

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD**



**VZNIK KARBONYLOVÝCH SKUPIN VLIVEM
NEENZYMOVÉ GLYKACE PROTEINŮ**

Diplomová práce

Hradec Králové, 2009

Lenka Krautová

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a veškeré zdroje, ze kterých jsem čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Na tomto místě bych ráda poděkoval PharmDr. Ivě Boušové, Ph.D. za její praktické rady, trpělivost a ochotu pomoci mi, při vypracovávání této diplomové práce.

ABSTRAKT

Vypracovala: Lenka Krautová

Místo vypracování: Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Název: Vznik karbonylových skupin vlivem neenzymové glykace proteinů

Školitel: PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Tato diplomová práce byla zaměřena na optimalizaci stanovení množství karbonylových skupin v biologickém materiálu. Karbonylové skupiny vznikají vlivem oxidace nebo glykace proteinů. Jako modelovou bílkovinu pro spektrofotometrickou metodu stanovení jsem použila bovinní sérový albumin a pro elektroforetickou metodu aspartátaminotransferázu, které jsem glykovala několika glykačními činidly (glukóza, glukóza + měď, fruktóza, fruktóza + měď, metylglyoxal). U spektrofotometrického stanovení jsem optimalizovala různé parametry: rozpouštědlo, koncentraci činidla, množství bílkoviny a délku inkubace. Podařilo se mi nalézt vhodné podmínky stanovení, které jsem používala v dalších experimentech s různými glykačními činidly. U elektroforetického stanovení jsem prováděla SDS-PAGE s následným barvením stříbrem nebo imunobloting s chemiluminiscenční detekcí. Výsledky spektrofotometrického stanovení ukázaly, že nejvyšší glykační schopnost má metylglyoxal, následuje fruktóza s přidavkem měďnatých iontů, samotná fruktóza, glukóza s přidavkem měďnatých iontů a nejpomalejším glykačním činidlem je glukóza. U elektromigračních metod došlo ke snížení pohyblivosti glykovaných bílkovin díky zvýšení jejich molekulové hmotnosti v důsledku tvorby zkřížených vazeb. Zde se jako neúčinnější glykační činidlo projevila fruktóza s přidavkem měďnatých iontů, kde již po sedmi dnech inkubace došlo k tak velkému nárůstu molekulové hmotnosti proteinu, že do gelu vůbec neprostoupil.

ABSTRACT

Author: Lenka Krautová

Publishing place: Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Title: Formation of carbonyl compounds by non-enzymatic protein glycation

Supervisor: PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

This diploma thesis was aimed at the optimization of carbonyl groups determination in biological material. Carbonyl groups are formed by effect of protein oxidation or glycation. As a model protein, I used bovine serum albumin for spectrophotometric and aspartate aminotransferase for electrophoretic method of assessment, which were glycated by several glycating agents (glucose; glucose + copper; fructose; fructose + copper; methylglyoxal). I optimized different parameters of spectrophotometric determination: solvent, concentration of reagent, amount of protein, and duration of incubation. I managed to find suitable conditions of this determination, which I have used in subsequent experiments with different glycating agents. At electrophoretic determination, I performed SDS-PAGE with following silver staining or immunoblotting with chemiluminescent detection. The results of spectrophotometric determination showed that methylglyoxal has the highest glycating ability, followed by fructose with addition of cupric ions, fructose itself, glucose with addition of cupric ions, and the slowest glycating agent is glucose. At electromigration methods, the mobility of glycated proteins decreased due to the increase in their molecular weight as a result crosslinks formation. Fructose with addition of cupric ions approved here to be the most effective glycating agent, where such a big increase in molecular weight of protein occurred after seven days incubation that they did not permeate to the gel at all.

Obsah

Obsah	1
1 Úvod.....	3
2 Současný stav poznání	4
2.1 Oxidační stres	4
2.2 Modifikace proteinů.....	7
2.2.1 Neenzymová glykace	8
2.2.2 Peroxidace lipidů	11
2.2.3 Chemická modifikace peptidové vazby	12
2.2.4 Autooxidace glukózy a glyoxidace.....	13
2.2.5 Degradace oxidovaných proteinů	15
2.3 Karbonylový stres	17
2.4 Diabetes mellitus.....	21
2.4.1 Mechanismy vzniku komplikací diabetu	21
2.4.2 Chronické komplikace diabetu	25
3 Cíle práce	27
4 Materiál a metodika	28
4.1 Použitý materiál	28
4.2 Použitá zařízení.....	29
4.3 Metodika	30
4.3.1 Příprava základních roztoků	30
4.3.2 Příprava inkubačních směsí	33
4.3.3 Optimalizace spektrofotometrického stanovení koncentrace karbonylových skupin.....	34
4.3.4 Detekce karbonylových skupin vzniklých při glykaci AST pomocí elektroforetických metod	38
5 Výsledky	41
5.1 Optimalizace spektrofotometrického stanovení karbonylových skupin.....	41
5.1.1 Sledování rozpustnosti proteinové pelety za použití fosfátového pufru nebo guanidin hydrochloridu	41
5.1.2 Nalezení vhodné koncentrace DNPH	43
5.1.2 Nalezení vhodné délky inkubace BSA s DNPH.....	45
5.1.3 Nalezení vhodného množství proteinu ve vzorku.....	47

5.1.4	Sledování účinku různých glykačních činidel na tvorbu karbonylových skupin v čase	49
5.2	Detekce karbonylových skupin vzniklých při glykaci AST pomocí elektroforetických metod	53
5.2.1	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek (SDS-PAGE).....	53
5.2.2	Imunobloting po SDS-PAGE.....	58
6	Diskuze	61
7	Závěr	65
8	Seznam použitých zkratk	66
9	Použitá literatura	68

1 Úvod

Svoji diplomovou práci jsem vypracovala na katedře biochemických věd FaF UK v Hradci Králové, kde se již delší dobu zabývá skupina profesora Dršaty a doktorky Boušové problematikou neenzymové glykace proteinů a jejího ovlivnění látkami s antioxidačními účinky *in vitro*. Svou prací jsem navazovala na předešlé práce diplomantů (Švehlová 2007, Bacílková 2008) věnujících se tomuto tématu.

Karbonylové skupiny vznikají ve větší míře při oxidačním poškození proteinů vlivem probíhajícího oxidačního stresu a také při neenzymové glykaci proteinů. Ač neenzymová glykace probíhá i za fyziologických podmínek a s věkem se zvyšuje, tak má velký význam při řadě onemocnění, jako je diabetes mellitus, ateroskleróza, onemocnění ledvin, zákal oční čočky a dalších. Proto se řada studií věnuje detekci, rozpoznání a možnosti ovlivnění a zpomalení tvorby glykačních produktů. Neenzymovou glykací dochází k modifikaci proteinů a tedy i ke změně jejich funkce. Proteiny v organismu plní úlohu transportní, stavební, imunitní, katalytickou a další. Neenzymová glykace (Maillardova reakce) je sled reverzibilních i ireverzibilní reakcí vedoucích ke vzniku reaktivních meziproductů α -oxoaldehydů, jejichž hromadění vede ke vzniku konečných produktů pokročilé glykace (AGE) a karbonylového stresu. Charakteristickou vlastností většiny AGE je schopnost vzájemného zesílení molekul proteinů, čímž je sníženo vylučování těchto látek a dochází k jejich následnému hromadění ve tkáních a poškození jednotlivých orgánů.

V praktické části své diplomové práce jsem se nejdříve věnovala optimalizaci podmínek spektrofotometrického stanovení karbonylových skupin ve vzorcích obsahujících BSA glykované různými glykačními činidly (glukóza, glukóza + měď, fruktóza, fruktóza + měď, metylglyoxal). Ve druhé fázi jsem využila elektroforetické metody SDS-PAGE a imunoblotingu pro detekci glykačních produktů vzniklých působením stejných glykačních činidel na molekulu enzymu aspartátaminotransferázy. Přítomnost proteinů s vyšší molekulovou hmotností než mělo samotné AST, svědčilo o proběhlé neenzymové glykaci a vzniku AGE.

2 Současný stav poznání

2.1 Oxidační stres

Porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraněním volných radikálů je nazýváno oxidačním stresem (Štípek a kol. 2000). Tento stav může být vyvolán nadměrnou produkcí volných radikálů, což je nejčastější případ, nedostatečnou funkcí antioxidačního ochranného systému nebo kombinací obou těchto stavů (Dalle-Dono a kol. 2003B).

Volné radikály jsou charakterizované přítomností nepárového elektronu v zevním orbitalu. Radikály se snaží nepárový elektron doplnit a bývají proto velmi reaktivní. Navazují se extrémně rychle na jinou strukturu, které elektrony předávají nebo jí elektrony odnímají. Odnímáním nebo přijímáním elektronu dalšími molekulami dochází k tvorbě dalších reaktivních částic. Radikálová reakce pokračuje za vzniku dalších toxických produktů. Ukončení radikálových reakcí nastane při setkání dvou molekul s nepárovými elektrony nebo reakcí s antioxidantem (Racek a Holeček 1999). Podle již klasické definice jsou antioxidanty molekuly, které jsou přítomny v malých koncentracích ve srovnání s látkami, jež by měly chránit a mohou zabraňovat nebo omezovat oxidační destrukci těchto látek (Paulová a kol. 2004).

Můžeme rozlišit endo- a exogenní zdroje volných radikálů. Při endogenním vzniku radikálů se hlavně uplatňují metabolické pochody v mitochondriích, peroxisomech a endoplazmatickém retikulu. Dále k jejich vzniku dochází během fagocytózy, během ischemicko-reperfučního stavu a zánětu (Ďuračková 1998).

Nejvíce endogenních volných radikálů vzniká v dýchacím řetězci v mitochondriích, kdy oxidací vzdušným kyslíkem vzniká energie a vedlejším produktem jsou superoxidový a hydroxylový radikál. Enzym superoxidodismutáza se uplatňuje v tomto systému jako antioxidant (Rahbar a Figarola 2003). Do exogenních vlivů spadá cigaretový kouř, znečištění prostředí pesticidy, xenobiotika, ozón a ionizující záření (Dalle-Dono a kol. 2003B). Hyperglykémie aktivuje proteinkinázu C, která zvyšuje aktivitu fosfolipázy A₂ a následná syntéza prostaglandinů je dalším zdrojem radikálů (Janebová a kol. 1999). Antioxidační mechanismy mohou být poškozeny například mutací nebo chyběním enzymu v tomto systému (Dalle-Dono a kol. 2003B). Frekvence mutací s věkem stoupá, zejména v mitochondriální DNA. K mutacím dochází hlavně ve tkáních, které jsou více okysličovány (kosterní a srdeční sval, mozek).

Organismus poškozují kromě volných radikálů i jiné reaktivní látky, které však již nemají nepárový elektron, a tyto dvě skupiny se souhrnně označují jako reaktivní formy. Reaktivní formy můžeme rozdělit do několika skupin: reaktivní formy kyslíku (ROS), dusíku (RNS) a síry (RSS), které jsou někdy označovány jako radikály odvozené od organických sloučenin (Lushchak 2007, Ďuračková 1998). Koncentrace volných radikálů má vliv na homeostázu, proto je důležité volné radikály udržovat na vhodné hladině (Chakravarti a Chakravarti 2007). Skupina ROS zahrnuje volné radikály jako superoxid ($O_2^{\bullet-}$), hydroxylový radikál (OH^{\bullet}), peroxylový radikál (ROO^{\bullet}), alkoxylový radikál (RO^{\bullet}) a látky, které nejsou volnými radikály jako například peroxid vodíku (H_2O_2), singletový kyslík (1O_2) a ozón (O_3). Skupina RNS se skládá z radikálů oxidu dusnatého (NO^{\bullet}) a oxidu dusičitého (NO_2^{\bullet}) a dalších látek, které nejsou volnými radikály, jako jsou nitrosil (NO^+), kyselina dusitá (HNO_2) a peroxyinitrit ($ONOO^-$) (Štípek a kol. 2000). Thiyllový radikál (RS^{\bullet}) a jeho deriváty jsou příklady RSS (Lushchak 2007). Všechny tyto sloučeniny jsou chemicky velmi aktivní. Nejvíce studií se věnovalo vzniku a působení ROS, proto jsou tyto sloučeniny nejlépe prozkoumány. ROS mají schopnost modifikovat řadu makromolekul (lipidy, proteiny, DNA).

Oxidace lipidů může vést ke ztrátě násobných vazeb a vzniku reaktivních metabolitů (aldehydy). Jako následek se objevují změny ve fluiditě a propustnosti, které mohou vést až k lýze buněk. Modifikace proteinů může způsobit zesílení proteinů, jejich fragmentaci a modifikaci funkčních skupin, jejichž následkem může být porucha jejich funkce. Proteiny mohou fungovat jako intra- nebo extracelulární signální molekuly a buňka díky nim získává řadu informací ze svého okolí. Modifikací proteinů se tyto signální dráhy poruší. Enzymy také mají proteinovou strukturu, a proto vlivem oxidace dochází k poruše jejich funkce. Enzymy obsahující přechodný kov v místě nebo blízkosti aktivního centra jsou zvláště citlivé ke kovem katalyzované oxidaci. Přeměna DNA může způsobit štěpení cukerného kruhu, modifikaci bází a zlomy řetězců, což může mít za následek mutace a translační chyby (Lushchak 2007, Štípek a kol. 2000). Rozsah poškození je dán procentem poškozených molekul a délkou trvání oxidace (Chakravarti a Chakravarti 2007).

V současné době se věnuje zvýšená pozornost nejen volným radikálům, ale také konečným produktům pokročilé glykace (AGE), které mají vliv na vznik řady onemocnění, jako jsou endokrinní (diabetes mellitus), vaskulární (aterosklerosa), neurodegenerativní (Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba), renální (urémie),

autoimunitní (lupus erythematosus), oční (katarakta), gastrointestinální, jaterní nebo plicní onemocnění a další patologie, jako jsou záněty, nádory nebo stárnutí (Štípek a kol. 2000, Chakravarti a Chakravarti 2007).

Na druhé straně však organismus dokáže využít volné radikály i ve svůj prospěch. Fagocytující buňky využívají svého metabolického vzplanutí myeloperoxidázového systému k tvorbě hydroxylového radikálu, peroxidu vodíku a chlornanů ke zničení mikroorganismů (Ďuračková 1998). Reaktivní formy kyslíku a dusíku mohou také sloužit jako signální molekuly, díky kterým buňka získává informace z okolí a následkem toho může dojít k aktivaci genů kódujících cytokiny, adhezní molekuly, proteiny zánětu a další (Štípek a kol. 2000). Dalším místem uplatnění volných radikálů je reprodukce. Spermie k úspěšnému proniknutí do vajíčka potřebují superoxid, díky kterému rozruší její membránu. Oplodněné vajíčko poté produkuje hydroxylový radikál, díky kterému se na oplodněném vajíčku vytvoří křížové vazby z jednotek tyrozinu, což zabrání průniku dalších spermií (Ďuračková 1998).

2.2 Modifikace proteinů

Proteiny jsou důležitou součástí živého organismu, kde zastávají funkci stavební, transportní, signalizační, katalytickou, fungují jako obrana proti patogenům a tvoří více než 50% sušiny buňky. Proteiny jsou v organismu zdrojem dusíku, v krvi působí jako účinný pufrovací systém a přispívají k udržení osmotického tlaku vně i uvnitř buňky. Za určitých okolností může dojít k jejich modifikaci, přestavbě, či rozštěpení peptidové vazby, což může mít negativní vliv na jejich funkci. Na proteiny působí volné radikály, oxidační stres hyperglykémie, produkty lipidové peroxidace a další.

Díky modifikaci proteinů vlivem neenzymové glykace se mění fyzikálně-chemické vlastnosti proteinů. Dochází ke změně jejich propustnosti, snižuje se izoelektrický bod, náboj mají více negativní, také se zde objevuje možnost vzniku zkřížených vazeb tzv. „cross-linků“. Tyto proteiny jsou rezistentní k proteolytickému štěpení, což vede k problémům s odbouráváním, jehož následkem je hromadění ve tkáních (Janebová a kol. 1999).

Oxidaci proteinů můžeme rozdělit do dvou skupin. V prvním případě se jedná o specifickou oxidaci – dochází k oxidaci určitých aminokyselinových zbytků a vznikají specifické produkty oxidace (např. oxidace fenylalaninu na *o*-tyrosin). Druhým případem je oxidace celková, jejich výsledkem je tvorba širokých variant různých produktů (např. zavádění karbonylových skupin do postranních řetězců molekuly proteinu). Celková oxidace může ovlivnit více proteinů než specifická, a proto může být účinek takové oxidace mnohem škodlivější (Chakravarti a Chakravarti 2007). Oba typy oxidačního poškození vedou ke změně struktury postranních řetězců aminokyselin, fragmentaci řetězce na kratší peptidy, tvorbě zkřížených vazeb mezi vzniklými produkty poškození a nových aminokyselin v peptidech (Ďuračková 1998).

U modifikovaných proteinů, které se nerozložily, dochází k jejich hromadění a tvorbě kovalentních a nekovalentních vazeb. Kovalentní vazby mají za následek tvorbu disulfidických můstků nebo 2,2-bifenylové vazby mezi dvěma volnými radikály nebo dvěma radikály karbonylu. Nekovalentní vazby vznikají na základě hydrofobních nebo elektrostatických interakcí mezi oxidovanými aminokyselinami (Chakravarti a Chakravarti 2007).

Měření hladiny modifikovaných proteinů jako ukazatele oxidačního stresu má několik výhod ve srovnání s měřením peroxidace lipidů nebo oxidace DNA.

1. Proteiny hrají důležitou roli v udržení buněčných struktur a funkcí. Proto se často setkáváme s měřením aktivity enzymů, jejichž molekuly byly pozměněny.
2. Modifikované proteiny jsou poměrně stálé, tvoří se brzy a v krvi cirkulují po delší dobu než nemodifikované molekuly.
3. Pro stanovení modifikovaných proteinů jsou dostupné citlivé metody, např. spektroskopické, imunochemické, HPLC analýza (Chakravarti a Chakravarti 2007).

2.2.1 Neenzymová glykace

Jedná se o kondenzační reakci, kterou lze také označit jako nukleofilní adici mezi karbonylovou skupinou aldehydů redukujících cukrů s N-terminální nebo volnou aminoskupinou proteinu (Huijberts a kol. 2008). Potravinový chemik Louis Camille Maillard provedl roku 1912 pokusy, které ukazovaly na to, že vlivem tepla dochází k tvorbě komplexů mezi aminokyselinami a redukujícími cukry a vznikají žlutohnědé sloučeniny. Proto je dnes neenzymová glykace známa jako „Maillardova reakce“. Jedná se o sérii paralelních reakcí, které lze rozdělit do 3 fází. Všechny reakce mohou probíhat současně, proto se mohou navzájem ovlivňovat (Henle 2005). Maillardovy reakce se účastní volné aminoskupiny peptidů, nukleových kyselin, lipidů, aminů, fosfolipidů, karbonylové skupiny redukujících cukrů a degradační produkty sacharidů (Nguyen 2006).

Výsledkem těchto kaskádovitých reakcí jsou látky, které jsou označovány jako konečné produkty pokročilé glykace (AGE). AGE tvoří heterogenní skupinu látek. Tyto modifikované proteiny se vyznačují mnohem vyšší molekulovou hmotností než proteiny, ze kterých vznikly. Je pro ně typická a společná žlutohnědá pigmentace, u některých s možností fluorescence (Janebová a kol. 1999).

Glykace jako taková není pro organismus škodlivá, ale její produkty se uplatňují u řady patologických procesů. AGE vytvářejí kovalentní vazby mezi molekulami proteinů, což je považováno za zásadní právě při jejich negativních účincích. Tvorba AGE je katalyzována přechodnými kovy a naopak inhibována látkami s redukujícími vlastnostmi, jako je kyselina askorbová (Singh a kol. 2001). AGE ke svému vzniku potřebují kyslík, protože za anaerobních podmínek pozdní fáze reakce neprobíhá (Janebová a kol. 1999). Lidské sérové proteiny s pomalou rychlostí degradace jsou zvláště citlivé ke glykaci. K takovým proteinům řadíme hemoglobin, albumin, LDL částice, krystaliny v oční čočce a různé formy kolagenu (Osuna a kol. 2008).

Kromě endogenně vzniklých AGE existují také exogenní zdroje, jako je potrava, především pokud je tepelně zpracována a cigaretový kouř. Jen malá část takto přijatých AGE je absorbována do cirkulace (10%) a z nich je asi třetina vyloučena močí a stolicí. Ledviny jsou hlavním orgánem pro vylučování AGE a také orgánem, ve kterém se AGE hromadí. Plazmatická koncentrace AGE významně souvisí s progresí renální insuficience (Janebová 2007).

Maillardova reakce

1. Iniciace – tvorba Amadoriho produktů

Aldehydová skupina redukujícího cukru a ϵ -aminoskupina lyzinu proteinu dávají vzniknout N-glykosaminu (Schiffova baze). Schiffova baze je aldimin a tvorba je reverzibilní. Po odeznění přechodné hyperglykémie se glukóza z vazby zase uvolňuje. Trvá-li však hyperglykémie delší dobu, dochází během několika hodin k přesmyku na Amadoriho produkt, který má charakter ketoaminu (Janebová a kol 1999, Obšil a Pavlíček 1997). Během tohoto přesmyku dochází k přeměně aldehydické dvojnás vazby mezi C a O redukujícího cukru a dvojnás vazbou C a N aminoskupiny proteinu (Capote a Sanchez 2008). Tvorba Amadoriho produktu je ještě vratným dějem, i když je rychlost jeho tvorby vyšší než rychlost zpětné reakce (Ulrich a Cerami 2001). Amadoriho produkt vzniká v případě, že redukující cukr je aldóza, ketózy dávají vzniknout Heynsovu produktu (Obšil a Pavlíček 1997). Určité aminoskupiny proteinů jsou více náchylné ke glykaci. Jsou to hlavně terminální aminoskupiny zakončené postranním řetězcem lysinu. Argininové zbytky jsou už mnohem méně citlivé (Osuna a kol. 2008).

Rychlost formování AGE může být ovlivněna strukturou a vlastnostmi glykačního činidla i glykované látky a součinem koncentrací reagujících složek. U proteinu (glykované látky) má velký vliv na reaktivitu jejich α -aminoskupin pK_a . Nižší hodnota pK_a , a tím vyšší nukleofilita, urychluje tvorbu Schiffovy baze. V místech, kde dochází ke glykaci, ovlivňují kinetiku Amadoriho přesmyku Schiffovy baze i okolní aminokyselinové zbytky (Obšil a Pavlíček 1997). Kladný náboj lokalizovaný v blízkosti aminokyselinového zbytku katalyzuje reakci vedoucí k tvorbě Amadoriho produktu. Naopak tvorba vodíkových vazeb mezi aminokyselinovými zbytky je mohou částečně chránit před glykací (Capote a Sanchez 2008).

V průběhu celého života většiny buněk je koncentrace Amadoriho produktů v rovnováze s glukózou, proto zvýšení nebo snížení koncentrace Amadoriho produktů

koreluje s hladinou glukózy (Huijberts a kol. 2008). Rychlost glykace je funkcí rychlosti anomerizace cukru a je také nepřímo úměrná počtu atomů uhlíku v molekule cukru. Proto je nejnižší pro hexózy a nejvyšší pro triózy. Fosforylované cukry jsou také mnohem reaktivnější než ty nefosforylované. Reaktivita cukrů tedy roste v pořadí glukóza < manóza < galaktóza < xylóza < fruktóza < arabinóza < ribóza (Obšil a Pavlíček 1997). Právě počáteční fáze Maillardovy reakce jsou na hladině cukrů více závislé než ty pozdější (Singh a kol. 2001).

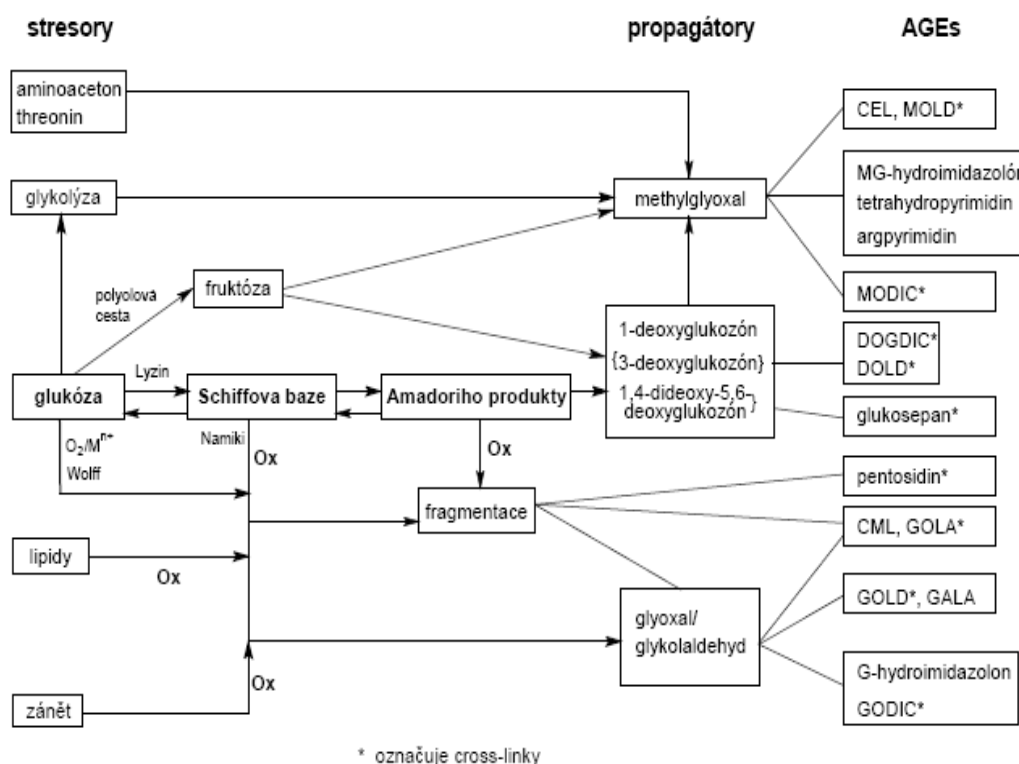
2. Propagace – degradace Amadoriho produktů

Amadoriho produkty se mohou nevratně oxidovat za vzniku N-karboxymethylalkylaminu nebo dojde k jejich rozkladu na původní amin a deoxyglukozon. Při vyšším pH Amadoriho produkty enolizují v pozici mezi druhým a třetím uhlíkem a eliminují amin z prvního uhlíku za vzniku 1-deoxyglukozonu. Při nižším pH se ketoaminy přesmykují a enolizují v pozici mezi prvním a druhým uhlíkem za vzniku 3-deoxyglukozonů. Některé diketony touto cestou tvoří 4-deoxyglukozony. Deoxyglukozony (α -oxoaldehydy) jsou velmi reaktivní sloučeniny, které opět reagují s volnou aminoskupinou a tím propagují Maillardovu reakci a způsobují tak nevratné změny v molekulách proteinů tvorbou heterocyklických produktů a inter- a intramolekulárních můstků (Obšil a Pavlíček 1997).

3. Terminace – tvorba AGE

Amadoriho produkty podstoupí další oxidační reakci za tvorby nevratných forem AGE. Tyto produkty mohou reagovat s aminy a dalšími karbonylovými sloučeninami. AGE produkty jsou termodynamicky stabilní a ukončují Maillardovu reakci (Obšil a Pavlíček 1997).

Jak již bylo řečeno, glukóza je velmi pomalé glykační činidlo, proto pro Maillardovu reakci mají zpětně význam její meziproducty. K meziproductům řadíme glyceraldehyd-3-fosfát, dihydroxyacetonfosfát, glyceraldehyd-3-fosfát, dikarbonylové sloučeniny jako jsou glyoxal (GO), 3-deoxyglukozon (DG) a metylglyoxal (MGO), který patří mezi látky s nejvyšší glykační schopností. (Huijberts a kol. 2008, Capote et al 2008).



Obrázek 1: Vznik AGE (upraveno dle Monnier a Wu 2003, Singh a kol. 2001)

2.2.2 Peroxidace lipidů

Je to děj, se kterým se setkáváme i v běžném životě – žluknutí tuků na vzduchu. Peroxidace lipidů je chemický proces vyplývající z oxidativního poškození lipidů. V organismu jsou k tomuto procesu velmi náchylné membránové lipidy s vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin. Peroxidaci lipidů podléhají mastné kyseliny s více dvojnými vazbami – polyenové mastné kyseliny. Hlavními mastnými kyselinami, které podléhají peroxidaci v buněčných membránách jsou kyselina linoleová a arachidonová. Během ataku reaktivními formami kyslíku a volnými radikály dochází ke zkracování a zmenšování struktury kyselin.

I u peroxidace lipidů můžeme jednotlivé reakce rozdělit na 3 fáze: Iniciace vede k tvorbě koncového uhlíku s nepárovým elektronem. Každá látka, která je schopna vytrhnout H atom z methylenové skupiny uhlovodíkového řetězce mastné kyseliny, může zahájit peroxidaci lipidů vedoucí k tvorbě lipidového radikálu (L•). Přítomné dvojně vazby v mastných kyselinách se mění na jednoduché a tím usnadňují uvolnění H•. Lipidový radikál reaguje s molekulovým kyslíkem za vzniku lipidového

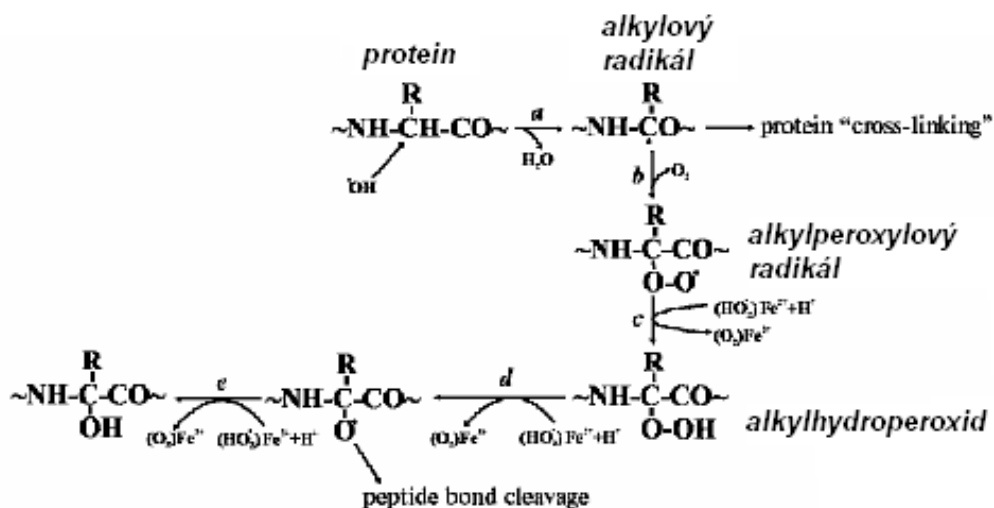
peroxylového radikálu ($\text{LOO}\cdot$). Peroxylový radikál může odštěpit vodík ze sousední mastné kyseliny a vytvoří lipidový hydroperoxid (LOOH) a další lipidový radikál. Lipidový hydroperoxid může být redukován v přítomnosti Fe^{2+} na lipidový alkoxylový radikál ($\text{LO}\cdot$). Alkoxylový stejně jako peroxylový podněcuje řetězovou reakci lipidové peroxidace. Reakce probíhá tak dlouho, dokud se radikál polyenové mastné kyseliny neseťká s jiným radikálem, poté se řetězová reakce ukončí vznikem stabilní sloučeniny.

V organismu probíhají 2 typy lipidové peroxidace. Neenzymová, která je vyvolána nespecifickým, mnohdy patologickým faktorem. Modifikované mastné kyseliny se snadno štěpí a dávají vzniknout řadě produktů, jako jsou uhlovodíky (etan, pentan), které vydechujeme a toxické aldehydy malondialdehyd (MDA), 4-hydroxynonenal (HNE). MDA a HNE se váží na proteiny a díky přítomnosti aldehydových funkčních skupin dochází k tvorbě zkřížených vazeb, což má za následek modifikaci bílkovin. Enzymová peroxidace vede k tvorbě biologicky aktivních látek, jako jsou prostaglandiny a leukotrieny (Štípek a kol. 2000, Catalá 2009).

Některé sloučeniny (např. CEL a CML) jsou jak produkty neenzymové glykace tak lipidové peroxidace (Huijberts a kol. 2008).

2.2.3 Chemická modifikace peptidové vazby

K modifikaci proteinů může dojít také při štěpení peptidové vazby v proteinu, což může mít za následek změnu dotyčného proteinu. Příkladem může být oxidace. Na obr. 4 je znázorněno vytržení H pomocí hydroxylového radikálu z α -uhlíku aminokyselinového zbytku a tím začne reakce, která má za následek tvorbu alkylového radikálu a vody (*a*). Následuje adice molekulového kyslíku na alkylový radikál, což dá vzniknout alkylperoxylovému radikálu (*b*), reakce s protonovaným superoxylovým radikálem ($\text{HO}_2\cdot$) nebo Fe^{2+} v kyselém prostředí (*c*). Vytvořený alkylhydroperoxid může opět vstoupit do reakce s alkoxylovým radikálem. V tomto stupni může být peptidová vazba štěpena nebo může být výše uvedený radikál dále oxidován protonovaným superoxydem nebo Fe^{2+} v kyselém prostředí reaguje s hydroxylovým derivátem proteinu (*d*). To znamená, že alkyl, peroxylový a alkoxylový derivát proteinu mohou také odstranit atom vodíku z aminokyselinových zbytků a tím dát vznik novým radikálovým sloučeninám, které jsou schopny vstoupit do podobných přeměn.



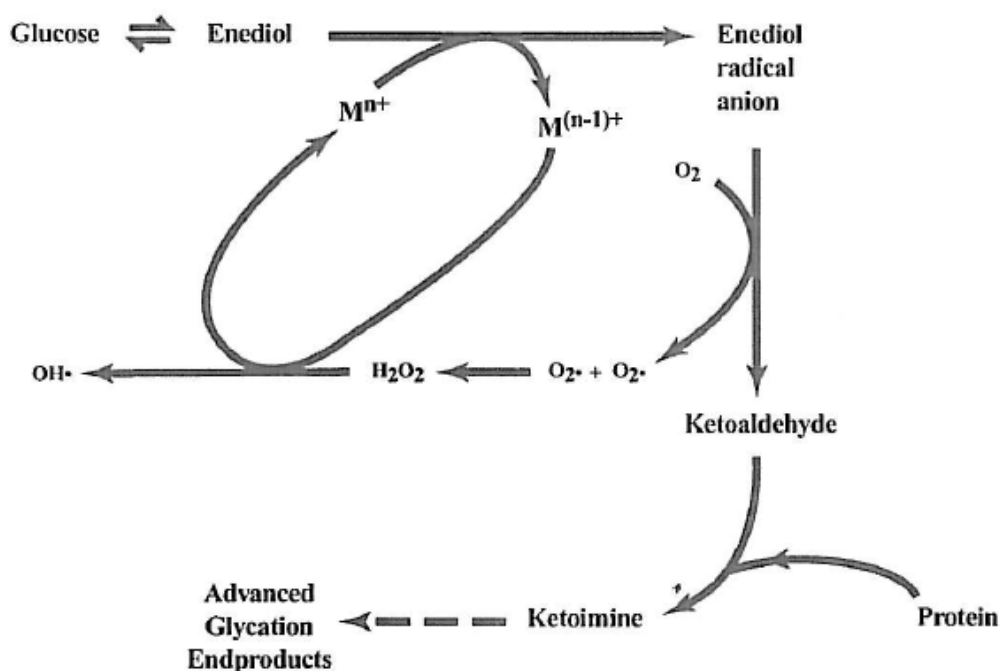
Obrázek 2: Oxidace peptidové vazby (Lushchak 2007)

Dva alkylové deriváty bílkovin se mohou spojit a vytvořit intra- nebo extracelulární vazbu a to za snížené koncentrace nebo bez přístupu kyslíku. Doposud byly navrženy 4 mechanismy, jak volné radikály mohou způsobit rozštěpení peptidové vazby: A) rozštěpení alkoxylového derivátu peptidu alfa-amidovou cestou, B) rozštěpení alkoxylového derivátu peptidu diamidovou cestou, C) oxidace postranních řetězců glutamátových a aspartátových zbytků, D) oxidace postranních řetězců prolinu.

Ve skutečnosti jsou všechny aminokyselinové zbytky citlivé k oxidaci hydroxylovým radikálem. Zvláště citlivé jsou aromatické aminokyseliny. Oxidace aminokyselinových zbytků vede k tvorbě karbonylových derivátů. U Phe, Tyr, Trp a His dojde k přímé přeměně aminokyselinového zbytku na aldehyd nebo keton (Lushchak 2007).

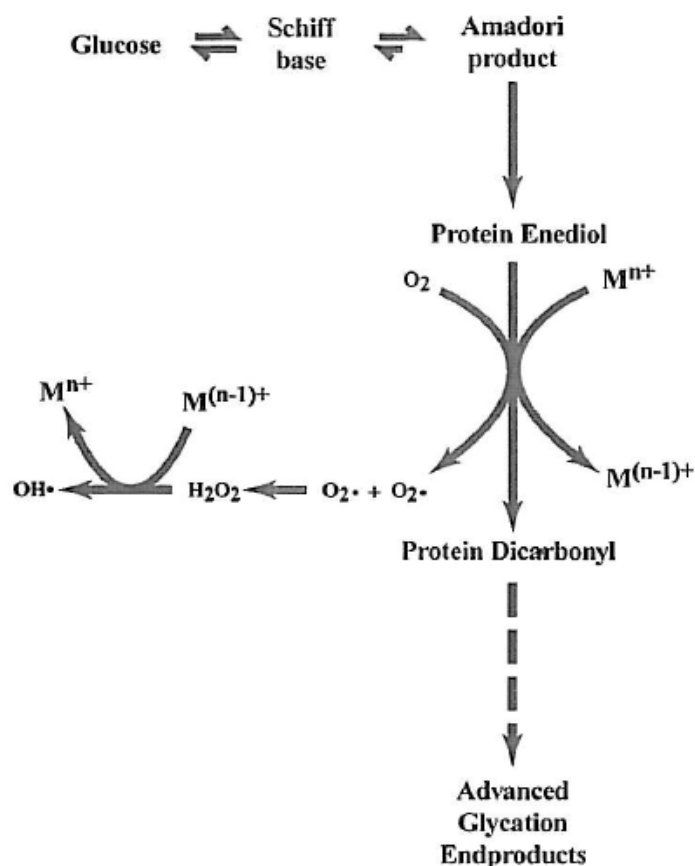
2.2.4 Autooxidace glukózy a glyoxidace

Monosacharidy jako glukóza jsou v rovnováze s jejich endioly, které mohou podstoupit samovolnou oxidaci (autooxidaci) v přítomnosti přechodných kovů a výsledkem je endiolový radikál. Tento radikál redukuje molekulový kyslík za vzniku superoxidového radikálu a sám sebe oxiduje na dikarbonylový ketoaldehyd, který může reagovat s proteinovou aminoskupinou na ketoamin. Ketoaminy se chovají podobně jako Amadoriho produkty, ale jsou reaktivnější a účastní se na vzniku AGE. Oxidační reakce jsou také spojeny s tvorbou AGE, která je urychlená v přítomnosti kyslíku a redukcí anaerobních podmínek.



Obrázek 3: Autooxidace glukózy. Dochází k přeměně endiolového radikálu na dikarbonylový ketoaldehyd, který může vstoupit do reakce s aminoskupinou proteinu a dojde tak až ke vzniku AGE. Reakce jsou katalyzovány přechodnými kovy (M) a superoxidový radikál je pomocí Fentonovy reakce přeměněn na hydroxylový radikál (Ahmed 2005).

Termín glykoxidace je užíván k popisu samovolné oxidace Amadoriho produktu na AGE v přítomnosti přechodných kovů a molekulového kyslíku. Amadoriho produkty se přeměňují na dikarbonylové sloučeniny přes endiol proteinu vytvořený superoxidovým radikálem. Dikarbonylové sloučeniny proteinu se mohou účastnit tvorby AGE a nazývají se glykoxidační produkty. Jakmile se vytvoří superoxidový radikál, může být v přítomnosti přechodných kovů převeden na vysoce reaktivní hydroxylový radikál ve Fentonově reakci (Ahmed 2005).



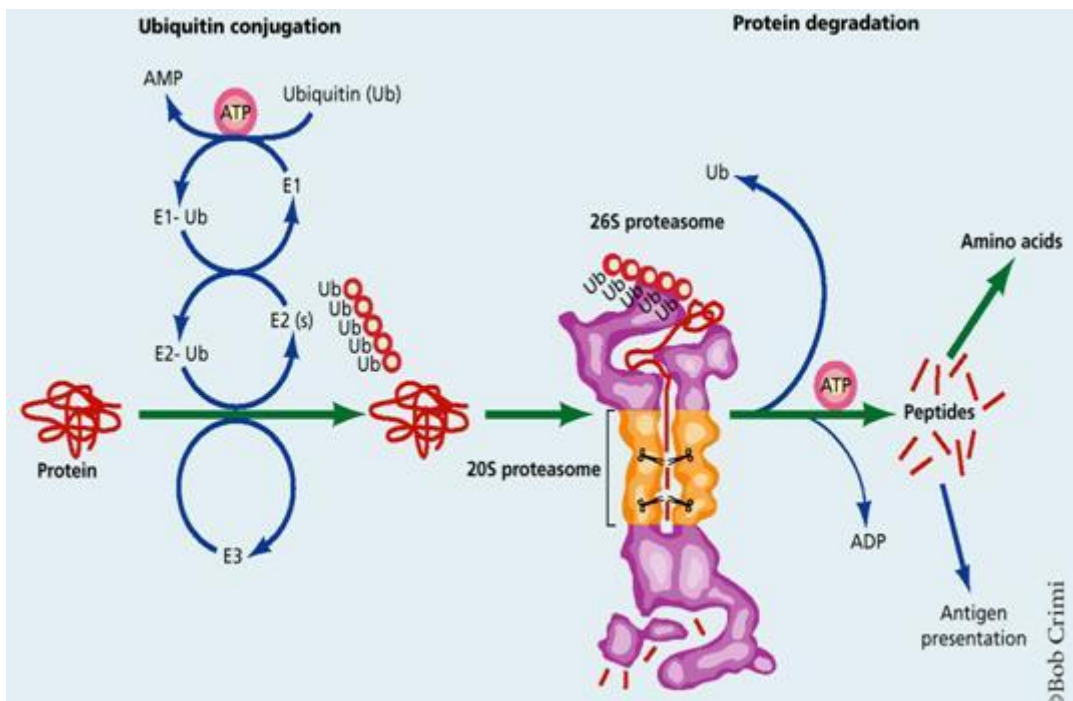
Obrázek 4: Glykoxidace. Dochází k přeměně ketoaminu na protein s obsahem dikarbonylu. Tato sloučenina se může dále přeměňovat na AGE. Tyto přeměny jsou katalyzovány přechodnými kovy (M) a ze vzniklého superoxidového radikálu může vzniknout hydroxylový radikál pomocí Fentonovy reakce (Ahmed 2005).

2.2.5 Degradace oxidovaných proteinů

Lyzosomy a proteasomy jsou dva různé intracelulární proteolytické systémy pro endogenní degradaci proteinů. Lyzosomy obsahují velké množství různých hydrolytických enzymů, které hrají důležitou roli v řadě metabolických procesů včetně normálního proteinového metabolismu. V tomto případě se jedná o neselektivní degradaci hlavně extracelulárních bílkovin.

Proteasomy jsou odpovědné za programovaný zánik intracelulárních proteinů. Uplatňují se také při degradaci oxidovaných proteinů. Důležitou úlohu v tomto mechanismu degradace má polypeptid ubikvitin. Ubikvitin se kovalentně váže na ϵ -aminoskupinu protein, který má být degradovaný. Na karboxyl ubikvitinu se nejdříve naváže svou SH- skupinou enzym značený E_1 za současného štěpení ATP. Poté se E_1 na

ubikvitinu vymění za malou bílkovinu značenou E₂ a ta se vymění za E₃. Komplex ubikvitin-E₃ se připojí na protein za katalýzy ubikvitin ligázy. Obvykle se spojí na E₃ až pět molekul ubikvitinu s jednou molekulou proteinu. Proteasomy jsou označovány jako 26S. Jde o obrovský enzymový komplex s velkým počtem podjednotek, který se nachází jak v cytoplazmatickém tak nukleárním prostoru. V proteinový komplex známý jako „19S cap = čepička“ má ústřední funkci s ATP-dependentní hydrolytickou aktivitou a jedná se o podjednotku vázající ubikvitin. Na rozdíl od ATP-independentní proteázy, která tvoří centrální jádro „20S core“ a jedná se o multikatalytickou proteázu, která má 3 dobře charakterizované peptidázové aktivity: chymotrypsickou, tryptickou a postglutamylpeptid-hydrolytickou. Proteiny obsahující na svém N-terminálním konci Met, Ser, Thr, Ala, Val, Cys, Pro nebo Gly jsou vůči této proteolýze odolné. Ty proteiny, které mají na N-konci ostatní aminokyseliny jako Arg, Asp, Leu a Phe, jsou destabilizovány. Postupně dochází k degradaci proteinu až na jednotlivé aminokyseliny. Oxidace proteinů často vedou k odhalení hydrofobních a aromatických aminokyselin a proteasom může tato místa přednostně rozeznat. Silně modifikované proteiny však ani proteasomy nemohou rozložit a dochází k jejich hromadění (Ledvina a kol. 2005, Chakravarti a Chakravarti 2007).



Obrázek 5: Proteasom. Proteiny značené ubikvitinem jsou degradovány proteasomem na jednotlivé aminokyseliny za spotřeby ATP. (http://www.charite.de/herz/forschung/bps_clip_image002.jpg)

2.3 Karbonylový stres

Karbonylový stres je nerovnováha v tvorbě a odstraňování reaktivních karbonylových sloučenin (RCS). Jejich tvorba souvisí s množstvím patologických cest jako je glykace, autooxidace cukrů nebo peroxidace lipidů (Dalle-Donne a kol. 2003B, Singh a kol. 2001).

Karbonylový stres vzniká na základě oxidačního stresu a tvorby ROS, kdy dochází k oxidační modifikaci řady proteinů a lipidů, která může být způsobena přímým působením ROS (primární reakce) nebo nepřímo reakcí vedlejšího produktu oxidačního stresu (sekundární reakce), který nejčastěji působí na sacharidy a lipidy, které posléze mohou působit na proteiny za vzniku karbonylových skupin R1-CO-R2 (Chakravarti a Chakravarti 2007). U vzniklých RCS nelze určit, kterou z těchto cest vznikly (Dalle-Donne a kol. 2003B). Karbonylový stres je ukazatelem delšího oxidačního stresu (Štípek a kol. 2000). Zvýšené hladiny RCS jsou nalézány u obou typů diabetu, v aterosklerotických plátech, zesílené stěně intimy srdeční aorty, v mesangiální matrix a dalších (Dalle-Donne a kol. 2003B).

Důležitým krokem glykačních reakcí je tvorba reaktivních meziproduktů během všech stupňů a cest glykace. Tyto sloučeniny jsou známy jako dikarbonylové sloučeniny (alfa-oxoaldehyd) a zahrnují takové produkty jako 3-deoxyglukozon (3-DG), glyoxal (GO) a metylglyoxal (MGO). Tvorba těchto reaktivních karbonylových forem je závislá na dostupnosti stopového množství iontů kovů. 3-DG je tvořen neoxidačním přeskupením a hydrolyzou Amadoriho produktu a fruktózy-3-fosfátu a je meziprodukt polyolové cesty. 3-DG rychle reaguje s aminoskupinou proteinu a tvoří AGE jako imidazolony, pyralin a karboxymetyllyzin (CML). MGO může být vyprodukovaný neenzymovou cestou, volným rozkladem trióza-fosfátů, autooxidací sacharidů a degradací glukózy. Také několik menších metabolických cest, včetně Maillardovy reakce a lipidové peroxidace vede k tvorbě MGO. Tato dikarbonylová sloučenina reaguje s argininovým zbytkem a tvoří imidazolové sloučeniny. MGO může reagovat s lyzinovými zbytky proteinu za tvorby karboxyetyllyzinu (CEL) a může zapříčinit zesílení řetězců proteinů za vzniku methylglyoxal-lyzinového dimeru (MOLD). GO je tvořen několika reakcemi, jako je oxidační rozklad Schiffovy baze (Namikiho cesta), autooxidací a degradací glukózy, lipidovou peroxidací a degradací fruktóza-6-fosfátu. Nová cesta vzniku GO je popisována přes peroxyinitrit, který vzniká

při oxidaci glukózy. Tvorba GO *in vivo* za fyziologických podmínek může vést k různým druhům AGE jako je CML, pentozidin, GOLD.

Mezi AGE patří i následující sloučeniny:

CML - N-karboxymethyllyzin je tvořen reakcí GO s ϵ -aminoskupinou lysinu. Tuto sloučeninu nacházíme v kolagenu kůži, v krystalínech oční čočky, séru a stárnoucích erytrocytech. CML se také vyskytuje v místech lipidové peroxidace.

CEL - N-karboxyetyllysin vytvořen reakcí MGO s lyzinem a je také nalézán v krystalínech čočky.

GOLD - glyoxal lysin dimerr vzniklý reakcí GO a dvou molekul lyzinu. MOLD - metylglyoxal-lysin dimer je tvořen reakcí metylglyoxalu se dvěma molekulami lyzinu. Zvýšené hladiny těchto dvou sloučenin se nachází u pacientů s urémií.

MRX [8-hydroxy-5-metyldihydrothiazolo(3,2- α)pyridinium-3-karboxylát] jehož tvorba vychází z reakcí cysteinu a argininu s glukózou byl izolován hydrolýzou z glykovaného sérového albuminu. MRX může sloužit jako potenciální ukazatel hyperglykémie.

Pyrralín vzniká v důsledku reakce 3-DG a lyzinu. Zvýšené sérové koncentrace mají diabetici oproti zdravým jedincům.

Argpyrimidin - je derivát rakce metylglyoxalu s argininovým zbytkem proteinu. Zvýšená koncentrace je nalézána u pacientů s familiární senilní amyloidní polyneuropatií.

Imidazolon jako je MG-imidazolon je následek reakce MGO s argininovým zbytkem proteinu. 3-DG-imidazolon vzniká reakcí 3-DG s argininovým zbytkem proteinu. Je ve zvýšené míře nalézán ve tkáni ledvin diabetických pacientů.

Vesperlyziny A, B a C vznikají zesítním dvou molekul lyzinu s C-2 sloučeninami. Prekurzory těchto sloučenin jsou askorbát, D-pentózy a D-treózy .

GA-pyridin se tvoří reakcí glykolaldehydu s lyzinem.

Crossline vznikl díky reakci N-acetyllyzinu a glukózy. Je nalézán v séru a ve tkáni ledvin diabetických pacientů.

Pentozidin je následek zkřížených vazeb pentózy s lyzinovými a argininovými zbytky proteinů. Pentozidin byl detekován v kolagenu diabetických pacientů po kyselé hydrolýze.

GLAP vzniká reakcí glyceraldehydu s N- α -acetyllyzinem (Nguyen 2006, Ulrich a Cerami 2001, Thornalley a kol. 1999).

AGE lze rozdělit podle jejich hlavních rysů na:

1. fluoreskující s crosslinkem - pentoimidin, crossline, vesperlyzin
2. bez fluorescence s crosslinkem - GOLD, MOLD, DOLD
3. bez crosslinků - pyralin, CML, CEL, imidazolony (Ahmed 2005; Ulrich a Cerami 2001)

Vznik karbonylovaných proteinů (aldehydů a ketonů) lze obecně shrnout do následujících reakcí:

- a) přímou oxidací postranních řetězců aminokyselin (Pro, Arg, Lys, Thr), což má za následek tvorbu pyrolidinu z prolinu, semialdehydglutaminu z lysinu, 2-amino-3-ketomáselné kyseliny z threoninu
- b) oxidačním štěpením proteinů amidovou cestou nebo oxidací postranních řetězců glutaminu, vedoucích k tvorbě peptidů, ve kterých je N-terminální aminokyselina zablokována derivátem ketoacylu
- c) při Michaelově adici nenasycených aldehydů jako je 4-hydroxy-2-nonenal, malondialdehyd nebo akrolein odvozených z lipidové peroxidace buď s aminoskupinou lysinu, histidinu nebo s produkty pokročilé lipoxidace
- d) zaváděním reaktivních karbonylových derivátů (ketoaminy, ketoaldehydy) vzniklých glykací a glykoxidací do proteinu (Dalle-Donne a kol. 2003B; Piroddi a kol. 2007).

Znalost struktur modifikovaných proteinů vede k rozvoji různých biochemických a imunochemických metod a k jejich detekci. Velkou nevýhodou je, že tyto produkty jsou nespecifické. Specifičtější stanovením by bylo měření proteinů po další modifikaci, jako je přeměna tyrozinových zbytků na 3-chlortyrosin, 3-nitrotyrosin nebo dityrosin. Nicméně tkáňové hodnoty takových ukazatelů jsou řádově mnohem nižší než celkový obsah karbonylů a z toho důvodu takové měření vyžaduje vysoce citlivou metodu, která bývá finančně nákladnější (Dalle-Donne a kol. 2003B).

Produkty karbonylového stresu slouží spíše jako ukazatel chronického poškození závislého na nutričním stavu.

Za normálních podmínek je jen nízká tvorba α -oxoaldehydů a fruktosaminu, které přecházejí v AGE, protože zde jsou významnější metabolické alternativy osudu těchto prekurzorů AGE. Mezi tyto cesty patří přeměna α -oxoaldehydů za katalýzy

enzymu na odpovídající aldonové kyseliny. 3-DG je metabolizován na 3-deoxyfruktózu, katalyzováno NADPH závislou na 3-DG reduktáze. Fruktosamin může být degradovaný na Shiffovu bazi Amadoriho přestavbou pomocí fruktosamin-3-fosfát ATP závislou 3-fosfokinázou (Rahbar a Figarola 2002).

Jako možná prevence proti tvorbě glykačních produktů můžeme považovat možnost zpomalení tvorby prekurzorů AGE a zkřížených vazeb. Dále jsou používány mechanismy „tlumičů“, které vychytávají dikarbonylové sloučeniny. Možný je také přístup založený na štěpení vazeb ve vytvořených AGE pomocí „vypínačů“. Jako vypínač může fungovat například thiazol bromid, který je schopen rozštěpit kovalentní zkřížené vazby v AGE (Capote a Sanchez 2008)

2.4 Diabetes mellitus

Většina z nás se s diabetiky dennodenně setkává. Podle určitých studií trpí právě tímto onemocněním 1-2% světové populace. Z celkového počtu nemocných je asi 90% diabetiků 2. typu a 10% diabetiků 1. typu.

Diabetes mellitus můžeme zařadit mezi chronická endokrinní onemocnění, které je charakterizované přítomností hyperglykémie, v důsledku absolutního nebo relativního nedostatku inzulínu a inzulínorezistence (Ahmed 2004). Diabetes zasahuje do metabolismu cukrů, tuků i proteinů. Protože tento metabolismus probíhá ve všech živých buňkách organismu, jsou jeho poruchou ovlivněny prakticky všechny orgány (Berková a Brka 2003). Diabetes je jedním z hlavních rizikových faktorů vzniku kardiovaskulárních onemocnění (Gleissner a kol. 2007). Diabetes mellitus 1. a 2. typu jsou onemocnění se zásadně rozdílnou etiologií a patogenezí. U diabetu 1. typu se jedná o absolutní nedostatek inzulínu, zatím co u 2. typu je relativní nedostatek inzulínu. Důsledky zvýšené glykémie často vedou k podobným komplikacím. V případě, že inzulín chybí nebo je jeho účinek snížen, glukóza zůstává v extracelulární tekutině a tedy i v krvi. Její zvýšená hladina vede ke zvýšení osmolarity krve, zvýšení nabídky osmoticky aktivních látek ledvinám, navození osmotické diurézy, polyurii, dehydrataci a polydipsii. Dlouhodobá expozice tělesných proteinů hyperglykémii vede k jejich zvýšené glykaci (Anděl a kol. 2007). Endoteliální buňky cév, mezangiální buňky ledvin, Schwannovy buňky a neurony nemohou účinně regulovat jejich intracelulární koncentraci glukózy, což odůvodňuje jejich zvýšenou citlivost k poškození navozeným hyperglykemií (Huijberts a kol. 2008).

Chronické komplikace diabetu dělíme na specifické (diabetická mikroangiopatie, projevující se jako diabetická neuropatie, retinopatie a neuropatie) a nespecifické, kam patří zejména ateroskleróza a větší sklon k různým infekčním onemocněním (Anděl a kol. 2007).

2.4.1 Mechanismy vzniku komplikací diabetu

Polyolová cesta

Polyolová cesta se skládá z poměrného omezení aktivity enzymů aldózareduktázy (AR) a sorbitoldehydrogenázy (SDH). Za normoglykemických podmínek AR redukuje toxické aldehydy na neaktivní alkoholy (polyoly) a tím chrání buňky. AR má malou afinitu ke glukóze a normálně nemetabolizuje velké množství

glukózy. Nicméně za hyperglykemických podmínek a za katalýzy AR se glukóza přeměňuje na sorbitol, který je postupně metabolizován SDH na fruktózu. To může vést ke zvýšení osmotického tlaku díky intracelulárnímu hromadění sorbitolu a zvýšenému oxidačnímu stresu v důsledku spotřeby NADPH, který je ke zpětné redukci oxidovaného glutathionu. Zvýšení koncentrace fruktózy podporuje nárůst AGE produktů (Gleissner a kol. 2007). Nerovnováha mezi NADP a NADPH⁺ může také negativně ovlivnit funkci Na⁺/K⁺ ATPázy, což má za následek hromadění Na⁺ v buňce (Berková a Berka 2003). Tato cesta také tvoří reaktivní meziproducty jako je fruktóza, fruktóza-6-fosfát, glyceraldehyd-3-fosfát, 3-deoxyglukoson a tím může podstatně přispět k intracelulární tvorbě AGE produktů (Huijberts a kol. 2008, Moravcová a kol. 2006).

Neenzymová glykace proteinů s možností alterací jejich funkcí, tvorba AGE

Intracelulární hyperglykémie vede k tvorbě reaktivních dikarbonylů, jako je glyoxal, metylglyoxal a 3-deoxyglukoson, které reagují s aminoskupinami proteinů a AGE. Modifikace extracelulárních a intracelulárních proteinů pomocí AGE může měnit jejich funkci buď tím, že dojde k zesílení molekul v extracelulární matrix nebo vazbou na AGE receptory (RAGE), které se exprimují na buňkách, které mají proaterogenní efekt (například endoteliální buňky, makrofágy a buňky hladké cévní svaloviny). AGE se také váží na další receptory jako je galektin-3, makrofágový scavengerový receptor. Po vazbě na tyto receptory nebyl rozeznán žádný intracelulární signál. Vazba na RAGE vede k translokaci NF-κB do jádra a zvýšené transkripci adhezních molekul jako je ICAM-1, E-selektin, VCAM-1 a prozánětlivých tkáňových faktorům IL-1, IL-6 nebo TNFα. AGE také mohou navodit endoteliální hyperpermeabilitu, což se ukázalo, že je chemotaktické pro monocyty *in vitro* a *in vivo*. AGE produkty také podporují rozvoj aterosklerózy (Gleissner a kol. 2007).

Mezi glykované proteiny u diabetiků patří hlavně albumin a apolipoprotein B. Změny těchto bílkovin mají hlavně vztah k počátku aterogeneze. Hemoglobin v erythrocytech rovněž podléhá neenzymové glykaci. Vznikají přitom 3 deriváty HbA_{1a}, HbA_{1b} a HbA_{1c}. Stanovení hodnot glykovaného hemoglobinu má význam pro sledování glykémie za posledních 6-8 týdnů (Racek a kol. 2006).

Proteinkináza C

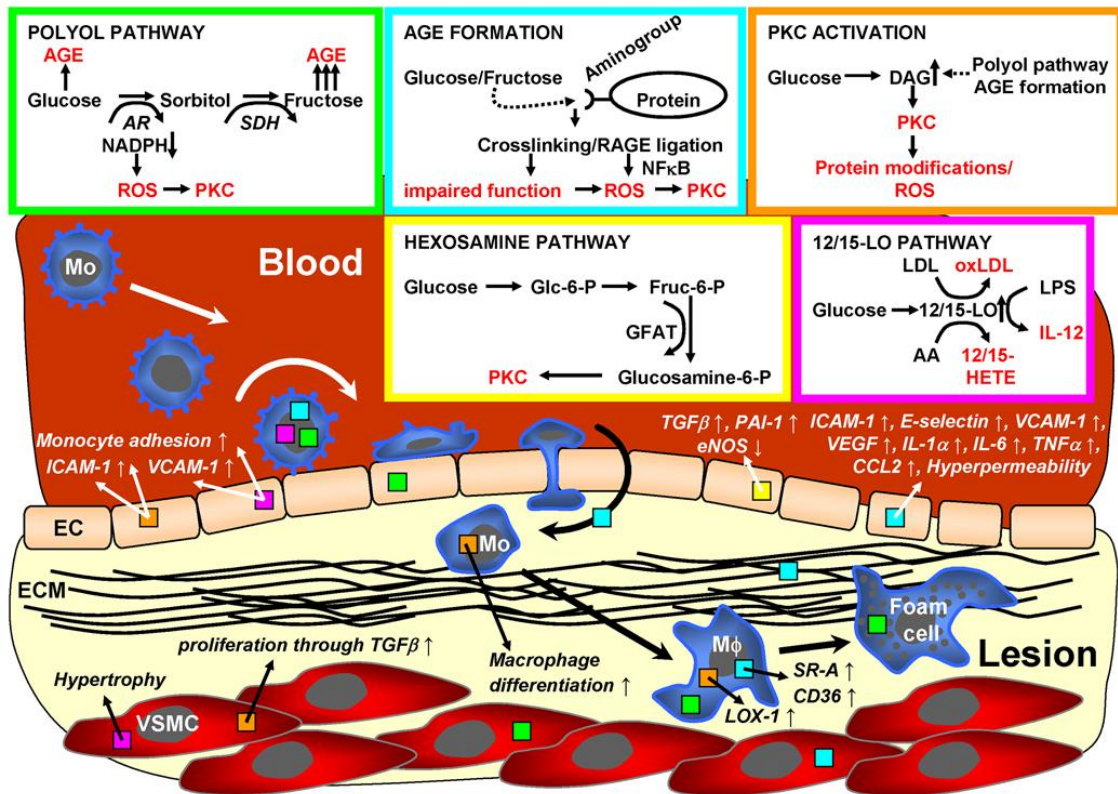
Proteinkináza C (PKC) fosforyluje proteiny na Ser a Thr zbytcích. Je známo 11 isoformem, 8 jich je aktivovaných diacylglycerolem (DAG). Intracelulární hyperglykémie vede k aktivaci PKC přes zvýšené hodnoty diacylglycerolu, který vzniká hlavně z DAG de novo syntézy. Nepřímá aktivace PKC může nastat po vazbě AGE na RAGE, aktivované polyolové cestě nebo aktivaci 12/15 lipoxygenáz. Proteinkináza C má řadu účinků přes podporu aterogeneze až po tvorbu volných radikálů (Gleissner a kol. 2007). Zvýšená aktivita proteinkinázy C vede ke zvýšené tvorbě prozánětlivých látek (Moravcová a kol. 2006).

Hexosaminová cesta

Hexoasaminová cesta přeměny fruktózy-6-fosfátu na glukosamin-6-fosfát přes glutamin-fruktosa-6-fosfátamidotransferázou (GFAT). To vše za předpokladu přítomnosti substrátu proteoglykanů a glykoproteinů. Zvýšená hladina glukosaminu-6-fosfát snižuje hladinu NO a zvyšuje tvorbu PAI-1 a TGF- β (Gleissner a kol. 2007).

12/15 -lipoxygenázová cesta

12- a 15- lipoxygenázy (12/15 LO) jsou enzymy, které předávají kyslík na 12. nebo 15. uhlík kyseliny arachidonové, což vede k tvorbě 12- a 15-hydroxyeikosatetraeionové kyseliny. 12/15 LO tvoří endoteliální buňky, buňky hladké svaloviny, monocyty a makrofágy. Zvýšená aktivita se ukázala při hyperglykémii. Účinky 12/15 LO jsou považovány za proatherogenetické, propagují oxidaci LDL. U diabetiků s aktivní 12/15 LO nacházíme vyšší hladiny metabolitu 12-LO v moči než u zdravých jedinců. Nicméně některé metabolity 12/15-LO mají protizánětlivý efekt (Gleissner a kol. 2007).



Obrázek 6: Mechanismy ovlivňující cévní stěnu a složky krve u diabetických pacientů. Jednotlivé cesty vedoucí k chronickým komplikacím diabetu jsou v barevném rámečku a barevných čtverečkách v místě působení. Např. polyolová cesta vede k přestupu monocytů (Mo) do cévní stěny, k aktivaci makrofágů (MΦ) a tvorbě pěnových buněk, působí také na buňky endotelu a hladké svaloviny cévy (Gleissner a kol. 2007).

Diabetes mellitus 1. typu

Jedná se o autoimunitní onemocnění, kde dochází k destrukci β -buněk Langerhansových ostrůvků ve slinivce břišní. Tyto buňky jsou ničeny 2 mechanismy:

- přímou interakcí antigen-specifických cytotoxických T-buněk s β -buňkami
- nespecifickými zánětlivými mediátory, tj. reaktivními formami kyslíku tvořenými makrofágy a oxidem dusnatým

U tohoto typu došlo k převaze Th_1 podskupiny T-buněk zodpovědných za imunitní odpověď nad imunosupresivní Th_2 podskupinou. Th_1 buňky a jejich cytokiny jsou mediátory buněčné imunity, cytokiny IL-2 a $INF\gamma$ aktivují makrofágy a cytotoxické T buňky (Štípek a kol. 2000).

Diabetes mellitus 2. typu

Onemocnění, kterým v České republice trpí více než 680 tisíc lidí (Prázný 2008), je na inzulínu nezávislý diabetes (NIDDM). Vytváří se rezistence na inzulín a relativní nedostatek glukózy v buňkách. Tito pacienti jsou často obézní. Bylo zjištěno, že dochází k vzestupu tvorby peroxidu vodíku právě v lidských tukových buňkách vystavených v suspenzi inzulínu. Nadbytek inzulínu může vést k oxidačnímu stresu (Štípek a kol. 2000).

2.4.2 Chronické komplikace diabetu

Diabetická retinopatie

Při této komplikaci se uplatňuje sorbitolová cesta odbourávání hexóz při hyperglykémii, jejímž výsledkem je tvorba a hromadění sorbitolu a fruktózy. Při této cestě se uplatňuje enzym aldózareduktáza, která je hlavně přítomna v pericytech sítnicových kapilár a v buňkách retinálního pigmentového epitelu. Hromadění sorbitolu v důsledku poruchy aldózareduktázy dochází k hromadění sorbitolu v pericytech, protože buněčná membrána je pro něj téměř nepropustná. Sorbitol má také za následek zvyšování nitroočního tlaku. Hromadění AGE v kapilárách sítnice vede ke změně rigidity a poškození pojivové tkáně. Pericyty jsou zvláště citlivé k nedostatku glukózy. Hyperglykémie vede ke změně imunoreaktivity glukózového transportéru 1, jehož funkce se tím poruší a pericyt zaniká apoptózou. Také leukocyty jsou zodpovědné za patogenezi retinopatie. Velikost leukocytů je téměř stejná jako průsvit kapilár. U zdravého jedince leukocyty normálně projdou, u diabetiků však dochází ke zvýšené adhezenci k endotelu a uvolňování proteolytických enzymů. Narůstající průtoková rezistence vede k tvorbě ROS (Sosna 2008, Ahmed 2005).

Diabetická nefropatie

Je charakteristická hromaděním depozit matrix v mezangiu glomerulů, což nakonec vede ke glomeruloskleróze. V cévní stěně a v Bowmanově pouzdru postižených jedinců se imunohistochemicky prokazuje výrazná depozice AGE, významně vyšší než u nediabetiků. Hladiny AGE v séru korelují s renální funkcí. U diabetiků se nachází zvýšené koncentrace pentozidinu v kůži již ve fázi mikroalbuminurie, což naznačuje zvýšené hladiny AGE (Štípek a kol. 2000).

Diabetická neuropatie

Zatím není znám přesný vznik, ale předpokládá se uplatnění polyolové cesty, mikroangiopatie a zvýšené tvorby volných radikálů. Dochází k intracelulární akumulaci sorbitolu, depleci myoinozitolu a snížení aktivity Na^+/K^+ ATPázy. Bylo zaznamenáno také mnoho abnormalit v lipidovém metabolismu. Při hyperglykémii dochází ke glykaci proteinů myelinu a interakci mezi myelinem a makrofágy. To vede k nodální demyelinizaci, zduření tkáně a deformaci s dysfunkcí a poruchou axonálního transportu proteinů v neuronech (Berková a Berka 2003).

3 Cíle práce

- 1) Optimalizace spektrofotometrické metody stanovení karbonylových skupin popsané Levinem a kol. (1990).
 - A. Sledování rozpustnosti proteinové pelety za použití fosfátového pufru nebo guanidin hydrochloridu
 - B. Nalezení vhodné koncentrace DNPH
 - C. Nalezení vhodné délky inkubace BSA s DNPH
 - D. Nalezení vhodného množství proteinu ve vzorku
 - E. Sledování účinku různých glykačních činidel na tvorbu karbonylových skupin v čase
- 2) Detekce glykačních produktů ve vzorcích obsahujících AST pomocí SDS-PAGE elektroforézy s následným barvením stříbrem.
- 3) Stanovení vzniklých karbonylových skupin po glykaci AST pomocí imunoblotingu s chemiluminiscenční detekcí.

4 Materiál a metodika

4.1 Použitý materiál

Hovězí sérový albumin (BSA), frakce V, 96%	Sigma-Aldrich
Kyselina chlorovodíková	Penta
2,4-dinitrofenylhydrazin	Lachema
Kyselina trichloroctová	Fluka
Etanol , p.a.	Penta
Octan etylnatý, p.a.	Penta
Fruktóza	Sigma-Aldrich
Glukóza	Sigma-Aldrich
Metylglyoxal	Sigma-Aldrich
Síran měďnatý, p.a.	Lachema
Dihydrogenuhličitan sodný dihydrát, p.a.	Penta
Hydrogenuhličitan disodný dodekahydrát, p.a.	Penta
Azid sodný, p.a.	Lachema
Aspartátaminotransferáza (AST)	Roche Diagnostics
Akrylamid	Sigma-Aldrich
N,N'-metylenbisakrylamid	Sigma-Aldrich
Tris-(hydroxymetyl)aminometan	Lachema
Laurylsíran sodný (SDS)	BDH Chemics
Glycin	Sigma-Aldrich
Ultračistá voda	Katedra biochemických věd
Polyetylenglykol 2000	Sigma-Aldrich
Izopropylalkohol, p.a.	Penta
Dusičnan stříbrný, p.a.	Penta
Hydroxid amonný, p.a.	Lachema
Hydroxid sodný, p.a.	Lachner
Kyselina citronová, p.a.	Penta
Formaldehyd	Penta
Myší monoklonální anti-DNP protilátka	Alpha Diagnostics
Králičí polyklonální protilátka proti myší IgG (AP)	Abcam

4.2 Použitá zařízení

Digitální analytické váhy CP 225 D, Sartorius

Inkubátor Memmert

Spektrofotometr Helios-β, Spectronic Unicam

Elektroforetická aparatura Mini-Protein III, BioRad

Chlazená centrifuga Biofuge Stratos, Heraeus

pH metr inoLab pH Level 2

Programovatelný termomixer Thermomixer Comfort, Eppendorf

Laboratorní třepačka s kývavým pohybem Duomax 1030, Heidolf Instrument

Ultrazvukový čistič VWR

Centrifuga Eppendorf 5415 D

4.3 Metodika

4.3.1 Příprava základních roztoků

4.3.1.1 Příprava fosfátového pufru

Pro měření jsem si připravila 0,1 M fosfátový pufr, pH 7,4 s přídavkem 0,05% azidu sodného (antimikrobiální látka). Tento pufr jsem připravila smísením 190 ml 0,2 M vodného roztoku $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 810 ml vodného roztoku $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a 1000 ml ultra čisté vody. Pak jsem přidala 1 g azidu sodného, čímž vznikl jeho 0,05% roztok. Vzniklý pufr jsem dokonale promíchala a poté jsem provedla kontrolu pH na pH metru. V případě, že se pH lišilo od požadované hodnoty, tak jsem ho upravila přidáním vodného roztoku $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ či $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.

4.3.1.2 Příprava roztoku BSA

Hovězí sérový hovězí albumin jsem si připravila v koncentraci 10 mg/ml rozpuštěním přesné navážky příslušného množství BSA v 0,1 M fosfátovém pufru s 0,05% azidem sodným o pH 7,4.

4.3.1.3 Příprava roztoku AST

Aspartátaminotransferázu (10 mg) jsem centrifugovala 20 min při 8°C při 5000 otáčkách za minutu. Supernatant AST jsem odpipetovala a peletu, ve které se nacházel enzym, jsem rozpustila v 10 ml 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,4. Tím jsem získala zásobní roztok AST o koncentraci 1 mg/ml. Z tohoto zásobního roztoku jsem si dále připravovala směsi AST s jednotlivými glykačními činidly.

4.3.1.4 Příprava zásobních roztoků glukózy, fruktózy, metylglyoxalu a mědi

Přesnou navážku glukózy jsem rozpustila v 10 ml fosfátového pufru pH 7,4 a získala tak 100 mM roztok glukózy. Přesnou navážku fruktózy jsem rozpustila v 10 ml fosfátového pufru pH 7,4 a získala tak 100 mM roztok fruktózy. 5,55 M MGO jsem 11x naředila fosfátovým pufrem pH 7,4 a tím jsem získala 0,5 M roztok MGO. Roztok 1 mM Cu^{2+} jsem připravila rozpuštěním 2,5 mg síranu měďnatého v 10 ml vody.

Tyto zásobní roztoky jsem poté použila pro přípravu inkubačních směsí s BSA a AST.

4.3.1.5 Příprava roztoků DNPH

Z koncentrované HCl (35%) jsem odebrala 17 ml, které jsem v odměrné baňce doplnila na 100 ml, čímž jsem získala 2 M HCl. Přesné navážky odpovídající koncentracím 2, 4, 6, 8, 10 a 15 mM DNPH jsem rozpustila pomocí ultrazvuku v 2 M HCl. Hotové roztoky jsem uchovávala v lednici.

4.3.1.6 Příprava guanidin hydrochloridu

Přesnou navážku 20 mM KH_2PO_4 jsem rozpustila ve 20 ml redestilované vody a k tomuto roztoku jsem přidala rozpuštěnou přesnou navážku 6 M guanidinu hydrochloridu ve 20 ml ultračisté vody. Na potřebné pH 2,3 jsem roztok upravila pomocí kyseliny trichloroctové.

4.3.1.7 Příprava zásobního roztoku AA + bis AA

V malém množství redestilované vody jsem rozpustila 30 g akrylamidu a 0,8 g bis-arylamidu. Roztok jsem doplnila v odměrné baňce na 100 ml. Roztok jsem uchovávala v lednici.

4.3.1.8 Příprava 1,5 M Tris-HCl pufr

K navážce 18,5 g trisu jsem přidala 75 ml redestilované vody. Po rozpuštění jsem upravila pH na 8,8 pomocí 4 M HCl. Konečný roztok jsem doplnila v odměrné baňce na 100 ml. Roztok jsem uchovávala v lednici.

4.3.1.9 Příprava 0,5 M Tris-HCl pufr

K navážce 6 g Trisu jsem přidala 75 ml redestilované vody. Po rozpuštění jsem upravila pH na 6,8 pomocí 4 M HCl. Konečný roztok jsem doplnila v odměrné baňce na 100 ml. Roztok jsem uchovávala v lednici.

4.3.1.10 Příprava 10% SDS

K navážce 10 g SDS jsem přidala 80 ml redestilované vody. SDS jsem rozpustila a poté doplnila v odměrné baňce na 100 ml. Roztok jsem uchovávala při laboratorní teplotě.

4.3.1.11 Příprava elektrodového pufru

V 900 ml redestilované vody jsem rozpustila 72 g glycinu, 15 g Trisu a 5 g SDS. Pomocí HCl jsem upravila pH na 8,3. Roztok jsem doplnila v odměrné baňce na 1000 ml. Elektrodový pufr rozpipetovala po 100 ml a zamrazila.

4.3.1.12 Příprava zásobního vzorkového pufru

Zásobní vzorkový pufr jsem připravila smícháním redestilované vody; 0,5 M Tris-HCl pufru pH 6,8; glycerolu; 10% SDS a 0,5% bromfenolové modři. Roztok jsem uchovávala v lednici.

4.3.1.13 Příprava blotovacího pufru

V 500 ml ultračisté vody jsem rozpustila 6,06 g TRISU a 28,8 g glycinu. K tomuto roztoku jsem přidala 400 ml metanolu. Celou směs jsem v odměrné baňce doplnila na 2000 ml ultračistou vodou. Roztok jsem uchovávala v lednici.

4.3.1.14 Příprava zásobního roztoku 0,1M TRIS pufru

V 800 ml ultračisté vody jsem rozpustila 12,11 g TRISu. Pomocí 4 M HCl jsem upravila pH na 8. Roztok jsem uchovávala v lednici.

4.3.1.15 Příprava zásobního roztoku TBST

V 300 ml ultračisté vody jsem rozpustila 8,77 g NaCl. K tomuto roztoku jsem napipetovala 3 ml Tweenu 20 a 100 ml 0,1 M TRIS pufru. Celý roztok jsem doplnila v odměrné baňce na 1000 ml. Roztok jsem uchovávala v lednici.

4.3.1.16 Příprava zásobního roztoku TBS

Ve 100 ml ultračisté vody jsem rozpustila 2,19 g NaCl. Ke vzniklému roztoku jsem přidala 25 ml 0,1 M TRIS pufru. Celý roztok jsem doplnila v odměrné baňce na 250 ml. Roztok jsem uchovávala v lednici.

4.3.1.17 Příprava zásobního pufru alkalické fosfatázy (AP – pufr)

Ve 300 ml jsem rozpustila 6,06 g TRISu a 508 mg $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$. Pomocí 4 M HCl jsem roztok upravila na pH 9,5. Celou směs jsem doplnila v odměrné baňce na 500 ml. Roztok jsem uchovávala v lednici.

4.3.2 Příprava inkubačních směsí

4.3.2.1 Příprava inkubačních směsí s BSA

Zásobní roztoky fruktózy 100 mM, glukózy 100 mM, MGO 0,5 M a Cu^{2+} 1 mM jsem smíchala s roztokem BSA 10 mg/ml. Objemy jednotlivých roztoků pro získání potřebných koncentrací v inkubačních směsích jsou uvedeny v následující tabulce.

Výsledné koncentrace inkubačních směsí:

- A.... BSA 5 mg/ml
- B.... BSA 5 mg/ml + Frc 50 mM
- C.... BSA 5 mg/ml + Frc 50 mM + Cu^{2+} 10 μM
- D.... BSA 5 mg/ml + Glc 50 mM
- E.... BSA 5 mg/ml + Glc 50 mM + Cu^{2+} 10 μM
- F.... BSA 5 mg/ml + MGO 0,5 mM

	BSA 10 mg/ml [ml]	Pufr [ml]	Frc 100 mM [ml]	Glc 100 mM [ml]	Cu^{2+} 1 mM [μl]	MGO 0,5 M [μl]	Celkový objem [ml]
A	10	10					20
B	10		10				20
C	10		10		200		20,2
D	10			10			20
E	10			10	200		20,2
F	10	10				10	10,01

4.3.2.2 Příprava inkubačních směsí s AST

Zásobní roztoky fruktózy 100 mM, glukózy 100 mM, MGO 0,5 M a Cu^{2+} 1 mM jsem míchala s roztokem AST 1mg/ml. Objemy jednotlivých roztoků pro získání potřebných koncentrací v inkubačních směsích jsou uvedeny v následující tabulce.

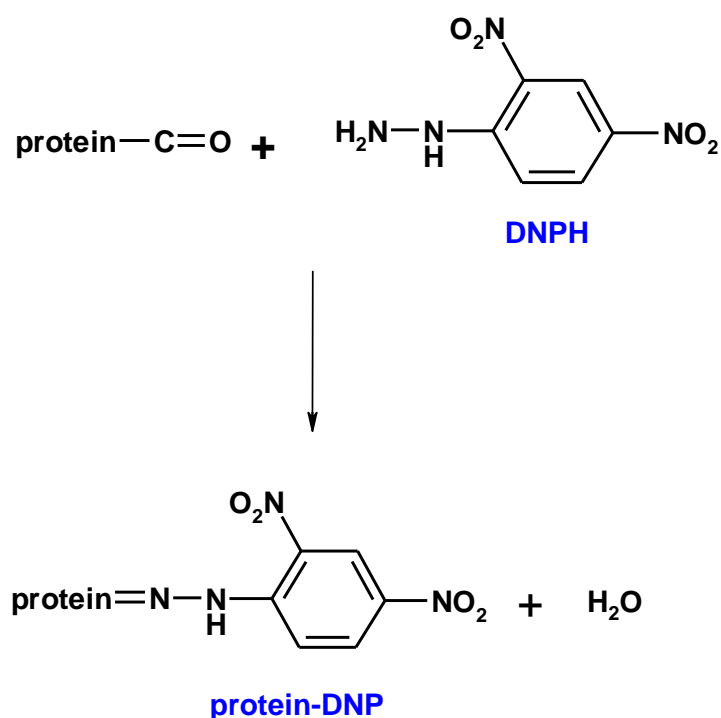
Výsledné koncentrace inkubačních směsí:

- 1.... AST 0,5 mg/ml
- 2.... AST 0,5 mg/ml + Frc 50 mM
- 3.... AST 0,5 mg/ml + Frc 50 mM + Cu^{2+} 10 μM
- 4.... AST 0,5 mg/ml + Glc 50 mM
- 5.... AST 0,5 mg/ml + Glc 50 mM + Cu^{2+} 10 μM
- 6.... AST 0,5 mg/ml + MGO 0,5 mM

	AST 1 mg/ml [μl]	Pufr [μl]	Frc 100 mM [μl]	Glc 100 mM [μl]	Cu ²⁺ 1 mM [μl]	MGO 0,5 M [μl]	Celkový objem [μl]
1	200	200					400
2	200		200				400
3	200		200		4		404
4	200			200			400
5	200			200	4		404
6	200	200				0,4	400,4

4.3.3 Optimalizace spektrofotometrického stanovení koncentrace karbonylových skupin

Karbonylové skupiny (aldehydy, ketony) vzniklé během glykace nebo oxidace proteinů jsem derivatizovala pomocí 2,4-dinitrofenylhydrazinu (DNPH). Výsledný hydrazon, který zbarvil roztok dožluta jsem měřila spektrofotometricky metodou popsanou Levinem a kol. (1990). Je důležité, aby minimální množství bílkoviny v měřeném vzorku bylo alespoň 0,5 mg.



4.3.3.1 Obecný postup pro stanovení karbonylů

Ke vzorku BSA, který obsahuje **1 mg/ml proteinu** jsem přidala 200 μl **DNPH** a tuto směs jsem dobře zamíchala. Vzorky jsem si připravila minimálně v triplicátu. Slepé vorky obsahovaly místo DNPH 2 M HCl. Po promíchání jsem směsi nechala 60 min **inkubovat** při laboratorní teplotě, každých 15 min jsem je promíchala. Inkubaci jsem ukončila přidáním 500 μl TCA (20%). Vzorky jsem následně inkubovala 10 min na ledu a poté jsem je centrifugovala v centrifuze Eppendorf při 11000 g po dobu 5 minut. Supernatant jsem odpipetovala. Proteinovou peletu jsem promyla 1 ml směsí etanol:etylacetát (1:1). Mikrozkušavky se směsí etanol:etylacetát jsem opět dobře promíchala a nechala stát 10 min při laboratorní teplotě, poté jsem vzorky opět zcentrifugovala (5 min, 11000 g). Promývání jsem opakovala 3x. Nakonec jsem proteinovou **peletu rozpustila** v 1 ml 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,4 za pomoci termomixeru (10 min, 37°C a 1000 rpm). Po rozpuštění pelety jsem výsledný roztok měřila na UV-VIS spektrofotometru Helios- β při vlnové délce 320 - 410 nm proti destilované vodě. Při měření jsem použila křemenné kyvety. Pro kvantifikaci jsem odečetla absorbanci při vlnové délce maxima (360 nm).

Zvýrazněné fáze v postupu jsem během optimalizace měnila, zbytek postupu zůstal stejný.

Koncentraci karbonylových skupin jsem vypočítala ze vzorce:

$$[\text{Karbonyl}] = \frac{A_{\text{VZ}} - A_{\text{PB}}}{\epsilon_{360} \times 1 \text{ cm}}$$

A_{VZ}	absorbance měřeného vzorku
A_{PB}	absorbance vzorku bez DNPH
ϵ_{360}	molární absorpční koeficient (360 nm, 22000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
[Karbonyl]	koncentrace karbonylových skupin v $\mu\text{mol/l}$

Pro výpočet množství karbonylových skupin na mg proteinu jsem musela nejprve vypočítat látkové množství karbonylových skupin v měřeném roztoku podle vzorce $n = c \cdot V$, kde c je koncentrace karbonylů a V je objem měřeného vzorku

v mililitrech. Látkové množství karbonylů pak vychází v nmol. Dále jsem musela znát koncentraci proteinu v měřeném vzorku. Nakonec díky přímé úměře jsem vypočítala množství karbonylů na mg proteinu (nmol/mg).

4.3.3.2 Sledování rozpustnosti proteinové pelety za použití fosfátového pufru nebo guanidin hydrochloridu

Rozpuštění proteinové pelety jsem sledovala na vzorku BSA 5 mg/ml + Frc 50 mM, který jsem smíchala s činidlem 10 mM DNPH. Směs jsem dobře promíchala. Následovala 60 minutová inkubace při laboratorní teplotě a promíchání vzorků každých 15 minut. Po přidání TCA a po promývání proteinové pelety směsí etanol:etylacetát jsem sledovala rozpustnost promyté proteinové pelety. K rozpuštění jsem použila 0,1 M fosfátový pufr o pH 7,4 a 6 M guanidin hydrochlorid o pH 2,3. Po rozpuštění pelety jsem množství karbonylů opět měřila spektrofotometricky

4.3.3.3 Nalezení vhodné koncentrace DNPH

Ze směsi BSA 5 mg/ml + Frc 50 mM inkubované 7 dní při 37°C jsem odebrala 200 μ l vzorku a k tomuto objemu jsem připipetovala 200 μ l DNPH o koncentracích 2 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM, 10 mM a 15 mM. Objem 200 μ l BSA 5 mg/ml + Frc 50 mM odpovídá množství proteinu 1 mg/ml. Každou koncentraci DNPH jsem dělala v triplikátu. Směsi jsem inkubovala 60 min. Další kroky odpovídaly výše uvedenému postupu pro stanovení karbonylů.

4.3.3.4 Nalezení vhodné délky inkubace BSA s DNPH

K 200 μ l vzorku BSA 5 mg/ml + Frc 50 mM inkubovaného 7 dní při 37°C jsem přidala 200 μ l 10 mM DNPH. Tuto směs jsem po promíchání nechala inkubovat 15 min, 30 min, 45 min, 60 min a 75 min. Vzorky u každého času inkubace jsem měla v triplikátu. Po inkubaci jsem pokračovala dále přidáním TCA a další kroky odpovídaly výše uvedenému postupu pro stanovení karbonylů.

4.3.3.5 Nalezení vhodného množství proteinu ve vzorku

Ze zásobního roztoku BSA 5 mg/ml + Frc 50 mM, který byl 7 dní inkubován při 37°C jsem si připravila jednotlivé vzorky pro analýzu. Výchozí roztok odpovídal množství 1 mg/ml proteinu ve vzorku. V následující tabulce jsou uvedené objemy

tohoto roztoku, které odpovídají jednotlivému množství proteinu ve vzorku 250 µg, 500 µg, 750 µg, 1 mg a 2 mg proteinu, které byly použity pro stanovení.

požadované množství proteinu	250 µg	500 µg	750 µg	1 mg	2 mg
odebraný objem BSA 5 mg/ml + Frc 50 mM	50 µl	100 µl	150 µl	200 µl	400 µl

Odebrané objemy z BSA 5 mg/ml + Frc 50 mM jsem smíchala s 200 µl 10 mM DNPH, dobře jsem směsi promíchala. Následovala 60 minutová inkubace při laboratorní teplotě a další kroky odpovídaly výše uvedenému postupu pro stanovení karbonylů.

4.3.3.6 Sledování účinku různých glykačních činidel na tvorbu karbonylových skupin v čase

V tomto případě jsem nechala na vzorek BSA působit různá glykační činidla. Jednotlivé vzorky BSA a glykačního činidla měly následující koncentrace: BSA 5 mg/ml, BSA 5 mg/ml + Frc 50 mM, BSA 5 mg/ml + Frc 50 mM + Cu²⁺ 10 µM, BSA 5 mg/ml + Glc 50 mM, BSA 5 mg/ml + Glc 50 mM + Cu²⁺ 10 µM, BSA 5 mg/ml + MGO 0,5 mM. Tyto směsi jsem poté nechala glykovat v inkubátoru při 37°C. Karbonyly vzniklé v každé směsi jsem stanovovala v čase 0, 7, 14 a 21 dní. Analýzu jsem prováděla s 200 µl vzorku a 200 µl 10 mM DNPH. Dále jsem pokračovala jako ve výše uvedeném postupu pro stanovení karbonylových skupin.

Při měření hladiny karbonylů ve vzorcích, kde jsem jako glykační činidlo použila MGO, byly výsledky ovlivněny nezreagovaným MGO. Volný MGO reagoval s DNPH a tím došlo k interferenci. Přebytek MGO jsem z naglykovaných směsí odstraňovala pomocí systému MICROCON. MICROCON využívá filtrace přes membránu umístěnou v mikrozkuhavce Eppendorf. Filtrace probíhá během centrifugace. Naglykované proteiny zůstaly zachyceny v membráně. Po otočení membrány jsem naglykované proteiny vymyla fosfátovým pufrům do nové mikrozkuhavky. Z této promyté směsi jsem vzala 200 µl vzorku a smíchala s 200 µl 10 mM DNPH. Dále jsem pokračovala podle již uvedeného postupu pro stanovení karbonylových skupin.

Díky filtraci, při které jsem odstraňovala přebytečný MGO došlo ke ztrátám i části bílkoviny ze vzorku. Ve vzorcích po spektrofotometrickém měření karbonylů jsem

stanovila koncentraci bílkovin Lowryho metodou. Množství karbonylů jsem poté přepočítala na skutečné množství bílkoviny v jednotlivých vzorcích.

Stanovení bílkovin Lowryho metodou jsem provedla i u ostatních inkubačních směsí. Všechny koncentrace karbonylů poté odpovídaly přesnému množství bílkoviny ve vzorku. Během promývání proteinové pelety ve směsi etanol:etylacetát může dojít ke ztrátám bílkovin.

4.3.4 Detekce karbonylových skupin vzniklých při glykaci AST pomocí elektroforetických metod

Pro glykaci jsem použila vzorek AST, na který jsem nechala působit glykační činidla (glukózu, glukózu + Cu^{2+} , fruktózu, fruktózu + Cu^{2+} a metylglyoxal). Konečné směsi vzorku a činidel měla následující koncentrace: samotné AST 0,5 mg/ml, AST 0,5 mg/ml + Frc 50 mM, AST 0,5 mg/ml + Frc 50 mM + Cu^{2+} 10 μM , AST 0,5 mg/ml + Glc 50 mM, AST 0,5 mg/ml + Glc 50 mM + Cu^{2+} 10 μM a AST 0,5 mg/ml + MGO 0,5 mM. Glykace probíhala v termostatu při 37°C po dobu 21 dní. Vytvořené karbonylové skupiny jsem měřila v čase 0, 7, 14 a 21 dní inkubace.

4.3.4.1 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek (SDS-PAGE)

Příprava gelu

Důležitým krokem před samotnou elektroforézou je příprava gelu. Do nalévacího stojánku jsem připevnila skla, která jsem důkladně omyla. Do kádinky jsem si napipetovala roztoky potřebné na spodní gel a ihned po promíchání jsem roztok gelu nalévala mezi skla. Poté jsem roztok gelu převrstvila nasyceným roztokem isobutanolu. Takto připravený gel jsem nechala 45 minut polymerovat. Po polymeraci jsem isobutanol slila a připravila jsem si směs roztoků na horní gel. Ihned po promíchání jsem tento roztok gelu nalila až po horní okraj skel. Pod úhlem 45° jsem do horního gelu zasunula hřebec pro vytvoření jamek. Tento druhý gel jsem nechala polymerovat 2 hodiny.

Spodní separační gel obsahoval 10% SDS, horní zaostřovací gel obsahoval 5% SDS. SDS je denaturační činidlo, díky kterému proteiny dostanou tyčinkovitý tvar a při pH 7 - 10 mají všechny stejný negativní náboj.

Vzorky proteinů jsem před nanesením do jamek v gelu smíchala se vzorkovým pufrům, který obsahoval 2-merkaptoetanol, který ruší disulfidické vazby a vzorky jsem povařila v termomixeru (3 minuty, 99°C, 750 rpm)

Elektroforéza

Skla s gelem jsem upevnila do stojánku pro elektroforézu. Tento stojánek jsem poté vložila do elektroforetické vaničky, kam jsem nalila elektrodotový pufr. Pomocí nanášecího bloku jsem do jamek nepipetovala 12 µl zdenaturovaného vzorku, 5 µl neobarveného molekulového markeru a 3 µl obarveného molekulového markeru (Coomasie Blue). 12 µl vzorku odpovídá 4 µg proteinu. Po nanesení vzorku jsem elektroforetickou vaničku ponořila do ledové lázně a po přiklopení víka jsem celou soustavu spojila se zdrojem. Dělení proteinů probíhalo podle jejich molekulové hmotnosti za konstantního napětí 200 V.

Detekce proteinů

Po ukončení elektroforézy jsem slila elektrodotový pufr a z elektrodotového stojánku vyndala skla s gelem. Po rozevření skel jsem gel odřízla od spacerů a zaostřovacího gelu. Proteiny jsem poté detekovala v separačním gelu.

Pro vizualizaci proteinů jsem použila barvení stříbrem. Je to metoda citlivější než použití barviva Coomassie Blue, ale není kvantitativní. Principem je redukce stříbrných iontů některými aminokyselinovými zbytky v proteinech (Cys, Met, Arg, Lys, His). Proteinové pásy se vizualizují přes hnědé až černé zbarvení. Citlivost této metody by měla být 0,1 ng.

Nejdříve jsem gel fixovala 5% PEG v 50% izopropylalkoholu. Během fixace došlo ke smrštění gelu. Následovalo barvení roztokem AgNO₃ v prostředí hydroxidu amonného a amoniaku, kdy se gel natahuje. Poté jsem gely oplachovala destilovanou vodou. Nakonec jsem gel vyvíjela v roztoku kyseliny citronové a formaldehydu v destilované vodě pro vizuální zvýraznění proteinových proužků. Vizualizaci jsem ukončila přenesením gelu do destilované vody. Gely jsem poté naskenovala na GelDocu XR a vyhodnotila v programu QuantityOne.

4.3.4.2 Imunobloting po SDS-PAGE

Po skončení elektroforézy jsem skla s gelem ponořila do blotovacího pufru. Z gelu jsem odřízla zaostřovací gel a oddělila jsem separační gel od skel. Separační gel jsem nechala volně plavat v blotovacím pufru. Polyvinylidendifluoridovou (PVDF)

membránu jsem aktivovala v metanolu. Blotovací sendvič jsem složila z houbičky, silného filtračního papíru, gelu, PVDF membrány, filtračního papíru a houbičky. Takto sestavený blotovací sendvič jsem vložila do blokovací vaničky spolu s ledítkem a to celé jsem zalila blotovací pufrem. Vaničku jsem umístila do ledové lázně. Blotování probíhalo při 100 V po dobu 120 minut.

Po blotování jsem ze sestaveného sendviče vyndala membránu, na kterou byly přeneseny proteiny a ponořila ji do roztoku DNPH 0,1 mg/ml (5 min.) v 2 M HCl. Během této inkubace došlo k derivatizaci vzniklých karbonylových skupin proteinů činidlem. Následovalo vymývání volného DNPH v 2 M HCl (3 x 5 min.) a poté ve 100% methanolu (7 x 5 min.). Membránu ponořenou v 8% roztoku mléka v TBST jsem nechala do druhého dne v lednici, abych zablokovala ostatní volná místa na membráně a zabránila tak nespecifické vazbě protilátek.

Následující den jsem membránu promývala ve skleněných miskách umístěných na kývačce. Nejdříve jsem membránu opláchla 2 x 5 minut v TBST. Poté jsem membránu koupala s primární protilátkou (anti-DNP, 1 µg/1 ml) 45 minut, následoval oplach v TBST (6 x 5 minut), poté jsem membránu koupala se sekundární protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou (45 minut). Nakonec jsem membránu oplachovala v TBST (6 x 5 minut), TBS (2 x 5 minut) a AP-pufrem (2 x 5 minut).

Detekce proteinů

Pro detekci jsem využila chemiluminiscence. Tuto detekci jsem musela provádět v temné komoře pod ochranným světlem. Na membránu s navázanou primární a sekundární protilátkou jsem napipetovala 1,5 ml substrát, který pokrýval celou membránu. Membránu se substrátem jsem nechala inkubovat 5 minut. Poté jsem okapanou membránu přenesla do folie. Na tuto folii jsem přiložila RTG film a nechala jsem v kazetě exponovat 10 minut. Po expozici jsem film ponořila do vývojky (ředěné ultračistou vodou 1:14). Když byl film dostatečně vyvolaný, opláchla jsem ho v destilované vodě a ponořila jsem jej do ustalovače (ředěného ultračistou vodou 1:5). Poté jsem jej znovu ponořila do destilované vody a nechala okapat. Suché RTG filmy jsem naskenovala na GelDocu XR a vyhodnotila v programu Quantity One.

5 Výsledky

5.1 Optimalizace spektrofotometrického stanovení karbonylových skupin

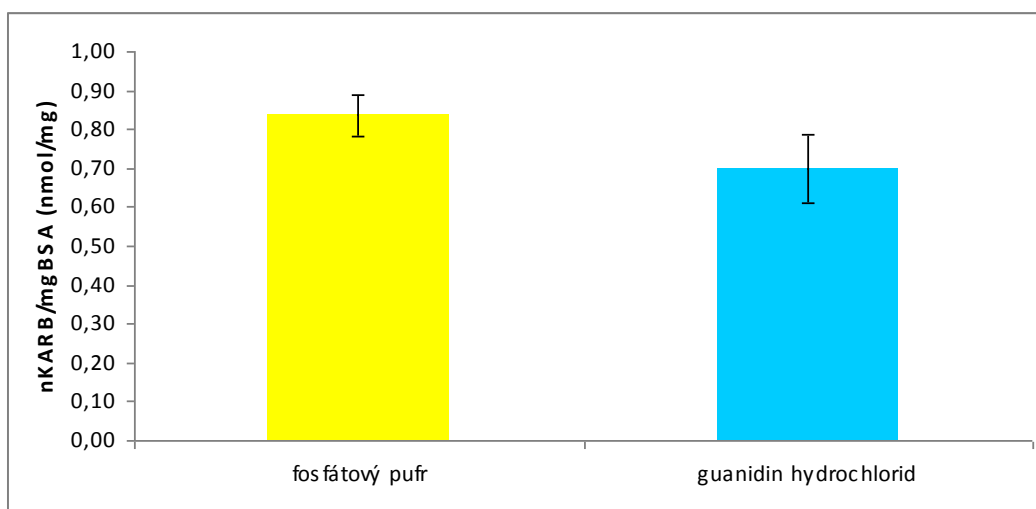
Při optimalizaci jsem se snažila najít nejvhodnější rozpouštědlo, koncentraci DNPH a proteinu a také délku inkubace vzorku s DNPH, které by v této metodě vedlo k výsledku, který odpovídá množství karbonylů ve vzorku.

5.1.1 Sledování rozpustnosti proteinové pelety za použití fosfátového pufru nebo guanidin hydrochloridu

Proteinovou peletu jsem rozpouštěla v termomixeru při 37°C a 1000 rpm po dobu 10 minut. Rozpouštění proteinové pelety proběhlo v obou případech bez potíží. Nicméně použití guanidin hydrochloridu statisticky významně ($p < 0,05$) snížilo naměřené množství karbonylových skupin (Tab. 1 a Obr. 7). Proto jsem pro další experimenty používala jako rozpouštědlo 0,1 M fosfátový pufr.

Tabulka 1: Porovnání naměřeného množství karbonylových skupin po rozpuštění proteinové pelety ve 0,1 M fosfátovém pufru (pH 7,4; 0,05% azid sodný) a v 6 M guanidin hydrochloridu (pH 2,3).

Použité rozpouštědlo	$n_{\text{KARB}}/\text{mg}_{\text{BSA}}$ [nmol/mg]	SD
fosfátový pufr	0,84	0,05
guanidin hydrochlorid	0,70	0,09



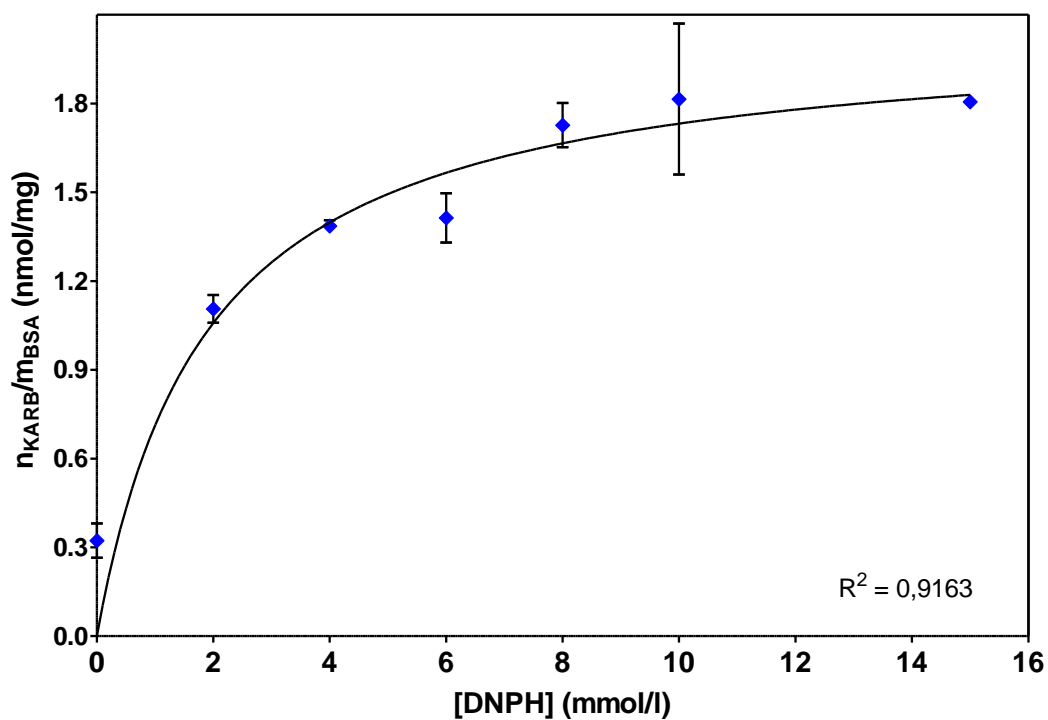
Obrázek 7: Porovnání naměřeného množství karbonylových skupin po rozpuštění proteinové pelety ve 0,1 M fosfátovém pufru (pH 7,4, 0,05% azid sodný) a v 6 M guanidin hydrochloridu.

5.1.2 Nalezení vhodné koncentrace DNPH

S narůstající koncentrací DNPH rostlo i množství stanovených karbonylů ve vzorku. Od koncentrace 10 mM DNPH se již množství karbonylů dále neměnilo a hodnota u 15 mM DNPH byla téměř stejná jako při použití 10 mM DNPH (Tab. 2). Z toho důvodu jsem jako vhodnou koncentraci pro další analýzu vybrala DNPH 10 mM. Výsledný graf má hyperbolický průběh (Obr. 8).

Tabulka 2: Závislost naměřeného množství karbonylových skupin na koncentraci dinitrofenylhydrazinu.

Koncentrace DNPH [mM]	$n_{\text{KARB}}/\text{mg}_{\text{BSA}}$ [nmol/mg]	SD
0	0,323	0,058
2	1,106	0,047
4	1,386	0,019
6	1,414	0,084
8	1,727	0,074
10	1,815	0,255
15	1,806	0,010



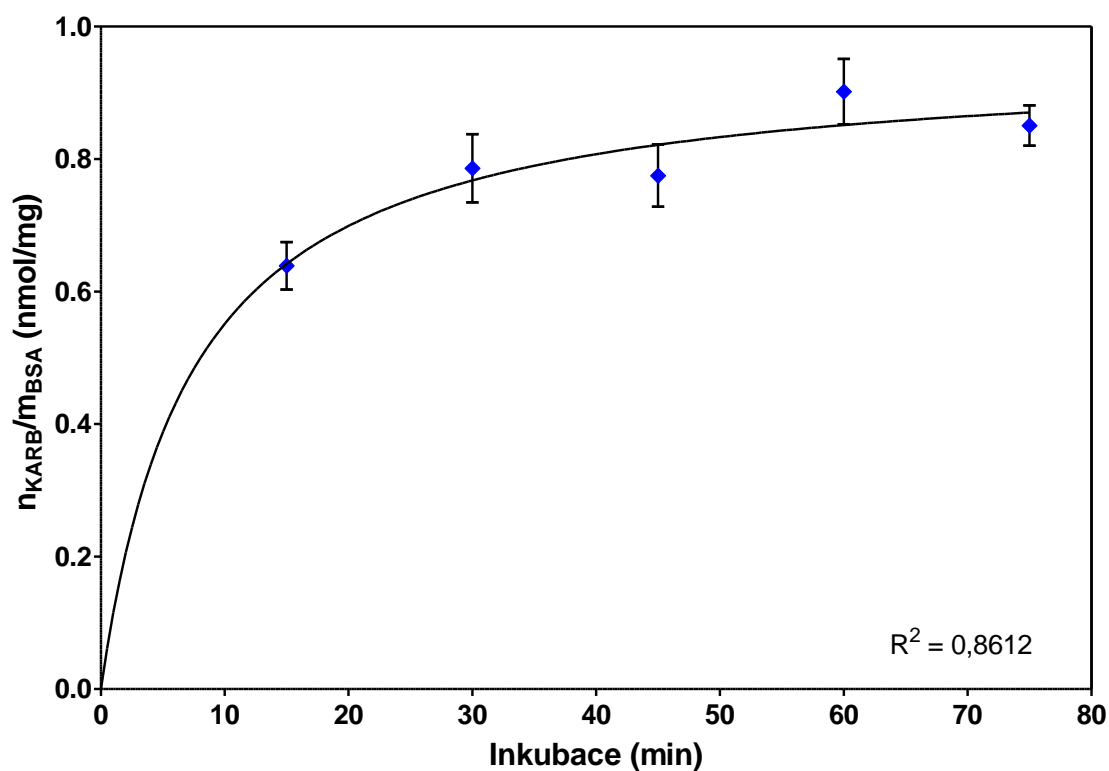
Obrázek 8: Závislost naměřeného množství karbonylových skupin na koncentraci dinitrofenylhydrazinu.

5.1.2 Nalezení vhodné délky inkubace BSA s DNPH

Kratší doba inkubace ukázala, že ještě nedošlo k dostatečnému zreagování karbonylových skupin naglekovaného vzorku s činidlem DNPH (Tab. 3). Jako optimální doba inkubace se ukázalo 60 minut, při delší době už nedochází k žádným dalším reakcím a naměřené množství karbonylů ve vzorku se nemění. Výsledný graf má hyperbolický průběh (Obr. 9).

Tabulka 3: Závislost naměřeného množství karbonylových skupin na délce inkubace vzorku s dinitrofenylhydrazinem

Délka inkubace [min]	$n_{\text{KARB}}/\text{mg}_{\text{BSA}}$ [nmol/mg]	SD
15	0,639	0,036
30	0,786	0,052
45	0,775	0,047
60	0,902	0,049
75	0,851	0,030



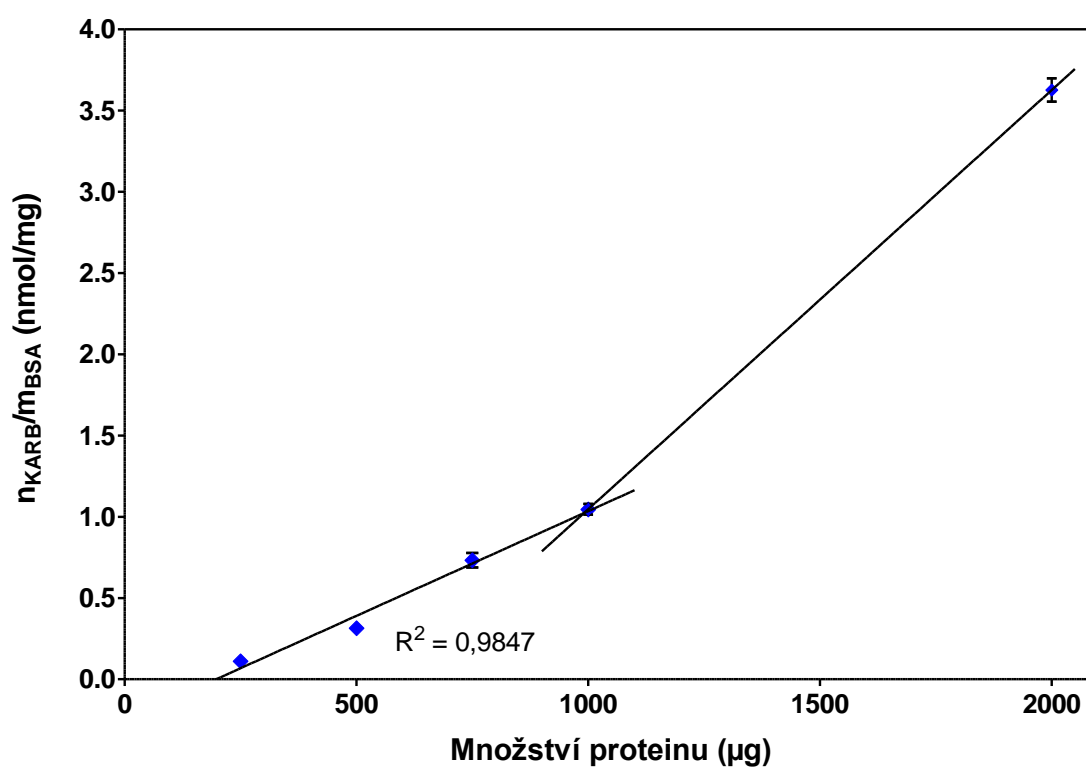
Obrázek 9: Závislost naměřeného množství karbonylových skupin na délce inkubace vzorku s dinitrofenylhydrazinem.

5.1.3 Nalezení vhodného množství proteinu ve vzorku

Množství proteinu ve vzorku mělo vliv na rozpustnost proteinové pelety v 0,1 M fosfátovém pufru. Do množství 1 mg/ml jsem peletu rozpustila v termomixeru během 10 min při 37°C a 1000 rpm. Peletu s množstvím proteinu 2 mg/ml jsem v termomixeru za daných podmínek musela nechat 20 min, aby došlo k úplnému rozpuštění. Naměřené množství karbonylů ve vzorku se lineárně zvyšovalo až do koncentrace proteinu 1 mg/ml. Poté začalo stoupat nelineárně (Obr. 10 a Tab. 4). Pro další experimenty jsem měřila množství karbonylových skupin ve vzorcích obsahujících 1 mg BSA v 1 ml vzorku.

Tabulka 4: Závislost naměřeného množství karbonylových skupin na koncentraci proteinu ve vzorku.

Množství proteinu [μg]	$n_{\text{KARB}}/m_{\text{BSA}}$ [nmol/mg]	SD
250	0,111	0,015
500	0,315	0,025
750	0,733	0,045
1000	1,046	0,033
2000	3,627	0,072



Obrázek 10: Závislost naměřeného množství karbonylových skupin na koncentraci proteinu ve vzorku.

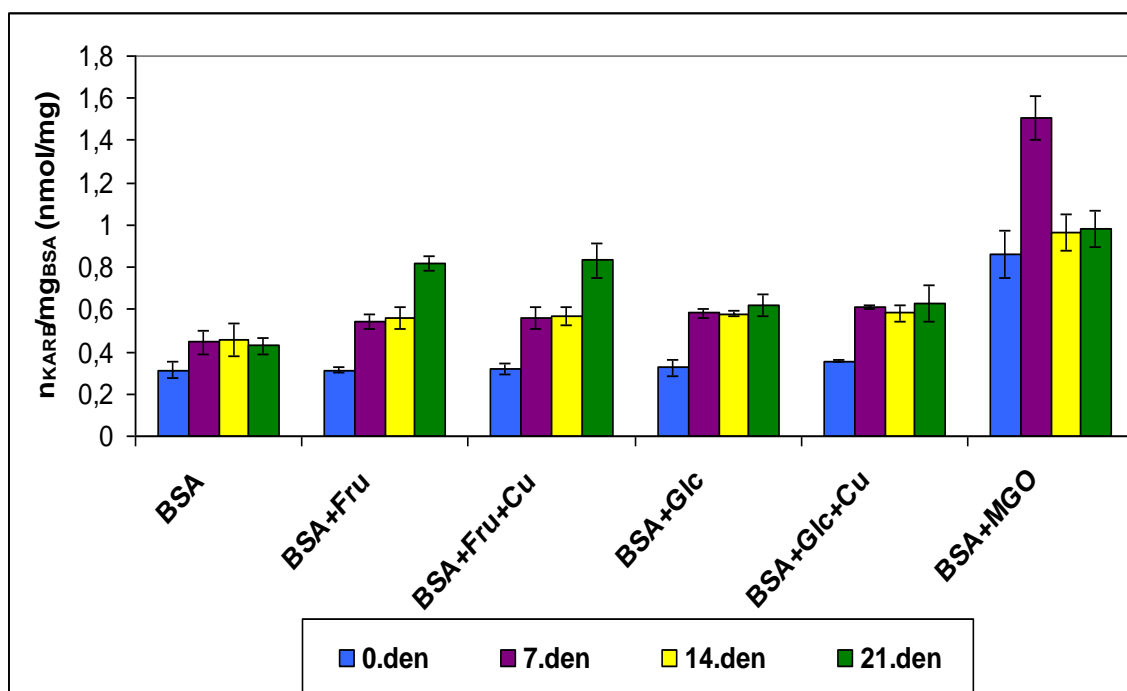
5.1.4 Sledování účinku různých glykačních činidel na tvorbu karbonylových skupin v čase

V tabulce 5 jsou uvedena přepočítaná množství karbonylů $n_{\text{KARB}}/m_{\text{BSA}}$ (nmol/mg), která odpovídají měření v jednotlivých dnech. Nejlepší glykační schopnost z uvedených činidel měl MGO, dále fruktóza nakonec glukóza. Přídavek Cu^{2+} také v menší míře urychlil tvorbu AGE. Výsledky 7. dne glykace MGO jsou nejspíše ovlivněny nedokonalým odstraněním MGO ze vzorku. U vzorku s použitou glukózou jako glykačním činidlo došlo jen k pozvolnému nárůstu karbonylových skupin během jednotlivých dnů glykace. U fruktózy došlo k nejvýznamnějšímu nárůstu karbonylů mezi 0. až 7. dnem a mezi 14. - 21. dnem glykace. Mírný nárůst karbonylových skupin u kontroly (samotné BSA bez glykačních činidel) je nejspíše známkou fyziologické neenzymatické glykace probíhající i bez přidání glykačních činidel (Obr. 11 a 12).

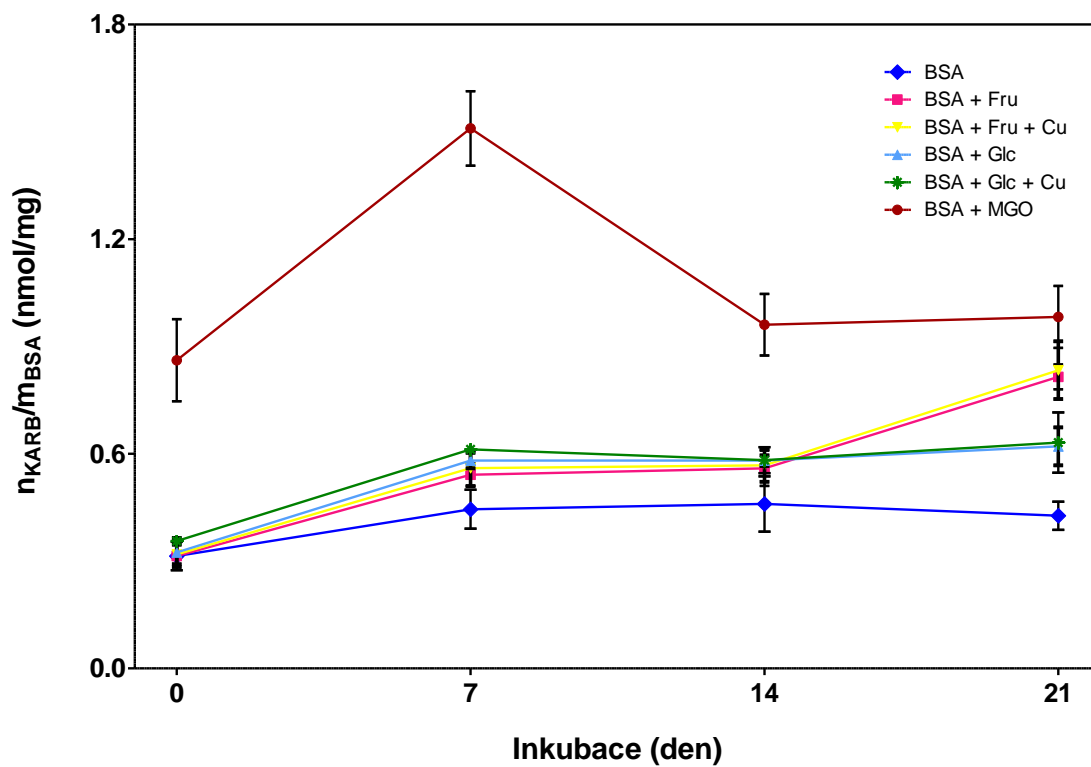
Tabulka 5: Vliv glykačních činidel na tvorbu karbonylových skupin v průběhu času. Inkubační směsi obsahovaly BSA 5 mg/ml rozpuštěné v 0,1 M fosfátovém pufru (pH 7,4; 0,05% azid sodný) a příslušné glykační činidlo.

Glykační činidlo	$n_{\text{KARB}}/\text{mg}_{\text{BSA}}$ [nmol/mg]			
	Den 0	Den 7	Den 14	Den 21
¹ kontrola	0,314 ± 0,040	0,445 ± 0,054	0,460 ± 0,077	0,427 ± 0,039
Frc 50 mM	0,314 ± 0,012	0,542 ± 0,032	0,559 ± 0,049	0,815 ± 0,035
Frc 50 mM + Cu ²⁺ 10 μM	0,318 ± 0,027	0,560 ± 0,050	0,568 ± 0,046	0,834 ± 0,081
Glc 50 mM	0,324 ± 0,041	0,581 ± 0,022	0,581 ± 0,015	0,621 ± 0,053
Glc 50 mM + Cu ²⁺ 10 μM	0,356 ± 0,003	0,612 ± 0,011	0,582 ± 0,036	0,631 ± 0,085
MGO 0,5 mM	0,862 ± 0,015	1,510 ± 0,104	0,961 ± 0,086	0,983 ± 0,087

¹Kontrola obsahovala pouze BSA 5 mg/ml bez glykačního činidla.



Obrázek 11: Vliv glykačních činidel na tvorbu karbonylových skupin v průběhu času. Inkubační směsi obsahovaly BSA 5 mg/ml rozpuštěné v 0,1 M fosfátovém pufru (pH 7,4; 0,05% azid sodný) a příslušné glykační činidlo.



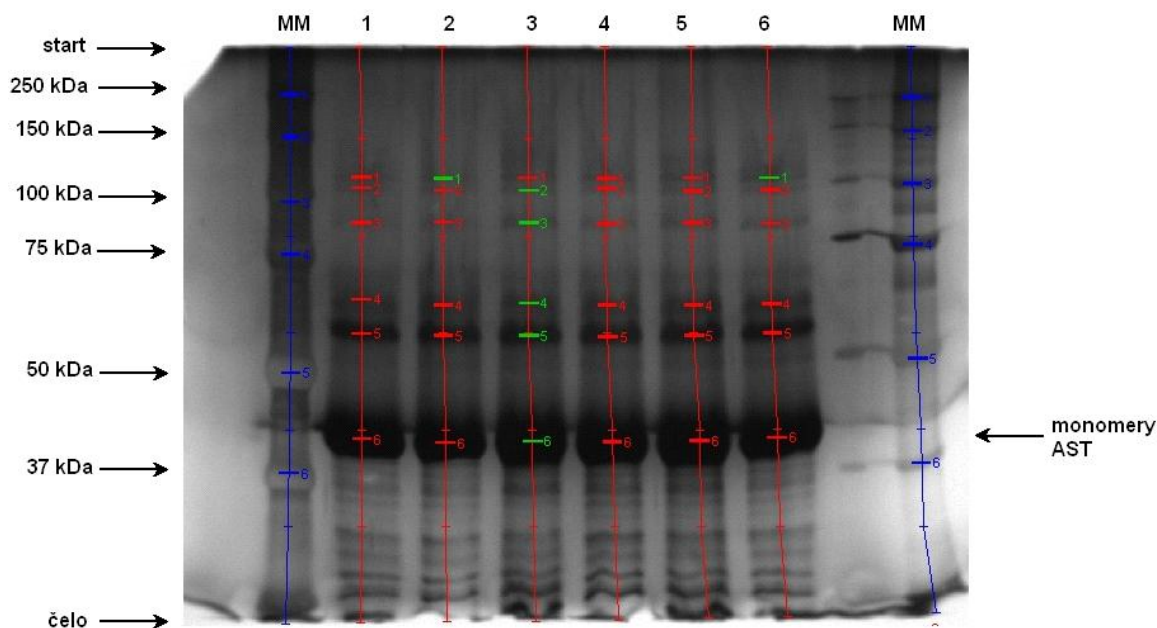
Obrázek 12: Vliv glykačních činidel na tvorbu karbonylových skupin v průběhu času. Inkubační směsi obsahovaly BSA 5 mg/ml rozpuštěné v 0,1 M fosfátovém pufru (pH 7,4; 0,05% azid sodný) a příslušné glykační činidlo.

5.2 Detekce karbonylových skupin vzniklých při glykaci AST pomocí elektroforetických metod

5.2.1 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek (SDS-PAGE)

Po obarvení stříbrem jsem gely analyzovala pomocí programu QuantityOne. Podle pozice molekulového markeru jsem v tomto programu vyhodnotila molekulovou hmotnost jednotlivých proužků. Monomer AST má molekulovou hmotnost asi 40 kDa. Proužky s molekulovou hmotností nižší než 40 kDa odpovídají pravděpodobně fragmentům AST vzniklým během glykace a dalším bílkovinám, které byly přítomny v komerčně dodávaném preparátu AST. Glykační produkty mají molekulovou hmotnost asi 141 kDa a vyšší. Čím vyšší je molekulová hmotnost daného proužku, tím více glykačních produktů tvořících zkřížené vazby mezi molekulami proteinů je v něm obsaženo. Proužky s vyšší molekulovou hmotností jsou patrné i u kontrolního vzorku AST. Tento enzym je získaný z prasečích srdcí, a protože je glykace fyziologický děj, který se urychluje stářím jedince, tak dochází i k nárůstu AGEs. Je tedy možné, že izolovaná AST byla v daném jedinci již modifikována glykací nebo oxidací.

V čase 0 nejsou glykační produkty patrné u žádného použitého činidla (Obr. 13). Po sedmi dnech inkubace je směs AST + Frc + Cu²⁺ již natolik naglykovaná, že mají proteiny takovou velikost, která znemožnila jejich migraci gelem a 7. den za daných podmínek nebyly přesně odečteny molekulové hmotnosti AGE. V tomto čase jsem detekovala AGE produkty v inkubačních směsích AST + Frc a AST + MGO (Obr. 14). Po 14 a 21 dnech inkubace jsem glykační produkty s molekulovou hmotností 141 kDa detekovala ve všech směsích mimo samotné AST a již dříve zmíněné AST + Frc + Cu²⁺. U směsi AST + Frc + Cu²⁺ jsem molekulovou hmotnost AGE produktů označila jako vyšší než 430 kDa a to jak 14. tak 21. den inkubace (Obr. 15a 16).

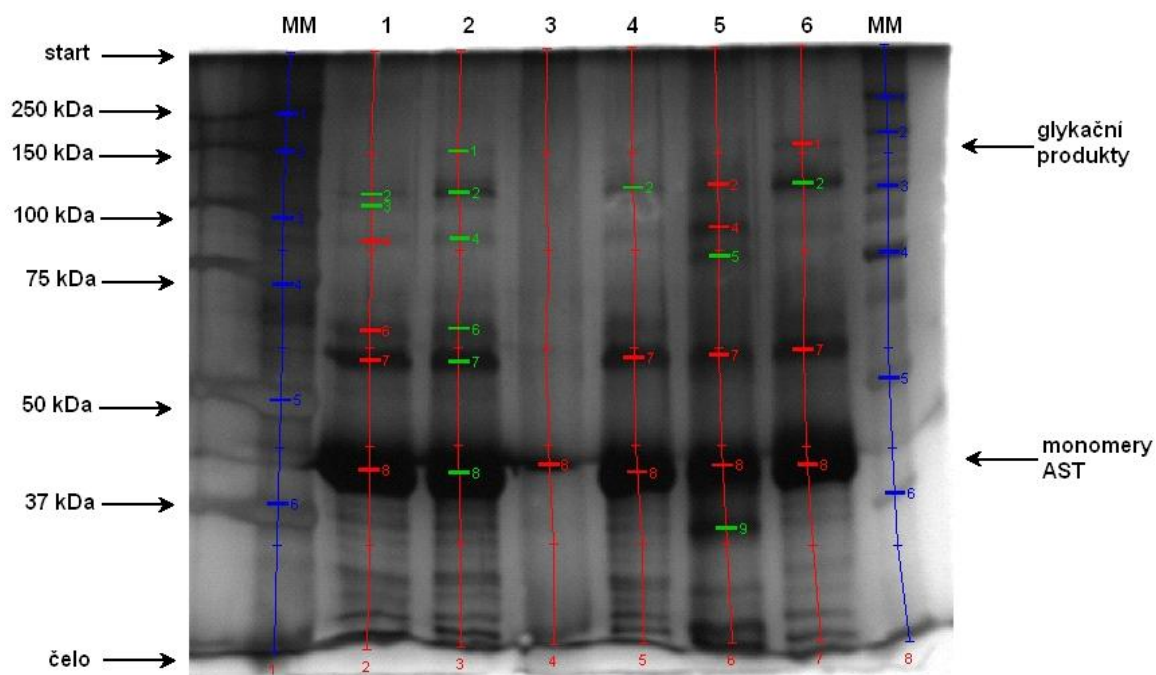


Obrázek 13: Vliv různých glykačních činidel na tvorbu AGE produktů sledovaný pomocí SDS-PAGE. Vzorky obsahující AST byly inkubovány při 37°C po dobu 0 dní. Podmínky: 4% zaostřovací a 10% rozdělovací gel, nanášené množství bílkoviny 4 µg/jamku, barvení Silver Staining.

Tabulka 6: Molekulová hmotnost jednotlivých bandů po vyhodnocení v programu Quantity One.

1 AST	2 AST + Frc	3 AST+Frc+Cu ²⁺	4 AST+Glc	5 AST+Glc+Cu ²⁺	6 AST+MGO
40 864	40 249	40 318	40 100	40 100	40 306
56 967	56 160	55 935	55 678	55 555	55 960
64 085	62 390	62 657	62 159	61 967	62 178
88 497	87 758	86 773	86 298	86 720	86 263
108 034	104 778	103 998	104 830	102 617	103 314
115 962	113 250	113 285	112 691	112 997	113 250

	monomery AST
	glykační produkty

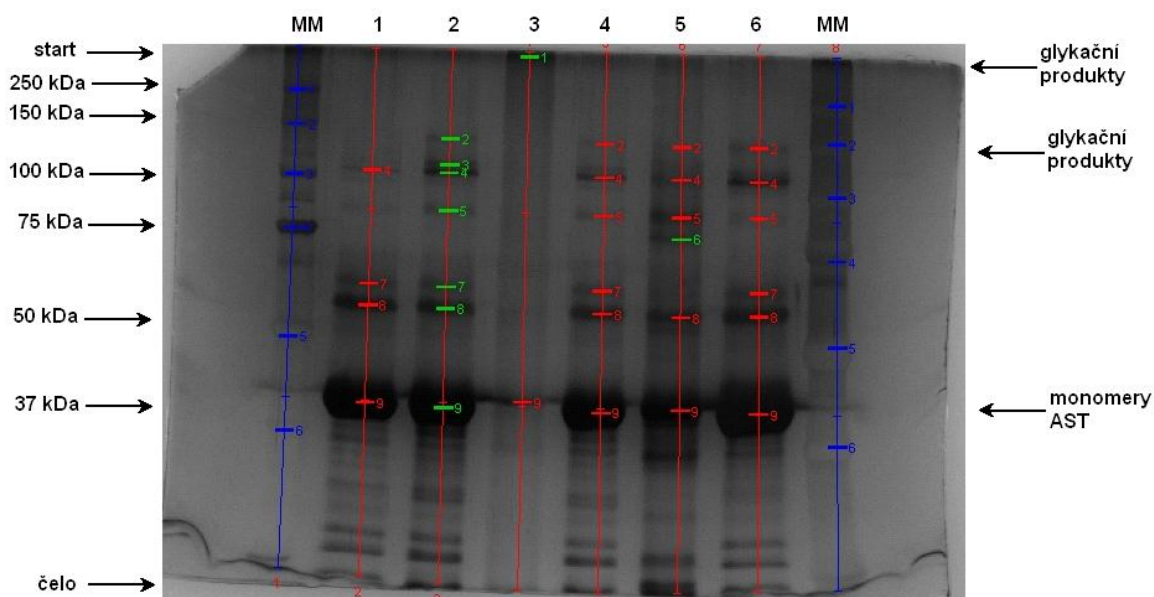


Obrázek 14: Vliv různých glykačních činidel na tvorbu AGE produktů sledovaný pomocí SDS-PAGE. Vzorky obsahující AST byly inkubovány při 37°C po dobu 7 dní. Podmínky: 4% zaostřovací a 10% rozdělovací gel, nanášené množství bílkoviny 4 µg/jamku, barvení Silver Staining.

Tabulka 7: Molekulová hmotnost jednotlivých bandů po vyhodnocení v programu Quantity One.

1 AST	2 AST+Frc	3 AST+Frc+Cu ²⁺	4 AST+Glc	5 AST+Glc+Cu ²⁺	6 AST+MGO
				33 685	
40 468	39 826	40 434	39 356	40 049	39 995
56 321	55 117		54 994	55 048	55 652
62 449	62 117				
				76 588	
87 202	87 517			88 239	
99 146					
105 320	105 320		105 320	106 289	105 320
	143 816				144 674

	monomery AST
	glykační produkty

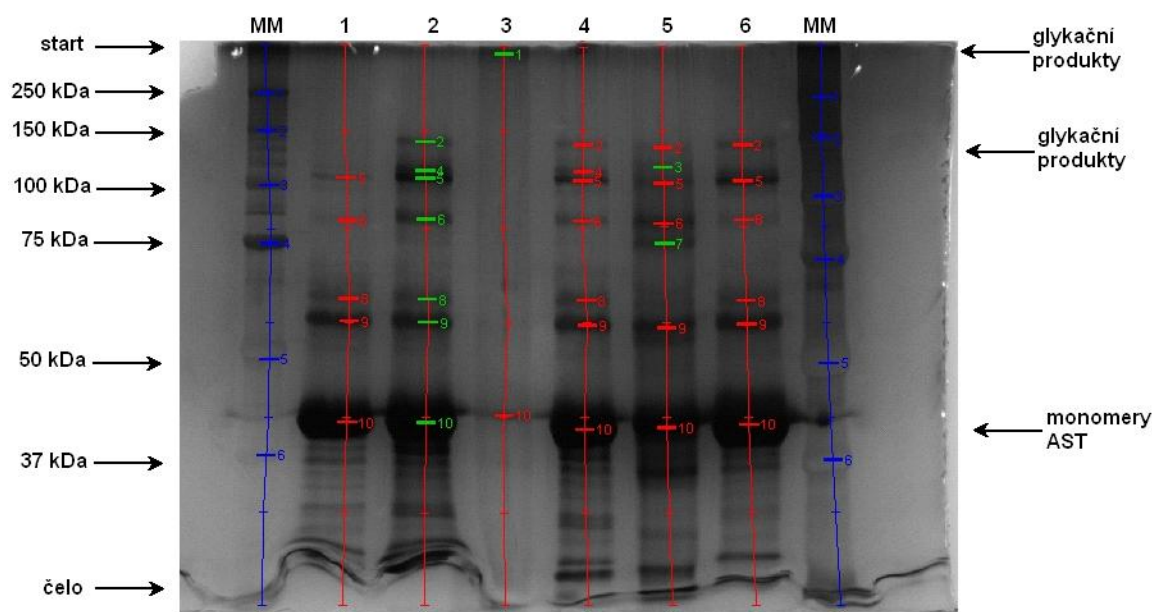


Obrázek 15: Vliv různých glykačních činidel na tvorbu AGE produktů sledovaný pomocí SDS-PAGE. Vzorky obsahující AST byly inkubovány při 37°C po dobu 14 dní. Podmínky: 4% zaostřovací a 10% rozdělovací gel, nanášené množství bílkoviny 4 µg/jamku, barvení Silver Staining.

Tabulka 8: Molekulová hmotnost jednotlivých bandů po vyhodnocení v programu Quantity One.

1 AST	2 AST+Frc	3 AST+Frc+Cu ²⁺	4 AST+Glc	5 AST+Glc+Cu ²⁺	6 AST+MGO
41 091	41 085	42 388	41 210	41 433	40 897
57 143	57 580		57 860	57 254	57 647
62 100	62 662		63 867		64 533
				80 653	
	87 105		88 690	89 532	90 460
106 594	108 245		109 773	110 225	109 735
	115 226				
	141 379		142 403	142 370	143 237
		437 013			

	monomery AST
	glykační produkty



Obrázek 16: Vliv různých glykačních činidel na tvorbu AGE produktů sledovaný pomocí SDS-PAGE. Vzorky obsahující AST byly inkubovány při 37°C po dobu 21 dní. Podmínky: 4% zaostřovací a 10% rozdělovací gel, nanášené množství bílkoviny 4 µg/jamku, barvení Silver Staining.

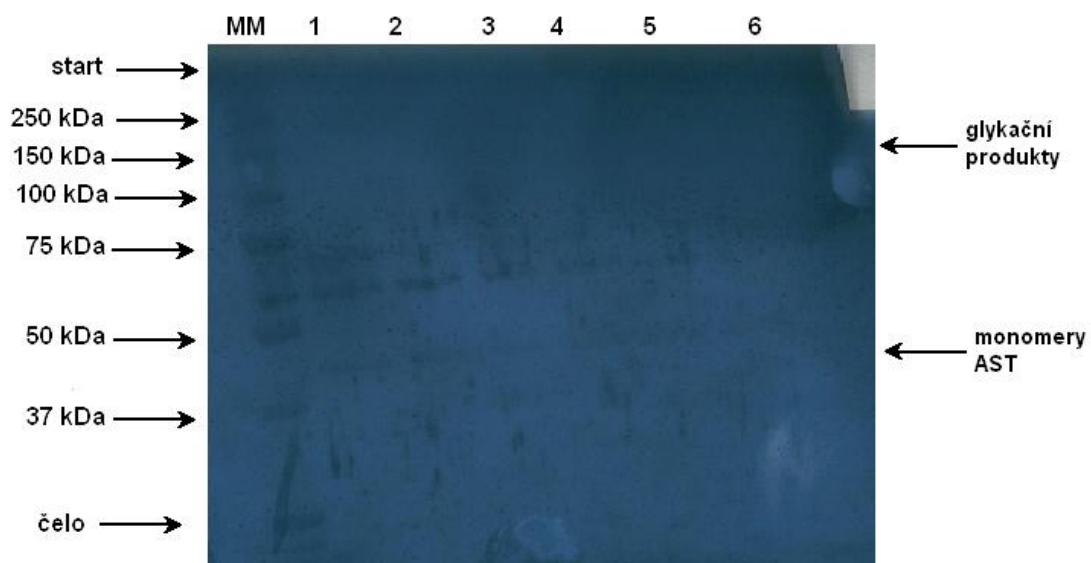
Tabulka 9: Molekulová hmotnost jednotlivých bandů po vyhodnocení v programu Quantity One.

1 AST	2 AST+Frc	3 AST+Frc+Cu ²⁺	4 AST+Glc	5 AST+Glc+Cu ²⁺	6 AST+MGO
41 162	41 115	42 227	40 480	40 799	41 248
57 421	57 381		57 378	57 040	58 112
62 055	62 420		62 890		63 590
				79 297	
84 644	86 465		87 460	87 154	89 517
106 504	107 792		109 004	107 447	110 828
	114 457		116 122	120 717	
	140 819		140 757	138 252	142 396
		431 455			

	monomery AST
	glykační produkty

5.2.2 Imunobloting po SDS-PAGE

Chemiluminiscenční detekci glykovaných proteinů po imunoblotingu jsem dělala jen pro vzorky inkubované po dobu 0 a 7 dní. Na RTG filmech (Obr. 17 a 18) jsem našla 0. den ve všech inkubačních směsích proužek odpovídající monomeru AST (41 kDa) a dva proteinové proužky, z nichž ten s vyšší molekulovou hmotností byl hůře patrný. Molekulová hmotnost těchto dvou separovaných proteinů byla 57 kDa a 70 kDa. U výsledků 7. dne inkubace jsou viditelné pouze monomery AST (41 kDa) v inkubačních směsích samotné AST (1), AST + fruktóza (2), AST + glukóza (4), AST + glukóza + Cu^{2+} (5), AST + metylglyoxal (6). Po 7denní inkubaci není přítomen monomer AST u inkubační směsi AST + fruktóza + Cu^{2+} (3), protože vzniklé agregáty mají vysokou molekulovou hmotnost a nemohou prostoupit do gelu. Molekulové hmotnosti jednotlivých proužků jsem bohužel na RTG filmu neodečetla kvůli obtížím s naskenováním. Nicméně s postupující délkou inkubace dochází k tvorbě glykačních produktů, což právě potvrzuje inkubační směs číslo 3. K získání lepších výsledků by mohla pomoci úprava této metody.



Obrázek 17: Vliv různých glykačních činidel na tvorbu AGE produktů sledovaný pomocí imunoblotingu. Vzorke obsahující AST byly inkubovány při 37°C po dobu 0 dní. Podmínky: primární Ab proti DNP-proteinům, sekundární Ab konjugovaná s alkalickou fosfatázou, chemiluminiscenční detekce.



Obrázek 18: Vliv různých glykačních činidel na tvorbu AGE produktů sledovaný pomocí imunoblotingu. Vzorke obsahující AST byly inkubovány při 37°C po dobu 7 dní. Podmínky: primární Ab proti DNP-proteinům, sekundární Ab konjugovaná s alkalickou fosfatázou, chemiluminiscenční detekce.

6 Diskuze

Stanovení karbonylových skupin může sloužit jako marker oxidačního stresu. Na vzniku reaktivních karbonylových skupin se podílí neenzymová glykace, lipidová peroxidace, oxidace glukózy a další (Jakuš 2000). Karbonylové skupiny (aldehydy a ketony) vznikají oxidací postraních řetězců proteinů za vzniku R_1-CO-R_2 skupiny (Chakravarti a Chakravarti 2007).

Neenzymovou glykací vytvořené AGE produkty tvoří heterogenní skupinou látek co do velikosti a složení. Proteiny modifikované pokročilou glykací mají vyšší molekulovou hmotnost než proteiny, ze kterých vznikly, typické žlutohnědé zbarvení, charakteristické fluorescenční spektrum a změněné fyzikálně-chemické vlastnosti se schopností tvořit příčné vazby (Janebová a kol. 1999; Singh a kol. 2001). Přesná struktura všech AGE není ještě známa (Ulrich a Cerami 2001). Ve své práci jsem se věnovala *in vitro* glykaci proteinu BSA a enzymu AST a následné detekci glykačních produktů obsahujících karbonylové skupiny. Měření hladiny karbonylových skupin je užíváno jako biomarker oxidačního stresu.

Pro detekci karbonylových skupin je dostupná celá řada metod. Koncentraci karbonylů lze stanovit jak u izolovaných proteinů, tak ve směsi proteinů. Pokud se jedná o směs, lze využít metodu HPLC pro separaci jednotlivých proteinů, čímž se zvýší přesnost a citlivost při měření hladiny karbonylů (Dalle-Donne a kol. 2003A). Stanovení karbonylových skupin zahrnuje obvykle derivatizaci pomocí DNPH, což vede k tvorbě dinitrofenylhydrazonu příslušného proteinu. Tento produkt může být detekován spektrofotometricky, metodou ELISA, jednorozměrnou nebo dvourozměrnou elektroforézou a imunoblotingem (Buss a kol. 1997, Dalle-Donne a kol. 2003A, Robinson a kol. 1999).

Při **spektrofotometrickém stanovení** karbonylů jsem vycházela z metody popsané Levinem a kol. (1990), kterou jsem modifikovala. Vzniklý hydrazon je detekován při 370 nm, kde se nachází maximum absorpčního pásu DNP-proteinů. V původní práci je doporučeno množství proteinů ve vzorku vyšší než 0,5 mg/ml. Během optimalizace se mi jako vhodné množství proteinů ve vzorku jevil 1 mg/ml.

Toto množství ve své práci použila i Yan a kol. (1996). Použití 10 mM koncentrace činidla DNPH k derivatizaci karbonylových skupin a hodinová inkubace vzorku bílkoviny (BSA) s tímto činidlem se jeví jako nejvhodnější. Ke stejným závěrům došli i Levine a kol. (1990) a Yan a kol. (1996). Při použití 6 M guanidin hydrochloridu (pH 2,3) k rozpuštění proteinové pelety došlo při mých experimentech k výraznému poklesu naměřeného množství karbonylových skupin ($p < 0,05$) než při použití 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,4 s přídavkem azidu sodného. Guanidin hydrochlorid se běžně používá při spektrofotometrickém stanovení karbonylových skupin (Levine a kol. 1990, Firuzi a kol. 2006), ale práce s ním je obtížná. Použitá koncentrace guanidinu je již velmi vysoká a vzorky se musí před vlastním měřením důkladně promíchat, aby se předešlo nepřesnostem způsobeným nehomogenitou měřeného roztoku. Použití 0,1 M fosfátového pufru (pH 7,4) k rozpuštění pelety se jeví jako jednodušší a rychlejší řešení. Proto jsem jako vhodné prostředí pro rozpuštění proteinové pelety zvolila 0,1 M fosfátový pufr (pH 7,4).

Po optimalizaci podmínek metody jsem zahájila **experimenty s glykačními činidly**. Cílem bylo zjistit, které z použitých glykačních činidel je aktivnější. Sledovaným parametrem jejich glykační aktivity byla tvorba karbonylových skupin. BSA o koncentraci 1 mg/ml jsem glykovala glukózou 50 mM, glukózou 50 mM + Cu^{2+} 10 μM , fruktózou 50 mM, fruktózou 50 mM + Cu^{2+} 10 μM a metylglyoxalem 0,5 mM. Schopnost glykace vzrůstala u použitých činidel v pořadí: glukóza < glukóza s mědí < fruktóza < fruktóza s mědí a nejlepší glykační schopnosti měl reaktivní α -oxoaldehyd metylglyoxal. Tyto výsledky jen potvrzují již známá fakta o rychlosti glykace, které uveřejnili například Obšil a Pavlíček (1997) a další autoři.

Stanovení karbonylových skupin v proteinech může ovlivnit např. vysoká koncentrace nukleových kyselin ve vzorku. Nukleové kyseliny mohou reagovat s DNPH, protože také obsahují karbonylové skupiny. Interference může být způsobena i přítomností myoglobinu nebo hemoglobinu, které absorbují v UV oblasti spektra při 370 nm (Levine a kol. 1990, Dalle-Donne a kol. 2003A). Dalším faktorem ovlivňujícím stanovení je přítomnost volných aldehydů a ketonů. Přítomnost volného metylglyoxalu ve vzorku způsobila mnohonásobné zvýšení naměřeného množství karbonylových skupin, než odpovídalo realitě. Methylglyoxal ze vzorků jsem tedy musela odstranit ultracentrifugací za použití kolonek MICROCON.

Metoda SDS-PAGE pro dělení glykované AST již byla na pracovišti optimalizována. Detekce proteinů pomocí **barvicí metody Silver staining** lze využít pro semikvantitativní detekci glykací nebo oxidací vzniklých karbonylových skupin. Enzym AST je komerčně dostupný v poměrně čisté formě (např. Roche Diagnostics, Sigma-Aldrich atd.). SDS-PAGE elektroforézou lze detekovat jak monomery AST, tak jeho glykační produkty. Výsledky získané barvením gelu pomocí Silver Staining měly v mých experimentech vyšší výpovědní hodnotu než při detekci separovaných proteinů imunoblotingem.

Vzorek AST o koncentraci 0,5 mg/ml byl inkubován v přítomnosti glukózy 50 mM, glukózy 50 mM + Cu^{2+} 10 μM , fruktózy 50 mM, fruktózy 50 mM + Cu^{2+} 10 μM a metylglyoxalu 0,5 mM. Barvením proteinových proužků použitím metody Silver Staining měly vzniklé glykační produkty v přítomnosti Frc 50 mM + Cu^{2+} 10 μM po 7 dnech inkubace molekulovou hmotnost tak vysokou, že neprostoupily do gelu. Glykované proteiny u směsí obsahujících fruktózu 50 mM a metylglyoxal 0,5 mM jsem našla v proužku o přibližné molekulové hmotnosti 140 - 145 kDa také již po 7 dnech inkubace. Glykační produkty u činidla Glc 50 mM a Glc 50 mM + Cu^{2+} 10 μM jsem detekovala až po 14 dnech inkubace.

Imunochemická detekce karbonylových skupin po SDS-PAGE ve vzorku AST ještě použita nebyla. Získané proteinové proužky touto metodou se mi hůře hodnotily. Zlepšení některých podmínek v průběhu detekce by mohlo vést k získání lepších výsledků. Po imunoblotingu lze vzniklé karbonylové skupiny separovaných proteinů na PVDF membráně derivatizovat pomocí DNPH s následnou vazbou DNP-protilátek na tyto skupiny (Goto a kol. 1999). Celou detekci usnadňují komerčně dostupné specifické protilátky proti DNP-modifikovaným proteinům (Dalle-Donne a kol. 2003A). Při této analýze jsem použila stejné glykační směsi AST jako při SDS-PAGE elektroforéze s následným barvením Silver Staining. V čase 0 dní inkubace jsem na RTG filmu odečetla proteinové proužky ve všech směsích stejné. Hodnotě asi 41 kDa odpovídá monomer AST a dále zde byly 2 proužky proteinů odpovídající hodnotám 57 a 70 kDa. Další měření jsem provedla po 7 dnech glykace, kde u vzorku AST + Frc 50 mM + Cu^{2+} 10 μM došlo k vymizení bandu odpovídajícímu monomeru AST. Jeho glykací vznikly produkty, které jsem bohužel na RTG membráně nedetekovala. U ostatních směsí jsem 7. den našla pouze monomer AST.

Srovnáním těchto dvou detekcí po proběhlé elektroforéze se výsledky shodovaly u směsi AST + fruktóza + Cu^{2+} . V obou případech nelze detekovat monomer AST a glykační produkty mají velmi vysoké molekulové hmotnosti (> 430 kDa) již 7. den glykace. Pro hodnocení vzniklých AGE produktů bych více preferovala elektroforézu s barvením Silver Staining.

U použitých metod se potvrdilo, že glukóza je nejpomalejším glykačním činidlem. Přídavek Cu^{2+} iontů způsobil mírný nárůst koncentrace karbonylových skupin ve vzorcích stanovovaných spektrofotometricky. Přídavek Cu^{2+} iontů do inkubační směsi obsahující fruktózu rychle vyvolal tvorbu zkřížených vazeb mezi řetězci proteinů. Tyto zřetěžené proteiny měly mnohem vyšší molekulovou hmotnost než parentní bílkovina, což bylo patrné při SDS-PAGE. K tomuto sřetěžení pravděpodobně došlo kvůli oxidaci fruktózy mědí a tvorbě volných radikálů.

7 Závěr

- 1) Podařilo se mi optimalizovat spektrofotometrickou metodu stanovení karbonylových skupin za použití DNPH jako derivatizačního činidla. Nalezené nejlepší podmínky:
 - A. Rozpouštění proteinové pelety – 0,1 M fosfátový pufr o pH 7,4 s přidavkem azidu sodného (0,05%). Při použití 6 M guanidin hydrochloridu o pH 2,3 došlo ke statisticky významnému snížení množství naměřených karbonylů.
 - B. Koncentrace DNPH – 10 mM
 - C. Délka inkubace vzorku s činidlem DNPH – 60 minut
 - D. Množství proteinu ve vzorku – 1 mg/ml
 - E. Účinek glykačních činidel: z použitých činidel se největší schopnost glykovat modelovou bílkovinu BSA projevila u MGO 0,5 mM, a dále tato aktivita klesala v následujícím pořadí: Frc 50 mM + Cu²⁺ 10 μM > Frc 50 mM > Glc 50 mM + Cu²⁺ 10 μM > Glc 50 mM.
- 2) Při SDS-PAGE s následným barvením stříbrem jsem nesledovala množství karbonylových skupin, ale vznik koncových produktů pokročilé glykace, které způsobily zesílení molekul proteinu AST a vznik vysokomolekulárních agregátů. Tyto agregáty s molekulovou hmotností kolem 140 kDa jsem našla už 7. den inkubace u všech použitých glykačních činidel (Frc 50 mM, Glc 50 mM + Cu²⁺ 10 μM, Glc 50 mM, MGO 0,5 mM) kromě Frc 50 mM + Cu²⁺ 10 μM. U tohoto činidla došlo po sedmi dnech inkubace k tvorbě agregátů vyšších než 400 kDa, které už nebyly schopné migrovat během SDS-PAGE do gelu.
- 3) Při imunoblotingu jsem na RTG filmu 0. den našla dva proužky separovaných proteinů o přibližné molekulové hmotnosti 57 a 70 kDa a monomer AST o molekulové hmotnosti 41 kDa u všech směsích. Po inkubaci 7. dní došlo ke vzniku glykačních produktů u směsi AST s Frc 50 mM + Cu²⁺ 10 μM a band odpovídající monomeru AST v této směsi vymizel. U zbylých směsí jsou na RTG filmu 7. den inkubace patrné jen proužky odpovídající monomeru AST.

8 Seznam použitých zkratk

3-DG	3-deoxyglukozón
12/15 LO	12- a 15-lipoxygenáza
AGE	produkty pozdní glykace (advanced glycation and-products)
Ab	protilátka
AR	aldózareduktáza
AST	aspartátaminotransferáza
ATP	adenosintrifosfát
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumin)
CEL	N ϵ -karboxyethyllysin
CML	N ϵ -karboxymethyllysin
DAG	diacylglycerol
DM	diabetes mellitus
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNPB	2,4-dinitrofenylhydrazín
GO	glyoxal
GOLD	glyoxal-derived lysine dimer
HNE	4-hydroxynonenal
ICAM	1 intracelulární adhezivní molekula
IL 1 α , 6	interleukiny
INF- γ	interferon γ
LDL	low density lipoproteid
MDA	malondialdehyd
MGO	metylglyoxal
MOLD	metylglyoxal-derived lysine dimer
MSR	makrofágový scavenger receptor
MRX	(8-hydroxy-5-methyl-dihydrothiazolo(3,2- α)pyridinium-3-carboxylate
NADP ⁺	nikotinamidadeninukleotid fosfát (oxidovaná forma)
NADPH	nikotinamid deninukleotid fosfát (redukovaná forma)
NF- κ B	nukleární faktor κ B
PAI-1	plasminogena activator inhibitor 1
PKC	proteinkináza C

RAGE	receptor produktu pozdní glykace (receptor of advanced glycation end-products)
RCS	reaktivní karbonylové sloučeniny
ROS	reaktivní kyslíkové radikály (reactive oxygen species)
RNS	reaktivní dusíkové radikály (reactive nitrogen species)
SD	směrodatná odchylka
SDH	sorbitoldehydrogenáza
SOD	superoxiddismutáza
TGF- β 2	transformující růstový faktor β 2, (transforming growth factor)
TNF α	tumor nekrotizující faktor α
VCAM-1	cévní buněčná adhezivní molekula (vascular cell adhesion molecule 1)

9 Použitá literatura

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

Anděl M, Brunerová L, Novák J, Hašpicová M, Trešlová L (2007): Diabetes mellitus: současný pohled na patogenezi, klasifikaci a léčbu. *Neurol. pro praxi* 1: 49-54.

Berková M, Berka Z (2003): Srdce a diabetes mellitus. *Interní Med Prax* 3: 120-125.

Brownlee M (2000): Negative consequences of glycation. *Metabolism* 49(2): 9-13.

Capote FP, Sanchez JC (2009): Strategies for proteomic analysis of non-enzymatically glycated proteins. *Mass Spectrom Rev* 28: 135-146.

Catalá A (2009): Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Phys Lipids* 157: 1–11.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R (2003A): Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 329: 23-38.

Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A (2003B): Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 9(4): 169-176.

Ďuračková Z (1998): Volné radikály a antioxidanty v medicíne (I), 1. vyd., Slovak Academic Press, str. 77-81, 88-107.

Firuzi O, Fuksa L, Spadaro C, Bousová I, Riccieri V, Spadaro A, Petrucci R, Marrosu G, Saso L (2006): Oxidative stress parameters in different systemic rheumatic diseases. *J Pharm Pharmacol* 58(7):951-7.

Gleissner CA, Galkina E, Nadler JL, Ley K (2007): Mechanisms by which diabetes increases cardiovascular disease. *Drug Discov Today Dis Mech* 4(3): 131-140.

Goto S, Nakamura A, Radak Z, Nakamoto H, Takahashi R, Yasuda K, Sakurai Y, Ishii N (1999): Carbonylated proteins in aging and exercise: immunoblot approach. *Mechanisms of ageing and development* 107: 245-253.

Huijberts MSP, Schaper NC, Schalkwijk CG (2008): Advanced glycation end products and diabetic foot disease. *Diabetes-Metab Res Rev* 24(1): S19-S24.

Chakravarti B, Chakravarti DN (2007): Oxidative modification of proteins: Age-related changes. *Gerontology* 53: 128-139.

Jakuš V (2000): The role of free radicals, oxidative stress and antioxidant systems in diabetic vascular disease. *Bratisl. Lek. Listy* 101(10): 541-551.

Janebová M, Zima T, Tesař V (1999): AGEs - produkty pokročilé glykace, advanced glycation (glycosylation) end-products. *Remedia* 9(2): 94-103.

Ledvina M, Stoklasová A, Cerman J (2005): *Biochemie pro studující medicíny* 1. díl, 1. vyd., Nakladatelství Karolinum, str: 220-221.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186: 464-478.

Lushchak VI (2007): Free radical oxidation of proteins and its relationship with functional state of organisms. *Biochem-Moscow* 72(8): 809-827.

Monnier VM, Musata GT, Biemel KL, Reihel O, Lederer MO, Zhenyu D, Sell DR (2005): Cross-linking of the extracellular matrix by the Maillard reaction in aging and diabetes. *Ann NY Acad Sci* 1043: 533-544.

Moravcová E, Bednařík J (2006): Diabetická neuropatie. *Neurol. pro praxi* 2: 99-103.

Nguyen CV (2006): Toxicity of AGEs generated from the Maillard reaction: On the relationship of food-AGEs and biological-AGEs. *Mol Nutr Food Res* 50: 1140-1149.

Obšil T, Pavlíček Z (1997): Glykace proteinu a fosfolipidu: Maillardova reakce *in vivo*. *Chem Listy* 91:558-69

Osuna AIL, Clamont GR, Moreno LV (2008): Characterization of bovine serum albumin glycated with glucose, galactose and lactose. *Acta Biochim Pol* 55(3): 491-497.

Paulová H, Bochořáková H, Táborská E (2004): Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*. *Chem Listy* 98: 174-179.

Prázný M (2008): Kardiovaskulární důsledky diabetes mellitus a jejich prevence. *Med. pro praxi* 5(6): 240-244.

Racek J et al. (2006): *Klinická biochemie*, 2. vyd., Nakladatelství Galén, str: 163-171.

Racek J, Holeček V (1999): Enzymy a volné radikály. *Chem Listy* 93: 774-780.

Rahbar S, Figarola JL (2003): Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys* 419: 63-79.

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

Sosna T. (2008): Farmakoterapie diabetické retinopatie. *Interní Med.* 10(11): 511-516.

Štípek Stanislav a kolektiv (2000): Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci, 1. vyd., Grada Publishing, str. 167–172.

Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS (1999): Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J* 344: 109-116.

Ulrich P, Cerami A (2001): Protein glycation, diabetes and aging. *Recent Prog Horm Res* 56:1-21.

Yan LJ, Traber MG, Kobuchi H, Matsugo S, Tritschler HJ, Packer L (1996): Efficacy of Hypochlorous Acid Scavengers in the Prevention of Protein Carbonyl Formation. *Arch Biochem Biophys* 327(2): 330-334.