V absorpčním spektru kyseliny kávové, obsahující dvě hydroxylové skupiny v poloze 3 a 4, jsou dvě maxima ve vlnových délkách 286 nm a 310 nm stažena k sobě. Kyseliny rozmarýnová a chlorogenová, odvozené od kyseliny kávové esterifikací karboxylové skupiny, mají absorpční spektra podobná. Projevuje se zde esterová vazba jako maximum ve vlnové délce 324 nm, které splývá s maximem při 287 nm odpovídající konjugovanému systému vazeb. Kyselina sinapová má dvě hydroxylové skupiny v poloze 3 a 5 methylované. V absorpčním spektru se objeví jen jedna vlna s maximem při 306 nm, odpovídající konjugovanému systému vazeb. U všech měřených roztoků kyselin se na absorpčním spektru dále objevovalo maximum ve vlnové délce 253 nm. Pravděpodobně se jedná o katechol, jehož přítomnost lze předpokládat u firmou dodávaných preparátů o čistotě nižší než 100%. V dodávaných látkách se tedy mohou objevit i různá rezidua. Křivky absorpčních spekter všech kyselin vykazovaly ve vlnových délkách pro nás nevýznamných (200 až 240 nm) jasně viditelný roztřesený signál, který mohl být způsoben absorpcí křemenné květy ve zmiňované oblasti. Podobných výsledků však dosáhla i Boušová (ústní sdělení) při měření stability HCAs v plastových květech na spektrofotometru Helios β , přičemž byl tento šum znatelně nižší než u mých vzorků.

V mém experimentu jsem sledovala tvar a posun maxim vlnových délek jednotlivých křivek s ohledem na inkubační čas. V jednotlivých časových intervalech se absorbance měnila bez zjevné závislosti. I přes tyto fluktuace hodnot absorbancí můžeme prohlásit, že HCAs jsou stabilní a nerozkládají se za daných podmínek, protože

tvár křivky a vlnová délka maxim se nemění. Změna velikosti absorbancí v jednotlivých maximech může být způsobena odpařením methanolu při špatném utěsnění zásobních roztoků nebo při pomalé práci při přípravě vzorků k měření.

Po zjištění stabilit HCAs a zavedení methylglyoxalového modelu glykace AST jsem mohla přistoupit k měření potenciální antioxidační aktivity vybraných zástupců HCAs a jejich samotného vlivu na **aktivitu** enzymu pomocí kinetické UV metody. Používala jsem dvě koncentrace HCAs (1 a 5 μM), které lze běžně najít v lidské plazmě (Slanina a Táborská 2004).

Samotná kyselina ***o*-kumarová** neovlivňovala přímo aktivitu AST ani v jedné studované koncentraci a pozitivní vliv na zpomalení glykace (antiglykační účinek) také nevykazovala. Jako rozhodující interval pro hodnocení vlivu kyselin na AST jsem uvažovala poslední měřený interval a to po 240 minutě z již dříve uvedených důvodů.

Kyselina ***p*-kumarová** měla ve všech experimentech podobné rysy jako kyselina *o*-kumarová. Neovlivňovala aktivitu AST ani v jedné studované koncentraci a neměla ani pozitivní vliv na zpomalení glykace AST.

Literatura uvádí, že hydroxyškořicové kyseliny s jednou hydroxylovou skupinou vykazují nižší antioxidační efekt než hydroxyškořicové kyseliny se dvěma hydroxylovými skupinami a OH skupina v poloze *para* pozitivně ovlivňuje antioxidační účinek sloučenin (Rice-Evans a kol. 1996). Tento předpoklad jsem ale nepotvrdila. Může to být pravděpodobně způsobeno tím, že jsem používala nízké koncentrace kyseliny a její účinek se tak nemohl projevit, čemuž by napovídala fluorescenční spektra (viz níže).

Kyselina **kávová** v koncentraci 1 μM neměla přímý vliv na aktivitu enzymu, zatímco v koncentraci 5 μM ji výrazně snížila. Antiglykační účinek byl významný při koncentraci HCA 1 μM , zatímco při 5 μM jen nepatrný. Předpokládalo by se, že kyselina ve vyšší koncentraci bude glykaci zpomalovat ve větší míře. Na tomto pokusu je však patrné, že látka může mít různé přímé i nepřímé účinky na enzym, které se mohou vzájemně ovlivňovat a vyjadřovat v závislosti na podmínkách, v našem případě na koncentracích. Výsledný efekt je tedy dán součtem pozitivních a negativních vlastností látky za daných podmínek. Výhodnější vlastnosti tedy měla kyselina kávová o koncentraci 1 μM , jelikož přímo nepůsobila na aktivitu enzymu, ale pouze na zpomalení glykace enzymu, což ve vyšší koncentraci patrné není.

Zdvojením kyseliny kávové získáme kyselinu **rozmarýnovou**. V obou zkoušených koncentracích měla tato látka přímý vliv na enzym. V koncentraci 5 μM nečekaně aktivitu zvyšovala, v koncentraci 1 μM ji snižovala. Pozitivně působila i na zpomalení glykace enzymu. Při koncentraci 5 μM byl účinek mírně vyšší než při koncentraci 1 μM . Zvýšení aktivity enzymu působením 5 μM kyseliny si nedovedu vysvětlit, pravděpodobně se jedná o chybu při měření. Pro potvrzení výsledků by bylo vhodné všechny pokusy zopakovat.

Jak bylo řečeno výše, hydroxyskořicové kyseliny se dvěma hydroxylovými skupinami (kyselina kávová, rozmarýnová, chlorogenová) mají vyšší antioxidační aktivitu. Ta se snižuje methylací hydroxylové skupiny v poloze *ortho* (kyselina ferulová, sinapová) (Rice-Evans a kol. 1996). Tento předpoklad dále podložili Min a kol (2004) při pokusech s lidským sérovým albuminem, kde pomocí fluorescenčních a absorpčních spekter dokázali úzkou spojitost mezi reaktivitou sloučeniny, sterickými vlivy substituentů a antioxidačním účinkem. V mém experimentu jsem prokázala předpokládaný vyšší antioxidační efekt kyseliny kávové a rozmarýnové než u kyseliny *o* a *p*-kumarové.

Spektrální vlastnosti enzymu a z nich vyplývající vazebné interakce jsem zkoumala pomocí fluorescenčních a absorpčních spekter. Inkubační směsi pro obě metody jsem připravovala stejným způsobem. K samotné AST jsem postupně v pravidelných intervalech přidávala určité množství HCAs (viz metodika) a pozorovala změny ve spektru. Enzym byl stabilní po přidávání ekvivalentního množství pufru. Sestrojením **Stern-Volmerova diagramu** zhášení fluorescence Trp zbytků v molekule AST působením jednotlivých HCAs jsem získala informaci, o jaký typ interakce mezi AST a HCA se jedná. Vlnová délka maxim se se zvyšující se koncentrací posouvala k vyšším vlnovým délkám a Stern-Volmerova konstanta se se zvyšující se koncentrací zvyšovala. Pokud je závislost poměru intenzit fluorescence I_0/I na koncentraci HCAs **lineární**, jedná se buď o zhášení fluorescence dynamické, při kterém dochází ke kolizi zhášeče s molekulou fluoroforu nebo statické, kde se tvoří nefluoreskující komplex mezi zhášečem a fluoroforem. Pokud bychom měření prováděli při různých teplotách a zároveň podrobně prozkoumali absorpční spektra, mohli bychom tyto dva typy mezi sebou rozeznat. Poměr intenzit fluorescence I_0/I při dynamickém zhášení stoupá s teplotou a absorpční spektra se se zvyšující se koncentrací HCA nemění, při statickém naopak. Se zvyšující se teplotou stoupá rychlost pohybu molekul a dochází k častějším

srážkám mezi zhášedčem a fluoroforem, proto se při dynamickém typu zhášení intenzita fluorescence snižuje, poměr intenzit fluorescence I_0/I tedy stoupá. Při statickém typu zhášení se zvyšující se teplotou klesá stabilita tvořených komplexů mezi zhášedčem a fluoroforem, intenzita fluorescence tedy stoupá a klesá poměr intenzit fluorescence I_0/I . Při **exponenciální** závislosti poměru intenzit fluorescence I_0/I na koncentraci HCA se jedná o zhášení kombinované, dynamické a statické a fluorofor je zhášen jednak při srážkách se zhášedčem a zároveň s ním tvoří nefluoreskující komplex (Min a kol. 2004).

Z **fluorescenčního spektra** kyseliny ***o*-kumarové** je patrné, že zháší fluorescenci tryptofanu v závislosti na použité koncentraci. Největší účinek, tj. nejvýraznější zhášení intenzity fluorescence, má kyselina *o*-kumarová v nejvyšší použité koncentraci 100 μM , kde je na rozdíl od ostatních koncentrací skok v zaznamenané intenzitě. Může to naznačit, že kyselina se na AST váže až ve vyšších koncentracích než jsem používala já v experimentech s glykací AST methylglyoxalem a proto nebyl patrný žádný vliv na aktivitu AST ani na zpomalení její glykace. Z výsledků je patrné, že závislost poměru intenzit fluorescence I_0/I na koncentraci HCA je exponenciální, jedná se tedy pravděpodobně o zhášení smíšené.

Ve fluorescenčních spektrech kyseliny ***p*-kumarové** je patrný skok ve zhášení intenzity fluorescence při nejvyšší zkoušené koncentraci HCA stejně jako u předchozí jmenované kyseliny. Z tohoto důvodu se také možná neprojevil antiglykační efekt při pokusu s glykací AST methylglyoxalem, jelikož účinky HCA v mnou používaných nízkých koncentracích se nemusely projevit. Jedná se také pravděpodobně o smíšený typ zhášení fluorescence stejně jako u kyseliny ***m*-kumarové, ferulové a rozmarýnové**, kde je navíc zakřivení exponenciální křivky ostřejší a ke skoku v intenzitě fluorescence dochází už při nižších koncentracích než je maximální zkoušená.

Fluorescenční spektra kyseliny **kávové, sinapové a chlorogenové** jsou rovnoměrněji rozložena, ne skokově jako u ostatních kyselin, a závislost poměru intenzit fluorescence I_0/I na koncentraci HCA vyplývající ze Stern-Volmerova diagramu je lineární. Dalšími experimenty a pečlivým zopakováním a porovnáním absorpčních spekter, bychom zjistili přesně o jaký typ zhášení jde.

Pomocí **absorpčních spekter** můžeme pozorovat interakce HCAs jak s proteinovou částí enzymu, tak s jeho koenzymem. V kratších vlnových délkách můžeme pozorovat změny v samotné proteinové části enzymu a od 320 nm vlastnosti jeho koenzymu.

Koenzym pro AST se vyskytuje ve dvou formách, jako pyridoxal-5'-fosfát s hlavním maximem při 360 nm a menším při 430nm a pyridoxamin-5'-fosfát s posunem maxima z 360 nm na 325-330 nm. První forma koenzymu se vyskytuje před začátkem transaminační reakce nebo po jejím skončení. Přeměna na pyridoxamin-5'-fosfát probíhá během reakce, kdy se aspartát navázaný na koenzym přeměňuje na oxalacetát a jeho aminoskupina zůstane navázána na koenzymu, který se tím změní na pyridoxamin-5'-fosfát.

V mých pokusech se podařilo prokázat, že všechny zkoušené hydroxyskořicové kyseliny se pravděpodobně váží pouze na bílkovinnou část enzymu nikoli koenzym, protože maxima v oblasti vlnových délek od 320 nm patřící koenzymu se se zvyšující se koncentrací HCAs neposouvala. Dalším důkazem je to, že absorpční spektra patřící samotné AST a AST s přídatkem HCA o určité koncentraci po odečtení hodnot absorbancí samotné HCA o téže koncentraci se liší v oblasti vlnových délek od 250 do 280 nm, kde absorbují aromatické aminokyseliny včetně tryptofanu.

Výsledky potvrzují nejednoznačné účinky hydroxyskořicových kyselin jako antioxidantů. Benefiční účinky na zpomalení glykace a oxidace mohou být zastřeny jejich pravděpodobným negativním působením na bílkoviny. Hydroxyskořicové kyseliny a ostatní přírodní antioxidační látky nelze tedy všeobecně doporučovat k užívání bez předešlého posouzení všech jejich i potenciálně toxických účinků.

8. ZÁVĚRY

1. Methylglyoxalový model glykace byl úspěšně zaveden a optimální doba pro odečet validních výsledků se ukázala být 240 minut. Pro další pokusy jsme zvolili AST o koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$ a 500 μM MGO, protože pokles aktivity v tomto uspořádání experimentu byl dostatečně zřetelný pro další sledování vlivu látek s potenciálním antiglykačním účinkem.

2. Hydroxyskořicové kyseliny se ukázaly být stabilní v 10 mM methanolickém roztoku při teplotě 4 a 25°C v rozsahu třítýdenního experimentu.

3. Byly zjištěny jak přímé tak nepřímé účinky HCAs na enzym. Pozitivní vliv na zpomalení glykace vykazovaly 1 μM kyselina kávová a kyselina rozmarýnová v obou studovaných koncentracích. Objevil se pozitivní vliv vyššího počtu OH skupin na zpomalení glykace.

4. Z absorpčních spekter je patrná vazba HCAs na bílkovinou část enzymu, nikoliv na koenzym.

5. Ze sestrojeného Stern-Volmerova diagramu zhášení fluorescence vyplynul pro kyseliny *o*, *m*, *p*-kumarovou, ferulovou a rozmarýnovou smíšený charakter zhášení. Naproti tomu kyseliny kávová, sinapová a chlorogenová vykazují dynamický nebo statický typ zhášení fluorescence.

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3-DG	3-deoxyglukozón
AGE	pozdní produkty glykace (advanced glycation end-products)
AGE R1-R3	receptory pro AGE
AST	aspartátaminotransferáza
CA	kyselina kávová
CEL	N ^ε -karboxyethyllysin
CMA	karboxymethylarginin
CML	N ^ε -karboxymethyllysin
COMT	katechol-O-methyltransferáza
DOLD	3-deoxyglukosone-derived lysine dimer
FA	kyselina ferulová
GLX I	glyoxaláza I
GLX II	glyoxaláza II
GO	glyoxal
GODIC	glyoxal-derived imidazoline cross-link
GOLD	glyoxal-derived lysine dimer
GSH	glutathion
HCA	hydroxyskořicová kyselina
HSA	lidský sérový albumin
CHA	kyselina chlorogenová
IRS	substrát pro inzulínový receptor
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
MDH	malátdehydrogenáza
MGO-H	methylglyoxal-derived hydroimidazolone
MGO	methylglyoxal
MK	kyselina <i>m</i> -kumarová
MODIC	methylglyoxal-derived imidazoline cross-link
MOLD	methylglyoxal-derived lysine dimer
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid (redukovaná forma)
OK	kyselina <i>o</i> -kumarová
PAL	fenylalanylammóniumlyáza

PI3 kináza	fosfatidylinositol-3-OH kináza
PK	kyselina <i>p</i> -kumarová
RA	kyselina rozmarýnová
RAGE	receptor pro AGE
ROS	reaktivní formy kyslíku
SA	kyselina sinapová
SD	směrodatná odchylka
TAL	tyrosinammoniumlyáza

10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Ahmed N. (2005): Advanced glycation end products-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **67(1)**: 3-21

Ahmed N. a Thornalley P. J. (2002): Chromatographic assay of glycation adducts in human serum albumin glycated in vitro by derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and intrinsic fluorescence. *Biochemistry* **43(45)**: 14431-14443, *převzato z Vostrý (2006)*

Bakala H., Delaval E., Hamelin M., Bismuth J., Borot-Laloi C., Corman B. a Friguet B (2003). Changes in rat liver mitochondria with aging. Lon protease-like reactivity and N^ε-carboxymethyllysine accumulation in the matrix. *Eur J Biochem.* **270(10)**: 2295-302

Baynes J. W. (2003): Chemical modification of proteins by lipids in diabetes. *Clin. Chem. Lab. Med.* **41(9)**: 1159-65

Beránek M. a Palička V. (1998): Farmakologický význam glykací plazmatických proteinů. *Česká a slovenská farmacie* **5(47)**: 211-214

Beránek M., Dršata J. a Palička V. (2001): Inhibitory effect of glycation on catalytic activity of alanine aminotransferase. *Mol. Cell. Biochem.* **218**: 35-39

Beránek M., Dršata J. a Palička V. (2002): In vitro glycation of aminotransferases: a process closely depending on the employed experimental conditions. *Acta Medica* **45(3)**: 89-92

Bierhaus A., Hofmann M. A., Ziegler R. a Nawroth P. P. (1998): AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular diseases and diabetes mellitus. In: *The AGE concept. Cardiovasc. Res.* **37**: 586-600, *převzato z Janebová a kol. (1999)*

Boel E., Selme J., Flodgaard H. J. a Jensen T. (1995): Diabetic late complications: will aldose reductase inhibitors or inhibitors of advanced glycosylation end-product formation hold promise? *J. Diabetes Complication* **9**: 104-129, *převzato z Singh (2001)*

Bourajaj M., Stehouwer C. D., van Hinsbergh V. W. a Schalkwijk C. G. (2003). Role of methylglyoxal adducts in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *Biochem. Soc. Trans.* **31(6)**: 1400-1402

Boušová I., Martin J., Jahodář L., Dušek J., Palička V. a Dršata J. (2005): Evaluation of in vitro effects of natural substances of plant origin using a model of protein glycooxidation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **37(5)**: 957-62

Dolhofer R., Siess E. A. a Wieland O. H. (1982): Inactivation of bovine kidney β -N-acetyl-D-glucosaminidase by nonenzymatic glucosylation. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **363**: 1427-1436, *převzato z Beránek a kol. (2001)*

Dršata J., Beránek M. a Palička V. (2002): Inhibition of aspartate aminotransferase by glycation in vitro under various conditions. *J. Enz. Inh. Med. Chem.* **17 (1)**: 31-36

Holeček V. a Racek J. (1995): Význam volných radikálů a pokročilých produktů glykosylace (AGE) u diabetes mellitus. *Klin. Biochem. Metab.* **3(24)**: 18-21, *převzato z Janebová a kol. (1999)*

Hsueh W. A. a Law R. E. (1998): Cardiovascular risk continuum: implication of insulin resistance and diabetes. *Am. J. Med.* **105**: 4S-14S, *převzato z Singh a kol (2001)*

Hudson B. I. a Wendt T. (2005): Diabetic vascular disease: it's all the RAGE. *Antiox. Red. Sign.* **7(11-12)**: 1588-1600

Chen J. H. a Ho C-T. (1997): Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 2374-2378

Chi-Hao Wu a Gow-Chin Yen (2005): Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation end products. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 3167-3173

Jakuš V. (2003): Úloha neenzýmovej glukácie a glykoxidácie v rozvoji diabetických vaskulárnych komplikácií. *Čs. Fyziol.* **52(2)**: 51-65

Jakuš V., Čárský J. a Hrnčiarova M. (1998): Význam koncových produktov pokročilej glykácie-AGEs. *Bratisl. Lek. Listy.* **93**: 375-381

Janebová M., Zima T. a Tesař V. (1999): AGEs-produkty pokročilé glykace, advanced glycation (glycosylation) end-products. *Remedia* **9**: 94-103

Kern S. M., Bennett R. N., Mellon F. A., Orion P. A. a Garcia-Conesa M. T. (2003): Absorption of hydroxycinnamates in humans after high-bran cereal consumption. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 6050-6055, *převzato z Manach a kol. (2005)*

King G. L. a Brownlee M. (1996): The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocrin. Metab. Clin. North Am.* **25**: 255-270

Manach C., Williamson G., Morand Ch., Scalbert A. a Rémésy Ch. (2005): Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**: 230-242

Miyata T., van Ypersele de Strihou C. a Kurokawa K. (1999): Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of carbonyl stress in long-term uremic complication. *Kidney Int.* **55(2)**: 389-399

Montonen J., Knekt P., Jarvinen R. a Reunanen A. (2004): Dietary antioxidant intake and risk of type 2 diabetes. *Diabetes Care* **27**: 362-366, *převzato z Chi-Hao Wu a Gow-Chin Yen (2005)*

Nagai R., Ikeda K., Higashi T., Jinnouchi Y., Akari T. a Horouchi S. (1997): Hydroxyl radical mediates N^ε-(carboxymethyl)lysine formation from Amadori product. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**(1): 167-172, *převzato z Jakuš a kol. (1998)*

Nardini M., Cirillo E., Natella F. a Scaccini C. (2002): Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 5735-5741, *převzato z Manach a kol. (2005)*

Olthof M. R., Holman P. C. H. a Katan M. B. (2001): Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr.* **131**: (66-71), *převzato z Manach a kol. (2005)*

P.M. Dewick (2002): Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. John Wiley and sons, Ltd., 520

Rice-Evans C. A., Miller N. J. a Paganga G. (1996): Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad.Biol. Med.* **20**(7): 933-956

Rice-Evans C. A., Miller N. J. a Paganga G. (1997): Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trend Plant. Sc.* **2**(4): 152-159

Sano H., Higashi T., Matsumoto K. a kol. (1998): Insulin enhances macrophage scavenger receptor mediated endocytic uptake of advanced glycated end product. *J. Biol. Chem.* **273**: 836-842, *převzato z Singh a kol. (2001)*

Seidler N. W. a Kowalewski C. (2003): Methylglyoxal-induced glycation affects protein topography. *Arch. Biochem. and Biophys.* **410**: 149-154

Seidler N. W. a Seibel I. (2000): Glycation of aspartate aminotransferase and conformational flexibility. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **277**: 47-50

Shinohara M., Thornalley P. J. a kol. (1998): Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation end product formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. *J. Clin. Invest.* **101**(5): 1142-1147, *převzato z Vostrý (2006)*

Shipanova I. N., Glomb M. A. a Nagaraj R. H. (1997): Protein modification by methylglyoxal: chemical nature and synthetic mechanism of a major fluorescent adduct. Arch. Biochem. Biophys. **344**: 29-36, *převzato ze Seidler a kol. (2003)*

Singh R., Barden A., Mori T. a Beilin L. (2001): Advanced glycation end-products: a review. Diabetologia **44**: 129-146

Slanina J. a Táborská E. (2004): Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. Chem. Listy **98**: 239-245

Smedsrod B., Melkko J., Araki N, Sano H. a Horiuchi S. (1997): AGE`s are eliminated by scavenger receptor mediated endocytosis of hepatic sinusoid kupffer cell and endothelial cells. Biochem. J. **322**: 567-573, *převzato z Singh (2001)*

Spilková J. a Dušek J. (1996): Vybrané přírodní látky s antioxidační aktivitou. Čes. a Slov. Farm. **45(6)**: 296-301

Sroka Z. a Cisowski W. (2002): Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. Food Chem. Tox. **41**: 753-758

Stitt A. W., Bucala R. a Vlassara H. (1997): Atherogenesis and advanced glycation: Promotion, progression and prevention. In: Atherosclerosis research. Ann. NY Acad. Sci. **811**: 115-127, *převzato z Janebová a kol (1999)*

Thornalley P. J. (1996): Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins a nucleic acid and enzymatic detoxification-a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. Gen.Pharmacol. **27(4)**: 567-573

Thornalley P. J., Battah S. a kol. (2003): Quantitative screening of advanced glycation end products in cellular and extracellular proteins by tandem mass spektrometry. Biochem. J. **375(Pt 3)**: 581-592, *převzato z Vostrý (2006)*

Vlassara H. (1997): Recent progress in advanced glycation end products and diabetic complications. Diabetes **46**: 19-25, *převzato z Janebová a kol (1999)*

Vostrý M. (2006): Vliv methylglyoxalu na spektrální vlastnosti glutamát dehydrogenasy-Rigorózní práce. Katedra bioch. věd Faf UK HK: 41

Wells Knecht K. J., Brinkhamann E., Wells Knecht M. C., Lichtfield J. E., Ahmed M. U., Reddy S., Zyzak D. V., Thorpe S. R. a Baynes J W. (1996): New biomarkers of Maillard reaction damage to proteins. *Nephrol. Dial. Transplant.* **1:** 41-47, *převzato z Janebová (1999)*

Wu J. T. a Tu M. Z. P. (1996): Advanced glycation end product (AGE): Characterization of the products from the reaction between D-glucose and serum albumin. *J. Clin. Lab. Anal.* **10:** 21-34, *převzato z Jakuš (2003)*

enzymová databáze BRENDA (<http://www.brenda.uni-koeln.de/>)