

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Mgr. Eliška Bacílková

Školitel: PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Název práce: Optimalizace elektroforetických metod pro studium glykace aspartátaminotransferasy methylglyoxalem

Hlavní náplní této práce byla optimalizace podmínek několika elektroforetických metod pro sledování průběhu glykace aspartátaminotransferasy (AST) methylglyoxalem a vlivu vybraných antioxidantů na tento proces. Za použití denaturující elektroforézy (SDS-PAGE) a Western blottingu jsem sledovala vznik vysokomolekulárních agregátů proteinu a pomocí nativní PAGE změny v náboji molekuly AST během glykace. U obou typů elektroforézy jsem hledala vhodnou koncentraci separačního gelu a množství nanášené bílkoviny. Dále jsem porovnávala tři běžně používané barvicí metody (Silver Staining, Coomassie Blue R-250 a G-250). Zjistila jsem, že se stoupající koncentrací methylglyoxalu dochází k tvorbě vysokomolekulárních agregátů s molekulovou hmotností kolem 130 a 160 kDa, což odpovídá tri- a tetramerům AST. Při imunochemické detekci jsem detekovala glykační produkty především s molekulovou hmotností kolem 70 a 130 kDa, při vyšších koncentracích methylglyoxalu s molekulovou hmotností kolem 160 kDa. Glykace methylglyoxalem způsobila progresivní ztrátu kladných nábojů v molekule AST, což se projevilo zvýšenou migrací těchto vzorků při nativní PAGE. Nejcitlivější barvicí metodou byl Silver Staining. Barvení pomocí koloidního Coomassie Blue G-250 je citlivější a rychlejší než pomocí R-250. Ze studovaných antioxidantů měl největší protektivní účinek aminoguanidin. Kyselina hydroxycitronová bránila glykaci jen částečně, zatímco kyselina močová neměla žádný pozitivní účinek. Podařilo se optimalizovat elektroforetické metody, které se dále využijí pro studium látek s potenciálními antiglykačními vlastnostmi v *in vitro* modelu glykace bílkovin.