

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

OXIDAČNÍ POŠKOZENÍ PROTEINŮ

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Hradec Králové 2010

Jana Bártová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

Děkuji PharmDr. Ivě Boušové, Ph.D. za její ochotu, trpělivost a podnětné připomínky při zpracování této práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Jana Bártová

Školitel: PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Název diplomové práce: Oxidační poškození proteinů

Kyselina chlorná je silné oxidační činidlo, které využívají fagocytující buňky k usmrcení pohlcené bakterie. Pokud dojde k vylití obsahu fagocytu do okolí, může dojít k poškození okolních struktur včetně proteinů. Katechiny patří do skupiny flavonoidů, jejichž antioxidační vlastnosti byly demonstrovány v mnoha studiích. Moje diplomová práce byla zaměřená na potenciální vliv osmi přírodních derivátů katechinu na oxidační poškození lidského sérového albuminu (HSA) kyselinou chlornou. Použila jsem dvě spektrofotometrické (stanovení karbonylů a chloraminů) a tři elektroforetické metody (nativní PAGE, SDS-PAGE, imunoblotting). Při stanovení chloraminů jsem sledovala závislost účinku antioxidantu na jeho koncentraci (0-3 mM) a ze získaných dat jsem pomocí programu GraphPad Prism vypočítala hodnoty EC_{50} pro jednotlivé katechiny. Nejúčinnější sloučeninou byl katechin, jehož EC_{50} byla 4,8 μ M. Z výsledků vyplývá, že antioxidační schopnost klesá s rostoucím počtem hydroxylových skupin v molekule flavonoidu. Karbonylové skupiny jsou vhodným markerem probíhající oxidace proteinu. Nejsilnější protektivní účinek měl katechin, který byl v koncentraci 100 μ M schopen snížit vznik karbonylových skupin o 70,2% ve srovnání s oxidovanou kontrolou. Některé deriváty měly spíše prooxidační účinek (epikatechin). Nepodařilo se mi ani potvrdit vliv oxidace HSA na jeho relativní mobilitu (nativní PAGE) ani jsem nepozorovala agregaci či fragmentaci HSA (SDS-PAGE). Při imunoblottingu jsem u oxidovaných vzorků našla několik proužků obsahujících karbonylové skupiny (66, 140, 200 a > 250 kDa), ale stejné proužky byly přítomné i v nativní kontrole.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Jana Bártová

Supervisor: PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Oxidative damage to proteins

Hypochlorous acid is a strong oxidant, which is used by phagocytic cells to kill ingested bacteria. Surrounding structures including proteins may be damaged in case the content of a phagocyte is spilled to the vicinity. Catechins belong to a group of flavonoids whose antioxidant properties were demonstrated in many studies. My diploma thesis was focused on a potential effect of eight naturally occurring derivatives of catechin towards oxidative damage of human serum albumin (HSA) by hypochlorous acid. I used two spectrophotometric (determination of carbonyl groups and chloramines) and three electrophoretic methods (native PAGE, SDS-PAGE, immunoblotting). Dependence of an antioxidant effect on its concentration (0-3 mM) was observed during determination of chloramines and obtained data were used for calculation of EC_{50} values of individual catechins using program GraphPad Prism. The most effective compound was catechin whose EC_{50} was 4.8 μ M. Results suggest that antioxidant ability decreases with increasing number of hydroxyl groups in the molecule of flavonoid. Carbonyl groups are a good marker of ongoing protein oxidation. The strongest protective effect possessed catechin, which was able to decrease formation of carbonyl groups by 70.2% at 100 μ M concentration comparing to oxidized control. Some derivatives had rather pro-oxidative effect (epicatechin). Neither the effect of HSA oxidation on its relative mobility (native PAGE) was confirmed nor the aggregation or fragmentation of HSA (SDS-PAGE) was observed. During immunoblotting I found several band containing carbonyl groups (66, 140, 200 and > 250 kDa) in oxidized samples but the same bands were present also in native control.

OBSAH:

1. ÚVOD.....	1
2. SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ	2
2.1 OXIDAČNÍ STRES	2
2.1.1 Oxidační poškození biomolekul	4
2.1.2 Poškození proteinů.....	5
2.1.3 Kyselina chlorná jako reaktivní forma kyslíku.....	7
2.1.4 RONS jako účinná zbraň fagocytů proti bakteriím a cizím strukturám	9
2.1.5 Projevy oxidačního poškození závislé na věku	11
2.2 ANTIOXIDAČNÍ TERAPIE	12
2.2.1 Současné problémy antioxidační terapie	13
2.2.2 Flavonoidy	16
3. CÍL PRÁCE.....	20
4. MATERIÁL A METODIKA	21
4.1 MATERIÁL.....	21
4.2 PŘÍSTROJE PRO MĚŘENÍ	23
4.3. METODIKA	23
4.3.1 Příprava základních reagensů	23
4.3.1.1 Příprava fosfátového pufru	23
4.3.1.2 Příprava roztoku albuminu	23
4.3.1.3 Příprava roztoků antioxidantů	24
4.3.1.4. Příprava roztoků Troloxu	24
4.3.1.5. Příprava roztoků kyseliny chlorné.....	24
4.3.2 Stanovení chloraminů	25
4.3.2.1 Příprava roztoků pro stanovení chloraminů	26
4.3.2.2. Stanovení chloraminů na mikrotitrační destičce	26
4.3.3 Stanovení karbonylových skupin vznikajících při oxidaci proteinů.....	28
4.3.3.1 Příprava roztoků pro stanovení karbonylů	29
4.3.3.2. Příprava inkubačních směsí.....	30
4.3.3.3. Postup a podmínky stanovení.....	31
4.3.3.4 Stanovení bílkoviny metodou Bradfordové	32

4.3.4 Polyakrylamidová gelová elektroforesa (PAGE) a imunoblotting	33
4.3.4.1 Příprava roztoků pro nativní PAGE	33
4.3.4.2 Příprava roztoků pro SDS-PAGE.....	35
4.3.4.3 Příprava roztoků pro imunoblotting	35
4.3.4.4 Příprava gelů pro nativní a SDS-PAGE	37
4.3.4.5 Příprava barvicích roztoků	38
4.3.4.6 Příprava inkubačních směsí pro nativní a SDS-PAGE	38
4.3.4.7 Příprava inkubačních směsí pro imunoblotting.....	41
4.3.4.8 Podmínky provedení elektroforesy a jednotlivých barvení.....	42
5. VÝSLEDKY	47
5.1 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ CHLORAMINŮ.....	48
Katechin 49	
Epikatechin	50
Gallokatechin	51
Epigallokatechin	52
Katechingallát	53
Epikatechingallát	54
Gallokatechingallát	55
Epigallokatechingallát	56
5.2 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ KARBONYLOVÝCH SKUPIN.....	58
Katechin 59	
Epikatechin	59
Gallokatechin	60
Epigallokatechin	60
Katechingallát	61
Epikatechingallát	61
Gallokatechingallát	62
Epigallokatechingallát	62
5.3 ELEKTROFORESA A IMUNOBLOTTING	63
5.3.1 Nativní PAGE.....	63
5.3.2 SDS-PAGE a Imunoblotting.....	72

6. DISKUZE	77
7. ZÁVĚR	81
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	82
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	85

1. ÚVOD

Tato diplomová práce vznikla pod vedením PharmDr. Ivy Boušové, Ph.D. na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové, kde se již delší dobu výzkumná skupina profesora Dršaty zabývá problematikou oxidačního poškození proteinů a možností ovlivnění tohoto procesu antioxidanty *in vitro*.

Oxidační stres je všeobecně chápán jako příčina mnoha akutních i chronických onemocnění a jako děj doprovázející přirozené stárnutí organismu. V dnešní době je na poli výzkumu snaha oxidační stres ovlivnit, ať už chemickými substancemi nebo substancemi čistě přírodního původu a tím ovlivnit celkové riziko civilizačních chorob jako je např. infarkt myokardu nebo zvýšená hladina cholesterolu. Klinické studie využívají antioxidanty jako součást léčby kardiovaskulárních onemocnění, ale je nutné podotknout, že antioxidanty nelze považovat za „elixíry života ani za všelék“. Klinické studie neprokázaly ve všech případech např. pozitivní vliv antioxidantů na zmírnění procesu aterosklerosy. Nahlížela bych na to tak, že biochemické pochody v lidském těle jsou velmi komplikované a povaha antioxidantů je někdy nevyzpytatelná a může mít i prooxidační charakter. Proto se zde nabízí nutnost hlubšího poznání a prozkoumání všech účinků antioxidantů na jednotlivé biochemické pochody.

V průběhu experimentů jsem spektrofotometrickou a elektroforetickou metodou sledovala vliv jednotlivých antioxidantů na modifikaci modelové molekuly albuminu (HSA) vlivem oxidačního činidla HOCl. Hlavním záměrem této práce bylo sledování potenciálního antioxidačního účinku katechinů v různých koncentracích.

2. SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ

2.1 Oxidační stres

Náplní mé diplomové práce bylo sledování a hodnocení vlivu některých antioxidantů na oxidační poškození proteinů, a proto se v úvodu této kapitoly krátce zmíním o oxidačním stresu a antioxidační terapii.

Na vzniku řady onemocnění se podílí patologický nárůst reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species – ROS) a dusíku (reactive nitrogen species – RNS) v organismu souhrnně označovaných jako RONS (reactive oxygen and nitrogen species). Mezi ROS se řadí především superoxid, peroxid vodíku, hydroxylový radikál a singletový kyslík a mezi RNS oxid dusnatý a peroxyinitrit (Beneš 2008).

RONS se dostávají do organismu zvenčí, velké množství však vzniká i v průběhu metabolismu. Podle toho rozdělujeme příčiny vzniku RONS na exogenní (ionizující záření, UV-světlo, vysoký obsah škodlivin ve vzduchu, kouření, potrava.....) a endogenní (vznik kyseliny močové, rozpad fagocytů a makrofágů, hyperglykémie, reperfuze po předchozí ischemii....) (Racek 2003).

Oxidační stres je definován jako porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním ROS a RNS z organismu. Mezi příčiny se řadí nadměrná tvorba RONS, nedostatečná činnost antioxidačního ochranného systému nebo jejich kombinace (Štípek a kol. 2000). RONS hrají důležitou roli v celé řadě patologických procesů (např. nekrosa, apoptosa, hypoxie, ischemie, při zánětech a stárnutí organismu). Je také prokázán vliv radikálů na rozvoj celé řady onemocnění různých orgánových systémů. Některá onemocnění jsou dokonce označována jako volnoradikálová onemocnění a patří mezi ně např. aterosklerosa, revmatoidní artritida, ischemicko-reperfusní stavy, neurodegenerativní onemocnění a rakovina (Boušová 2006).

V souvislosti s oxidačním stresem je třeba zmínit nejen koncové produkty pokročilé glykace (AGE), ale i produkty pokročilé oxidace proteinů (AOPP), které se jim řadou vlastností podobají. Jedná se o proteiny poškozené působením oxidantů obsahujících ve své molekule chlor (kyselina chlorná, chloraminy), které vznikají působením myeloperoxidasy a NADPH-oxidasy z aktivovaných neutrofilů. Mezi AOPP řadíme nejen nízkomolekulární produkty (LMW - low molecular weight) tvořené převážně oxidačně modifikovaným albuminem, ale i vysokomolekulární agregáty (HMW – high

molecular weight) oxidačně modifikovaného albuminu vzniklé prostřednictvím disulfidických můstků a dityrosinových spojení (Kalousová 2004). Některé studie se zabývají přímo analýzou rozdílů ve vlastnostech a výskytu produktů pokročilé glykace a oxidace. Kalousová (2004) v závěru své studie uvádí průkaz využití stanovení parametrů glykace a oxidace u některých onemocnění a jejich komplikací. AOPP označila za marker čistě oxidačního poškození, který popisuje akutnější změny v molekule proteinu, zatímco AGE vzniklé vlivem neenzymové glykace i oxidačního stresu jako marker chronického poškození.

Volné radikály se zaslouží na jedné straně o vznik života na této planetě a na druhé straně, mohou poškodit biologicky důležité molekuly a tím způsobit nefunkčnost buněk, nebo až smrt organismu (Ďuračková 1998).

Reaktivní formy kyslíku však nepůsobí v organismu pouze patologicky, ale mají i své fyziologické funkce, a to především v likvidaci bakterií nebo virů. V lidském organismu jsou antioxidační systémy (katalasa, peroxidasa, chelátory kovů – feritin, transferin), ochranné molekuly se schopností vylučovat RONS (vylučovače – scavengers, lapače – trappers a zhášedče – quenchers) a systémy reparační (peptidasa, fosfolipasa), které zajišťují udržování fyziologických hladin RONS (Beneš 2008).

Biologický poločas volných radikálů bývá velmi krátký, a proto je jejich studium technicky náročné. Sledování radikálových reakcí v organismu je metodicky ještě obtížnější a musí být často nahrazeno měřením jejich následků.

Ukázalo se, že oxidační stres souvisí se zvýšenými hladinami celkového cholesterolu a cholesterolu obsaženého v LDL (low density lipoprotein), s výskytem malých denzních LDL, s poklesem cholesterolu obsaženého v HDL (high density lipoprotein), s porušenou glukózovou tolerancí a DM (diabetes mellitus), s kouřením cigaret, s mírnou hyperhomocysteinémií a s arteriální hypertenzí (Štípek a kol. 2000).

2.1.1 Oxidační poškození biomolekul

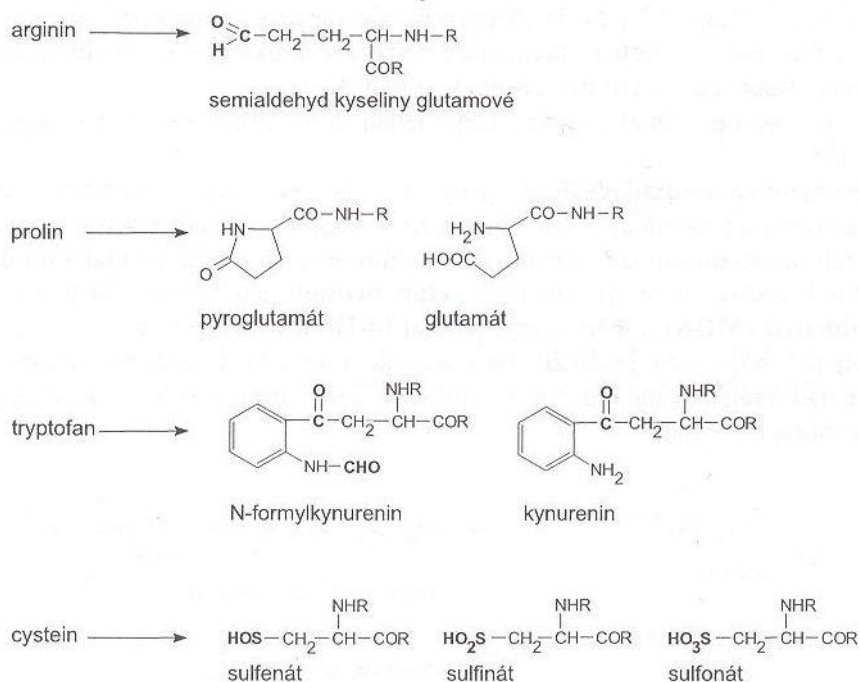
Reaktivními formami kyslíku a dusíku může být atakována většina biomolekul. Příklady poškození jednotlivých druhů biomolekul s následky tohoto poškození uvádím v Tab. 1.

Tab. 1: Hlavní intracelulární cílové struktury pro volné radikály (Štípek a kol. 2000).

Cíl	Poškození	Následky
nenasycené MK v lipidech (PUFA)	ztráta dvojných vazeb, vznik reaktivních metabolitů (peroxydy, aldehydy)	změna fluidity lipidů, změny v propustnosti membrán, vliv na membránově vázané enzymy, tvorba chemoatraktantů pro makrofágy
proteiny	agregace a síťování, fragmentace a štěpení, modifikace SH- skupin a benzenových jader AK, reakce s hemovým železem	změny v transportu iontů, vstup Ca ²⁺ do cytosolu, změny v aktivitě enzymů
DNA	štěpení kruhu deoxyribosy, modifikace a poškození bazí, zlomy řetězce, křížové vazby řetězců	mutace, translační chyby, inhibice proteosyntézy

2.1.2 Poškození proteinů

Významným cílem volných radikálů jsou proteiny. Některé ROS a RNS mohou bezprostředně oxidovat aminokyselinové zbytky (Obr. 1).



Obr. 1: Oxidační modifikace aminokyselin v peptidovém řetězci (Štípek a kol. 2000)

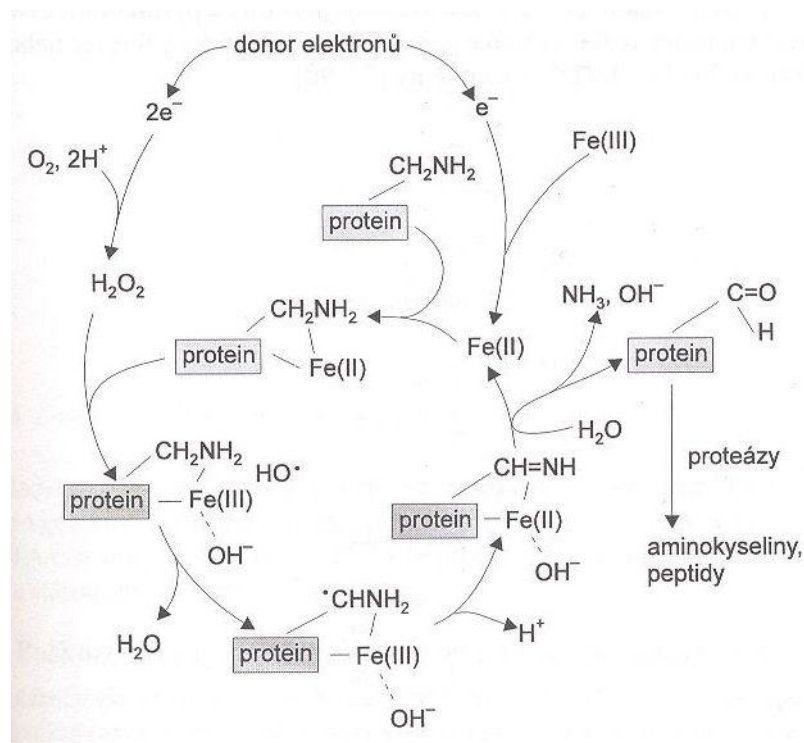
Methionin je účinkem ROS například oxidován na methioninsulfoxid, cystein na kyselinu cysteinovou, tryptofan na kynurenin. Při oxidaci prolinu dojde k otevření pyrolidinového kruhu a k přerušení peptidového řetězce. V tomto případě se neodstartuje řetězová reakce jako při lipoperoxidaci, poškození se však znásobí tím, že proteiny ztratí svou enzymovou, signální nebo transportní funkci.

Řada aminokyselin je hydroxylována hydroxylovým radikálem a nitrována peroxynitritem (tryptofan, fenylalanin, tyrosin). S většinou biomolekul peroxynitrit reaguje pomalu, je selektivním oxidantem. V proteinech tento oxidant mění tyrosin na nitrotyrosin, který je velmi stálý.

S membránovými proteiny a proteiny lipoproteinových částic (LDL, VLDL – very low density lipoprotein) reagují kromě jednoduchých ROS a RNS též alkoxylové a peroxylové radikály lipidů (LO^\bullet , LOO^\bullet) vznikající při lipoperoxidaci. Další produkty lipoperoxidace – reaktivní aldehydy (malondialdehyd, 4-hydroxy-2,3-*trans*-nonenal) –

se kovalentně váží na ϵ -NH₂ lysinu. Následkem toho se proteiny agregují, síťují a stanou se citlivějšími k proteolytické degradaci.

Proteiny jsou poškozovány též železem koordinovaným na jejich strukturu. Lysylový zbytek v proteinu (R-CH₂-NH₂) slouží jako jeden z mnoha ligandů schopných vázat Fe(II), takže katalyzuje Fentonovu reakci, při které vzniká z peroxidu vodíku hydroxylový radikál (HO•). Ten v místě svého vzniku (site specific mechanism) vytvoří z R-CH₂-NH₂ alkylový radikál R•CH-NH₂. Přesun elektronu na Fe(III) regeneruje Fe(II) a z radikálu vznikne skupina R-CH=NH, která se spontánně hydrolyzuje na R-CHO a NH₃ (Obr. 2). Modifikovaný protein je substrátem řady nesespecifických proteas, které ho odstraní.



Obr. 2: Oxidační poškození proteinu v místě navázaného železa (Štípek a kol. 2000)

I řada dalších reakcí přeměňuje aminokyseliny proteinů na karbonylové deriváty. 4-hydroxynonenal (4-HNE) reaguje s histidinem, lysinem a thiolovými skupinami, čímž vnáší do molekuly proteinu karbonylové skupiny (-CO-). Ty vznikají též při glykaci proteinů. Stupeň karbonylace proteinů lze stanovit a použít jako ukazatel oxidačního poškození těchto biomolekul.

Následky těchto reakcí jsou pro funkci buněk velmi závažné. Enzymy mění svou aktivitu, pumpy neudrží iontovou homeostázu buňky. V cytosolu se hromadí Ca^{2+} , čímž se aktivují proteázy a fosfolipázy.

Modifikace aminokyselin vedou ke vzniku nových antigenních determinant a k autoimunitním reakcím (Štípek a kol. 2000).

2.1.3 Kyselina chlorná jako reaktivní forma kyslíku

Kyselinu chlornou (HClO) syntetizují neutrofilní granulocyty (polymorfonukleáry) pomocí své myeloperoxidasy: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- + \text{H}^+ \longrightarrow \text{HClO} + \text{H}_2\text{O}$.

Kyselina chlorná je silný oxidant. Polymorfonukleáry ho používají spolu s dalšími ROS a RNS jako baktericidní prostředek. Kyselina chlorná může být dalším zdrojem HO^\bullet po reakci se superoxidem: $\text{HClO} + \text{O}_2^{\bullet -} \longrightarrow \text{HO}^\bullet + \text{Cl}^- + \text{O}_2$.

Ischemie a reperfúze indukuje tvorbu řady cytokinů, které aktivují neutrofilny k produkci superoxidu a kyseliny chlorné a s jejich přispěním a uvolňováním proteas se rozvíjí zánět a bludný kruh oxidačního poškození.

Bronchiální astma se klinicky projevuje jako variabilní a částečně reverzibilní obstrukce dýchacích cest, které jsou obvykle přecitlivělé na alergeny, chemické látky a chladný vzduch. Nyní se astma považuje za chronický zánětlivý proces a neutrofilní infiltrace je pravděpodobně významným faktorem zmíněné hypersenzitivity. Neutrofilny produkují vazokonstrikční mediátory (prostanoidy, leukotrieny) a též reaktivní formy kyslíku (včetně kyseliny chlorné), které rozšiřují zánět.

Dalším reaktivním produktem myeloperoxidasy je kyselina chlorná, která atakuje primární aminokupiny bílkovin za vzniku chloraminů a modifikuje tyrosin na 3-chlorotyrosin. Ten je specifický pro oxidační poškození bílkovinných struktur *in vivo* působením myeloperoxidasy. Při zvýšené produkci NO^\bullet a vzestupu koncentrace $\text{O}_2^{\bullet -}$ dojde k syntéze peroxynitritu (OONO^-). Ten je schopen atakovat lipidy i bílkoviny. Stabilním produktem reakcí *p*-tyrosinu s peroxynitritem je 3-nitrotyrosin, který byl rovněž prokázán v atherosklerotických lézích.

Bylo popsáno několik mechanismů, které se podílejí na zvýšení oxidačního stresu v různých fázích atherogeneze a na urychlení jejího průběhu. V časných stádiích

atherosklerosy (tukové proužky) se asi uplatňují tyrosylové radikály, reaktivní formy dusíkovu (RNS) a aktivita myeloperoxidasy a 15-lipoxygenasy. U intermediárních lézí (fibrózní pláty a preatheromy) je popsán vliv myeloperoxidasy a v případě vyvinutých lézí (atheromy) se na oxidační modifikaci LDL a cévních struktur kromě myeloperoxidasy a 15-lipoxygenasy podílejí také kovové ionty (Cu^+ , Fe^{2+}).

Myeloperoxidasa je vysoce kationtový protein s isoelektrickým bodem vyšším než 10 a může tedy dobře interagovat s negativním nábojem glomerulární bazální membrány. V některých modelech imunokomplexové glomerulonefritidy bylo navíc možno demonstrovat halogenaci glomerulární bazální membrány (inkorporaci značeného jodu v glomerulech). Intrarenální podání myeloperoxidasy, peroxidu vodíku a chloridových iontů vede nejen k přechodnému vzestupu proteinurie, ale s odstupem 4-10 dnů se vyvíjí i proliferativní glomerulonefritida.

Kvantitativně nejvýznamnějším zdrojem reaktivních forem kyslíku mohou být v glomerulech infiltrující neutrofilny a monocyty. Peroxid vodíku může pod vlivem myeloperoxidasy reagovat s chloridy za vzniku vysoce toxické kyseliny chlorné, která je schopna rychle oxidovat různé molekuly a poškozovat mikroorganismy, ale také buňky makroorganismu. Je zřejmé, že v experimentálních modelech glomerulonefritidy charakterizovaných infiltrací glomerulů neutrofilny rozhoduje produkce HOCl z peroxidu vodíku o rozsahu tkáňového poškození. HOCl se rovněž může dále metabolizovat na oxidanty s dlouhým biologickým poločasem – chloraminy.

Protilátky proti myeloperoxidase jsou přítomny u některých nemocných s ANCA (protilátky proti cytoplazmě neutrofilních leukocytů)-pozitivní renální vaskulitidou. Předpokládá se, že by mohly hrát roli v patogenezi glomerulárního poškození u vaskulitidy. Podáním peroxidu vodíku a lyzomálního extraktu bylo možno u potkanů imunizovaných proti myeloperoxidase vyvolat vznik glomerulární trombózy a nekrotizující glomerulonefritidy. Glomerulární poškození u ANCA-pozitivní vaskulitidy je tak zřejmě také vyvoláno zvýšenou glomerulární produkcí volných radikálů (Štípek a kol 2000).

Působením leukocytárního enzymu – myeloperoxidasy – se tvoří chloridový anion, který s peroxidem vodíku dává vysoce reaktivní chlornanové anionty (ClO^-). Část z nich reaguje s nízkomolekulárními aminy za vzniku chloraminů. Chlornany i chloraminy

mají spolu s reaktivními formami kyslíku silný mikrobicidní účinek. Mikrobicidní účinek reaktivních forem kyslíku a dalších metabolitů je zřejmě jejich hlavní funkcí v aktivovaných fagocytech (Štípek a kol. 2000). V případě, že jinak prospěšný proces není pod kontrolou, může dojít k závažným poškozením – ClO^- aktivují proteinasy (např. elastasu) a inhibují antiproteinasy (Ledvina, Stoklasová, Cerman 2006). Deficit myeloperoxidázy může být asymptomatický nebo se projeví zvýšeným sklonem k opakovaným bakteriálním infekcím (Štípek a kol. 2000).

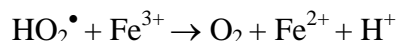
Infiltrace tkání makrofágy nebo aktivace endotelu tak mohou vést ke zvýšené lokální tvorbě reaktivních forem kyslíku, které mohou způsobit nejen destrukci mikrobů, ale i vlastní tkáň. Reaktivní formy kyslíku atakují nukleové kyseliny a modifikují je na nepřírodní deriváty, například 5-hydroxymetyluracil, 8-hydroxyguanin či thyminglykol. Ty pak způsobí vnesení chyb do DNA při replikaci (mutace). Předpokládá se, že takové modifikace DNA mohou mít vztah i ke karcinogenezi. Kromě toho působením reaktivních forem kyslíku vznikají zlomy v molekule DNA. Expozice proteinů reaktivním formám kyslíku změní jejich strukturu včetně antigenicity, jejich stabilitu i funkci. Funkce enzymů se mění zřejmě i v důsledku změny redoxního stavu buňky. Po oxidaci aminokyselin mohou vznikat zkřížené vazby mezi sousedními řetězci bílkovin. Příkladem může být modifikace částic LDL, která hraje důležitou roli v atherogenezi (Štípek a kol. 2000).

2.1.4 RONS jako účinná zbraň fagocytů proti bakteriím a cizím strukturám

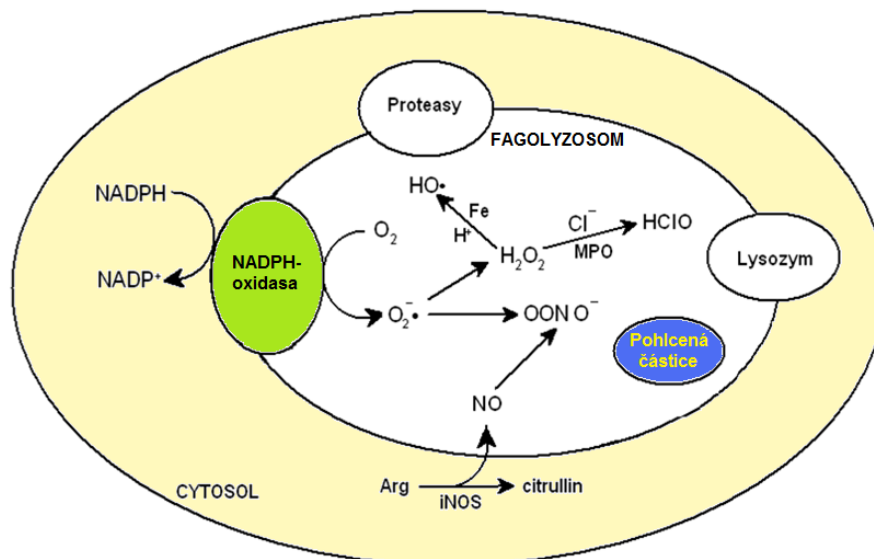
Neutrofilní leukocyty a makrofágy používají reaktivní formy kyslíku k odstraňování zbytků mrtvých buněk a k zabíjení bakterií (Obr. 3). Jejich plazmatická membrána je vybavena enzymovým komplexem NADPH-oxidase, který obsahuje flavocytochrom b_{558} . Tento komplex se po pohlcení cizorodé částice aktivuje a redukuje dioxygen na superoxid. Takto aktivované buňky zvýší spotřebu O_2 (tzv. respirační vzplanutí – respiratory burst), nikoli však činností mitochondrií. Vznikající superoxid se pohotově mění na peroxid vodíku. Kyselé prostředí, které ve fagosomu obstará membránová protonová pumpa, podporuje uvolnění iontů železa z jeho bezpečných zásob, takže je k dispozici pro Fentonovu reakci a tvorbu hydroxylového radikálu. U polymorfonukleárních leukocytů po splynutí fagosomu s jinými vakuolami do systému vstoupí ještě myeloperoxidasa, která katalyzuje tvorbu kyseliny chlorné z peroxidu

vodíku a chloridového iontu. Kyselina chlorná může být dalším zdrojem HO^\bullet po reakci se superoxidem: $\text{HClO} + \text{O}_2^{\bullet-} \longrightarrow \text{HO}^\bullet + \text{Cl}^- + \text{O}_2$

Fentonova reakce: v přítomnosti železa reakce peroxidu a superoxidu probíhá velmi snadno, a to ve dvou krocích, nejdříve superoxid zredukuje železo a to pak redukuje peroxid:



V makrofázích, neutrofilech a jiných buňkách je účinkem cytokinů, mikrobů a mikrobiálních produktů stimulována exprese indukovatelné syntasy oxidu dusnatého (iNOS), která je nezávislá na Ca^{2+} , protože kalmodulin je aktivní podjednotkou enzymu. Aktivita iNOS je dána dostupností kofaktorů (tetrahydrobiopterinu, kalmodulinu), substrátu (argininu) a koncentrací (syntézou) enzymu. Jediným zdrojem elektronů, který je třeba k redukcí argininu na NO^\bullet a citrulin, je NADPH, a tak aktivita závisí též na glukosa-6-fosfátdehydrogenase (G6PD). Ve srovnání s konstitutivními enzymy eNOS (endoteliální) a nNOS (neuronální) dokáže indukovatelná iNOS ve svém okolí zvýšit koncentraci NO^\bullet o několik řádů. Ten pak nestačí být odstraněn difuzí do krve a navíc se ve stejné lokalitě vytváří superoxid, takže s ním reaguje na peroxyinitrit, další baktericidní prostředek, který slouží k oxidaci a nitraci cizorodých a za určitých podmínek i vlastních struktur. Popsaná výzbroj makrofágů je určena k destrukci pohlcených částic. Zvláště citliví jsou intracelulární paraziti – Plasmodia a Leishmania, dále pak některé viry, houby a bakterie a také některé nádorové buňky. Defekt NADPH-oxidasy se projeví jako chronická granulomatosa s častými infekcemi kůže, plic, jater a kostí. Zmíněné RONS se uvolní i do extracelulárního prostoru, kde mohou poškodit okolní buněčné a tkáňové struktury (Štípek a kol.2000).



Obr. 3: Schéma fagocytující buňky (upraveno podle Štípek a kol. 2000).

2.1.5 Projevy oxidačního poškození závislé na věku

Pokud je oxidační poškození příčinou stárnutí, lze očekávat, že jeho projevy budou během života jedince stále výraznější. V podstatě byly popsány tři typy oxidačních změn závislých na věku: hromadění konečných produktů oxidačního stresu, modifikace biologických struktur a vyčerpání složek antioxidační ochrany.

Obecnějším kritériem modifikace proteinů je jejich karbonylace. Od mládí do stáří se karbonylace zvýší na 30% z celkové proteinové hotovosti. Vzestup je exponenciální a koreluje se ztrátou aktivity glukosa-6-fosfátdehydrogenasy (G6PD), která je významná pro antioxidační ochranu organismu. Klesá i aktivita mitochondriální akonitasy, enzymu Krebsova cyklu. Ve fibroblastech pacientů s Wernerovým syndromem, projevujícím se předčasným stárnutím, dosahuje karbonylace proteinů úrovně osmdesátiletého člověka bez ohledu na věk pacienta. Modifikace proteinů nejsou jen pasivními ukazateli stárnutí. Enzymy ztrácejí svou aktivitu a jsou lepšími substráty pro degradaci proteasami. Některé modifikace naopak přemění protein v inhibitor proteas odstraňujících nefunkční bílkoviny a jiné (po navázání DOPA) katalyzují redukci kyslíku na superoxid. Modifikace proteinů tak zrychluje stárnutí nejen ztrátou jejich enzymové aktivity, ale též zrychlením metabolismu ROS (Štípek a kol. 2000).

2.2 Antioxidační terapie

Oxidační stres, patologická nerovnováha vzniku RONS a jejich odstraňování, je nedílnou součástí řady nemocí a u některých je i primární příčinou chorobného stavu. Při řadě chorobných stavů dochází nejen k poklesu kapacity antioxidačních systémů, ale i ke zvýšené tvorbě radikálů. Na základě obecných znalostí by se při antioxidační terapii mohly volit dva extrémní přístupy:

1. podávat tyto látky u většiny onemocnění a v celé dostupné šíři, neboť zvýšená tvorba radikálů provází zánět, ischemicko-reperfuční poškození, nádory a procesy stárnutí.
2. nepodávat je vůbec, protože většinou jde o vitaminy a další látky, kterých je ve vyvážené potravě dostatek, a hypovitaminózy jsou u nás vzácné.

Nicméně oba tyto přístupy jsou chybné.

Mnoho experimentálních studií *in vitro* a *in vivo* prokazuje příznivý vliv antioxidantů v různých kombinacích a modelech. Na celém světě proběhlo a stále probíhá mnoho klinických studií s antioxidační terapií lidí. Jejich výsledky nejsou jednoznačné nejspíše proto, že oxidační stres je jen jedním z dějů probíhajících při těchto onemocněních. Sledované parametry jsou závislé i na dalších faktorech. Je obtížné hodnotit účinek antioxidantů jako doplňku ke klasické a standardní terapii (např. operace na otevřeném srdci, léčba akutního infarktu myokardu, diabetes mellitus). Problémem při hodnocení je také srovnání dávky, délky podávání a načasování antioxidační terapie v průběhu léčby onemocnění, které může být významným faktorem úspěchu či neúspěchu antioxidační terapie. Některé klinické studie dokazují, že podáváním antioxidačních látek se sníží riziko vzniku onemocnění nebo se zlepší jeho průběh (ischemická choroba srdeční, aterosklerosa, cévní mozkové příhody, šokový stav, neurologická onemocnění, nádorová bujení, jako je kolorektální karcinom, gynekologické nádory a další). Příznivé účinky byly zaznamenány především po terapii tokoferolem, kyselinou askorbovou, zinkem, selenem, N-acetylcysteinem, dexrazoxanem a probukolem.

Úspěch antioxidační terapie závisí na stupni poznání úlohy volných kyslíkových radikálů v patogenezi dané nemoci. Cílem by mělo být snížit incidenci onemocnění v rámci prevence a při léčbě nemocí pozitivně ovlivnit jejich průběh a rekonvalescenci.

Podání antioxidantů u většiny chorobných stavů není a nebude kauzální terapií, nýbrž jen terapií upravující a vyrovnávající redoxní prostředí buněk (oxidační stres je většinou jen následkem chorobných stavů a RONS jsou efektoři chorobných procesů).

K nejčastěji užívané antioxidační terapii patří kromě jednotlivých antioxidačních vitaminů podávání komplexních multivitaminových přípravků, které někdy obsahují také stopové prvky. Těchto přípravků je na našem trhu celá řada, v rozmanitých kombinacích a v různých lékových formách. Většina z nich obsahuje množství potřebné pro celkovou denní dávku daných složek.

Doplnění vitaminů a stopových prvků je potřebné nejen při jejich nedostatku, ale například při zvýšené tělesné námaze, nepravidelné nebo jednostranné výživě, při zvýšených ztrátách (zvracení, průjmy), v těhotenství, při laktaci a během růstu organismu. V těhotenství je třeba sledovat množství vitaminu A v přípravcích a nepřekračovat denní doporučené dávky příjmu vzhledem k riziku možné teratogenity. Toto riziko je při příjmu mnohonásobně vyšších dávek, než jsou dávky doporučené. Objektivně stanovit hladiny vitaminů a stopových prvků v pacientově organismu je nákladné a obtížné. Plazmatická hladina nemusí korelovat s celkovým množstvím vitaminů v organismu. Jelikož se deficit vitaminů a stopových prvků může podílet na vzniku imunodeficientních stavů, mají polyvitaminové přípravky se stopovými prvky své místo v podpůrné terapii poruch imunity. Tyto přípravky není vhodné užívat dlouhou dobu. Mají sloužit pouze k doplnění a vyrovnání případných nedostatků v organismu, ale vždy je třeba si uvědomit, že nejvhodnějším zdrojem vitaminů a antioxidantů jsou přírodní produkty (Štípek 2000).

2.2.1 Současné problémy antioxidační terapie

Ve vyspělých zemích s dostatečnou výživou je podávání multivitaminových a směsných antioxidačních preparátů většinou zbytečné (Štípek a kol. 2000). Nadměrné potlačení produkce volných radikálů by mohlo ovlivnit i jejich potřebné účinky, ke kterým patří např. likvidace fagocytovaných mikroorganismů či signální působení (Racek 2003). Koncentrace antioxidantů a jejich vzájemná souhra může být při jednostranné suplementaci narušena a její účinek se obrátí ke škodě pacienta.

Na nejednoznačných závěrech klinických studií se podílí celá řada faktorů (Tab. 2):

- 1. Oxidační stres se vyskytuje téměř u všech nemocí,** často však bývá pouze průvodním jevem a v řadě chorobných procesů je jen konečným efektem celého mechanismu. S tímto aspektem je třeba přistupovat ke klinickému použití antioxidantů.
- 2. Podané antioxidanty nemusí proniknout do patřičných kompartmentů,** kde jsou potřebné. Jde nejen o množství, ale především o biologické vlastnosti dané látky (např. enzymy nepronikají přes buněčnou stěnu).
- 3. Nebylo použito „adekvátních“ antioxidantů.** Inhibitory lipoperoxidace nezabrání radikálovému poškození DNA. Je nutná vyváženost antioxidantů při jejich kombinovaném podání, odpovídající mechanismus jejich účinku.
- 4. Antioxidanty nebyly při studiích vždy podávány dostatečně dlouho, v potřebném množství a ve správném čase.**

Většina klinických studií zatím končí závěrem, že je třeba dané výsledky podpořit studií většího souboru a dalšími důkazy pro sledovaný jev. U prospektivních velkých studiích je problémem homogenita souboru vzhledem k antioxidační výbavě jednotlivců, což je zřejmé z rozdílných výsledků studií v USA a Evropě proti výsledkům v Indii a Číně. V budoucnosti by se mělo dávkování „preventivních“ antioxidantů řídit podle kapacity jednotlivých součástí antioxidačního systému každého jedince (Štípek a kol. 2000).

Tab. 2: Vliv antioxidační terapie na vybrané nemoci (Štípek a kol. 2000)

<i>Onemocnění</i>	<i>Antioxidant</i>	<i>Úspěšnost</i>
kardiovaskulární onemocnění	karotenoidy	–
	askorbát	±
	tokoferoly	+
	selen	±
	probukol	+
	flavonoidy	±
nádory	karotenoidy	–
	tokoferoly	±
	selen	±
	flavonoidy	±
ischemicko-reperfuční poškození	SOD	±
	kyselina lipoová	±
	alopurinol	±
syndrom dechové tísně	SOD	+
retrolentální fibroplazie	tokoferoly	+
bronchopulmonální dysplazie	askorbát	+
intravaskulární hemoragie	tokoferoly	+
	askorbát	+
transplantace	SOD	+
hepatoprotekce	kyselina lipoová	±
	silymarin	±
kloubní postižení	SOD	±
	penicilamin	+
fotosenzibilizující nemoci	karotenoidy	++
UV záření	karotenoidy	++
katarakta	tokoferoly	+
nachlazení	askorbát	±
parkinsonismus	tokoferoly	±
Wilsonova choroba	penicilamin	++
hemochromatóza	deferoxamin	++
plicní nemoci	N-acetylcystein	+
intoxikace paracetamolem	N-acetylcystein	++
subarachnoidální krvácení	lazaroidy	±
traumatické poškození hlavy	lazaroidy	±
nespecifické střevní záněty	5-aminosalicyláty	+

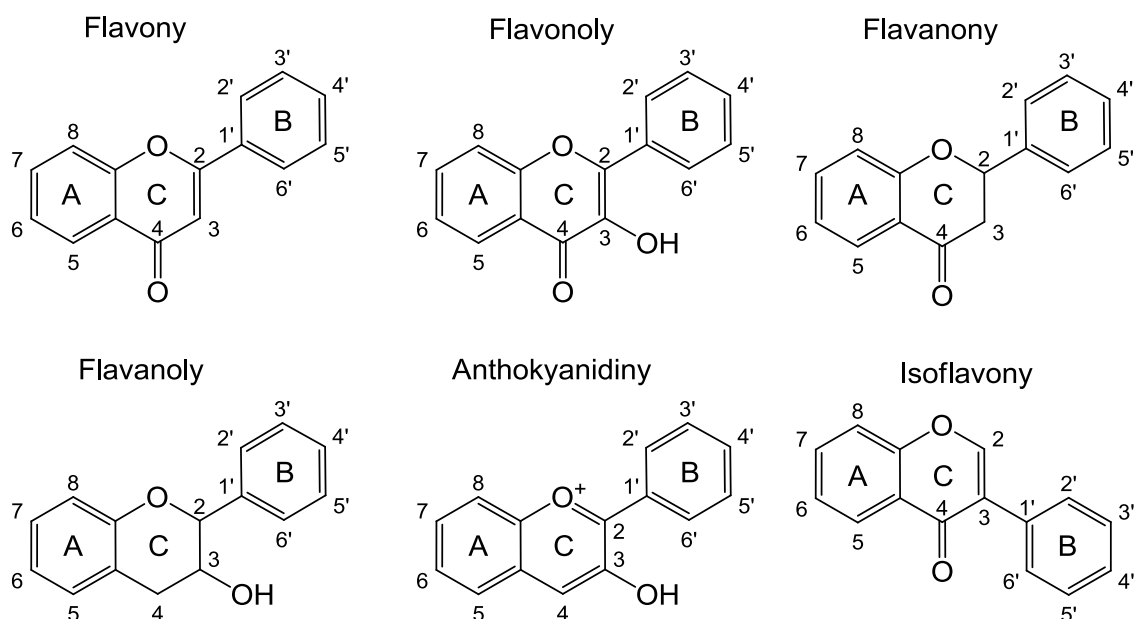
Oxidační poškození organismu je velmi složitý proces a cílem léčby má být ochrana organismu před všemi potenciálními mechanismy poškození. V případě antioxidantů je to úprava redoxního stavu buňky a organismu. Prostředkem by nemělo být preventivní či terapeutické podání „všeho, co je k dispozici“, ale spíše použití léků zasahujících hlavní příčinu oxidoredukční dysbalance, od které jsou další projevy

oxidačního stresu odvozeny. U přirozených antioxidantů je velmi obtížné stanovit jejich doporučený denní příjem, který bude odlišný teritoriálně a podle pohlaví (Štípek a kol. 2000). Antioxidační ochrana organismu představuje složitý komplex mechanismů, které pracují ve vzájemné souhře, doplňují se a mnohdy i potencují, navíc musejí být v rovnováze s prooxidačními látkami, tedy s produkcí volných radikálů (Racek 2003).

Antioxidanty jsou nezbytné pro lidský život, ale nejsou to elixíry života. Jejich vztahy zatím nebyly zcela pochopeny a klinicky ověřeny. Lze očekávat, že v budoucnosti budou objevovány a také syntetizovány nové antioxidační látky. Je nezbytné nejdříve vypracovat metody k dostatečnému vyšetření oxidoredukčního stavu organismu. Teprve pak bude možné sestavit individuální, účinnou a cílenou kombinaci antioxidantů. Dosavadní nejčastěji nabízené kombinace tokoferolu, askorbátu, β -karotenu a selenu jsou spíše empirické postupy, poněkud předbíhající kauzální terapii a prevenci oxidačního stresu (Štípek a kol. 2000).

2.2.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou polyfenolové látky, které jsou velmi rozšířené v rostlinné říši. Zahrnují okolo 4000 různých derivátů a jejich seznam se stále rozrůstá. K základním strukturám flavonoidů patří: flavany, flavony, flavanony, flavonoly, anthokyanidiny a isoflavony (Obr. 4). Flavonoidy se v potravě vyskytují buď jako monomery (kvercetin, katechin), jejich glykosidy anebo monomery polymerizované na prokyanidiny (Ďuračková 2008). Jejich struktura je výhodná pro tvorbu chinoidních struktur a tedy pro jednoelektronové oxidoredukce. Mají aromatický charakter molekuly, odvozený od 2-fenylchromonu.



Obr. 4: Základní strukturální třídy flavonoidů.

Jsou schopné vázat přechodné kovy, indukovat a ovlivňovat některé enzymy (aryl- a epoxid-hydroxylasy, proteinkinasu C), inhibovat xanthinoxidasu, lipoxygenasu a lipoperoxidaci (Štípek 2000). Mezi antioxidační účinností a strukturou flavonoidů byly zjištěny následující závislosti: nezbytná je přítomnost hydroxylových skupin na kruhu B v o-poloze a dvojná vazba mezi 2. a 3. uhlíkem, v konjugaci s karbonylovou skupinou v poloze 4. Pro maximální účinnost je potřebná dodatečná přítomnost hydroxylových skupin v polohách 3 a 5 (Spilková, Dušek 1996). Konzumace potravy bohaté na flavonoidy je spojována se snížením výskytu anebo zlepšením stavu kardiovaskulárních onemocnění, infarktu myokardu, rakoviny, neurodegenerativních onemocnění, psychických poruch a jiných chronických onemocnění. V patologii těchto onemocnění, kromě jiného, hraje důležitou roli oxidační stres. V laboratorních experimentech (*in vitro*) vykazují flavonoidy významnou antioxidační schopnost. Ta je často vyšší než antioxidační schopnost známých antioxidantů jako je vitamin C a E. Antioxidační schopnost flavonoidů v organismu (*in vivo*) se nemá šanci uplatnit, protože absorpce flavonoidů z potravy je relativně nízká. Jejich hladina v plazmě je řádově nižší než je hladina jiných antioxidantů - vitamin C, E (Ďuračková 2008). Flavonoidy mají protizánětlivý, protisklerotický a protinádorový účinek, působí jak v hydrofilním, tak lipofilním prostředí. Epidemiologické studie prokazují negativní korelaci mezi příjmem

flavonoidů a mortalitou na akutní infarkt myokardu a jedna ze 3 studií i pokles rizika vzniku nádorů. Flavonoidy zlepšují mikrocirkulaci u chronické žilní insuficience. Isoflavonoidy však neovlivnily koncentraci lipidů v séru.

Tzv. „francouzský paradox“ (tj. snížená mortalita na kardiovaskulární nemoci pijáků červeného vína ve Francii je vysvětlován vysokým obsahem flavonoidů v červeném víně (resveratrol a quercetin) a jejich antisklerotickým účinkem (ochrana před oxidací LDL-částic). Studie *in vitro* prokázaly vysokou antioxidační kapacitu červených vín, ale tato hodnota závisí na druhu vína, vinařské oblasti a možná i na ročníku sklizně (Štípek 2000).

Významným zdrojem polyfenolových látek jsou čaje. Jak zelený, tak černý čaj nacházejí svůj původ v rostlině *Thea sinensis* (*Theaceae*). Avšak rozdílný způsob zpracování vede k odlišným výsledným produktům. Lístky na přípravu černého čaje se zpracovávají při teplotě okolo 40°C, nechá se v nich proběhnout proces oxidace a fermentace, čímž čaj získává černou barvu. Při přípravě zeleného čaje se lístky nejprve jemně zahřejí, čímž se zničí enzymy – oxidasy rozkládající polyfenolové látky přítomné v lístcích čajovníku. Proces oxidace se tím zastaví a lístky si zachovávají svojí zelenou barvu, ale i vysoký obsah polyfenolových látek. Bohužel, při různém zpracování se mohou více či méně odbourat polyfenoly přítomné v lístcích. V černém čaji je jejich obsah v porovnání se zeleným menší. Mezi polyfenolové látky, vyskytující se v čajích patří: epikatechin (EC), epikatechingalát (ECg), epigalokatechin (EGC) a epigalokatechingalát (EGCg). EGCg je hlavní katechin v čaji a představuje 50 – 80% všech katechinů. Složky čajů mohou vychytávat volné radikály a reaktivní metabolity, které způsobují poškození membránových lipidů, proteinů a nukleových kyselin. Vychytávací schopnost antioxidantů v zeleném čaji je větší než v černém. Dále čaje obsahují i antioxidačně působící vitamin C a selen. Významné antioxidační a protirakovinné účinky zeleného čaje se připisují přítomné látce EGCg, která má schopnost přeměnit chemické karcinogeny na neaktivní molekuly. Kromě antioxidační aktivity a preventivního účinku proti rakovině se zjistil u zeleného čaje ještě pozitivní vliv např. na kůži, na hladinu cholesterolu a krevního tlaku, jako ochrana při kardiovaskulárních onemocněních, virových onemocněních, zánětech dásní a osteoporóze. Polyfenoly z čaje též inhibují oxidaci LDL, ale nepotvrdilo se to ve všech studiích (Ďuračková 2008).

Zjistilo se, že zelený a černý čaj mohou inhibovat *in vitro* oxidaci lipoproteinů indukovanou Cu^{2+} ionty. Aktivita katechinů zeleného čaje v těchto pokusech klesala v pořadí: EGCg = ECg > EC = C > EGC. Kromě toho zelený čaj inhibuje oxidaci cholesterolu a snižuje koncentraci kyseliny linoleové a kyseliny arachidonové, tvorbu malondialdehydu jako markeru poškození lipidů, koncentraci peroxidů v plazmě, tvorbu superoxidu a redukuje též aktivitu glutathionperoxidasy v lymfocytech (Basu a Lucas 2007).

Ochranný účinek polyfenolů čaje proti oxidaci lipoproteinů a snížení koncentrace cholesterolu může mít preventivní účinek proti aterosklerose a jiným kardiovaskulárním onemocněním. Základní mechanismus prospěšného efektu čajů spočívá v jeho antioxidačním, antitrombogenním a protizánětlivým účinkem a snižování hladiny lipidů. Zelený čaj zlepšuje elasticitu cév a endotelové funkce (Khan a Mukhtar 2007). Studie ukazují, že katechiny zeleného čaje s obsahem 200 – 300 mg EGCg (odpovídá 5 – 6 šálkům denně) mají prospěšný účinek proti kardiovaskulárním onemocněním (Wolfram 2007). Za určitých podmínek můžou katechiny podléhat autooxidaci a chovat se jako prooxidanty (Ďuračková 2008).

3. CÍL PRÁCE

- 1) Sledování účinku osmi derivátů katechinu na vznik chloraminů při oxidaci lidského sérového albuminu (HSA) kyselinou chlornou.
 - a) získání hodnoty EC_{50}

- 2) Stanovení vzniku karbonylových skupin při oxidaci HSA kyselinou chlornou pomocí spektrofotometrické metody.
 - a) hledání vhodné koncentrace $HOCl$ u tohoto stanovení
 - b) vliv derivátů katechinu na vznik karbonylových skupin

- 3) Sledování průběhu oxidace HSA kyselinou chlornou pomocí elektroforetických metod (nativní PAGE, SDS-PAGE) a vlivu katechinů na vznik karbonylových skupin sledovaný pomocí imunoblottingu.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1 Materiál

Lidský sérový albumin (HSA), 96-99%	Sigma-Aldrich
Kyselina chlorná (roztok NaOCl), 6-14%	Riedel-de Haën
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, p.a.	Penta
Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, p.a.	Penta
(-)-Katechin (C), $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich
(-)-Epikatechin (EC), $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich
(-)-Gallokatechin (GC), $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich
(-)-Epigallokatechin (EGC), $\geq 95\%$	Sigma-Aldrich
(-)-Katechingallát (CG), $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich
(-)-Epikatechingallát (ECG), $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich
(-)-Gallokatechingallát (GCG), $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich
(-)-Epigallokatechingallát (EGCG), $\geq 95\%$	Sigma-Aldrich
6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina (Trolox), 97%	Aldrich
Methanol, p.a.	Penta
5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina) (DTNB)	Sigma-Aldrich
2,4-dinitrofenylhydrazin (DNPH)	Aldrich
Kyselina trichloroctová (TCA)	Sigma-Aldrich
Ethanol, 96%	Dr. Kulich Pharma
Ethylester kyseliny octové, p.a.	Lachema
Bradfordovo činidlo (stanovení koncentrace proteinů)	Sigma-Aldrich
Kyselina chlorovodíková, 35%	Lachner
Redestilovaná voda	Katedra biochem. věd
Akrylamid (AA)	Sigma-Aldrich
N,N'-methylenbisakrylamid (bisAA)	Sigma-Aldrich
Tris-(hydroxymethyl)aminometan (Tris), $\geq 99,8\%$	Sigma-Aldrich
Bromfenolová modř (BFB)	Riedel-de Haën

Glycin, 99%	Sigma-Aldrich
Glycerol, 85%	Dr. Kulich Pharma
Isobutanol (2-butanol)	Merck
Persíran amonný, $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck
2-Merkaptoethanol, $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich
Laurylsíran sodný (SDS)	BDH Chemics
Polyoxyethylensorbitanmonolaurát (Tween 20)	Sigma-Aldrich
EZBlue gel staining reagent	Sigma-Aldrich
Lihomethanol (99% kvasný líh, 1% methanolu)	Sklad chemikálií FaFUK
Molekulový marker Precision Plus (All Blue, Unstained)	Bio-Rad
Polyethylenglykol 2000 (PEG)	Sigma-Aldrich
Isopropylalkohol, p.a.	Penta
Hydroxid sodný, p.a.	Lachner
Dusičnan stříbrný, p.a.	Penta
Amoniak – vodný roztok, $\geq 25\%$	Lachema
Formaldehyd, 36-38%	Penta
Kyselina citronová, p.a.	Penta
Chlorid sodný, p.a.	Penta
Chlorid hořečnatý hexahydrát, 99%	Sigma-Aldrich
Odtučněné sušené mléko	Bio-Rad
Immun-Blot PVDF membrána (0,2 μm)	Bio-Rad
Primární monoklonální protilátka rabbit anti-DNP	Abcam
Sekundární polyklonální protilátka s alkalickou fosfatasou (goat anti-rabbit IgG-AP)	Abcam
Kyselina octová, 99%	Lachema
Ponceau S pro elektroforesu	Sigma-Aldrich
RTG film Medix XBU	Foma
Chemiluminiscenční substrát DuoLux pro AP	Vector Laboratories

Negativní vývojka Fomadon LQN	Foma
Univerzální rychloustalovač Fomafix	Foma

4.2 Přístroje pro měření

Digitální analytické váhy CP 225 D, *Sartorius*

Inkubátor *Memmert*

Spektrofotometr Hélios β , *Spectronic Unicam*

čtečka Bio-Rad, Microplate Reader, model 550

Elektroforetická aparatura Mini-Protein III, *BioRad*

pH metr *inoLab* pH Level 2

Programovatelný termomixer Thermomixer Comfort, *Eppendorf*

Laboratorní třepačka s kývavým pohybem Duomax 1030, *Heidolf Instrument*

Ultrazvukový čistič USC200TH, *VWR International*

Mikrocentrifuga 5415 D, *Eppendorf*

Dokumentační systém Gel Doc XR, *Bio-Rad*

4.3. Metodika

4.3.1 Příprava základních reagensů

4.3.1.1 Příprava fosfátového pufru

Při přípravě inkubačních směsí i během jednotlivých měření jsem používala 0,1 M fosfátový pufr o pH 7. Tento pufr jsem připravovala smícháním 390 ml 0,2 M vodného roztoku $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 610 ml 0,2 M vodného roztoku $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a 1000 ml redestilované vody. Vzniklý pufr jsem dokonale promíchala a pomocí pH-metru jsem zkontrolovala pH a v případě potřeby upravila na hodnotu 7.

4.3.1.2 Příprava roztoku albuminu

Inkubační směsi pro měření vycházejí ze zásobních roztoků lidského sérového albuminu (HSA) o koncentraci 0,4 mg/ml (stanovení chloraminů), 0,5 mg/ml (nativní

PAGE, SDS-PAGE a imunoblotting), 1 mg/ml (nativní PAGE) a 2 mg/ml (stanovení karbonylových skupin, nativní PAGE), které jsem připravila rozpuštěním přesné navážky proteinu v odpovídajícím objemu 0,1 M fosfátového pufru o pH 7.

4.3.1.3 Příprava roztoků antioxidantů

Roztoky o koncentraci 10 mM, jsem získala rozpuštěním přesné navážky látky v odpovídajícím množství methanolu. S touto výchozí koncentrací jsem dále pracovala (ředila na nižší koncentrace). Výsledné koncentrace roztoků antioxidantů používané k přípravě inkubačních směsí jsou rozepsány v následující tabulce.

Metoda	Koncentrace roztoku AOX pro přípravu inkubačních směsí					
Stanovení chloraminů	30 μ M	300 μ M	600 μ M	1,2 mM	1,8 mM	2,4 / 3 mM
Stanovení karbonylů	25 μ M	50 μ M	75 μ M	100 μ M	-	-
Imunoblotting	100 μ M	-	-	-	-	-

4.3.1.4. Příprava roztoků Troloxu

Roztoky příslušných koncentrací jsem získala rozpuštěním přesné navážky látky v odpovídajícím množství 0,1 M fosfátového pufru o pH 7. Připravené roztoky jsem uchovávala v lednici.

2,4 mM Trolox : 30,04 mg Troloxu rozpustit v 50 ml fosfátového pufru (stanovení chloraminů).

6 mM Trolox: 75 mg Troloxu rozpustit v 50 ml fosfátového pufru (elektroforéza).

4.3.1.5. Příprava roztoků kyseliny chlorné

Před každým měřením bylo zapotřebí stanovit aktuální koncentraci kyseliny chlorné v zásobním roztoku NaOCl (6-14%) a připravit si výchozí roztok HOCl, z něhož jsem pomocí fosfátového pufru naředila roztoky HOCl příslušné koncentrace. Bližší informace o koncentracích připravovaných roztoků jsem uvedla u jednotlivých stanovení.

Postup stanovení aktuální koncentrace HOCl byl následující: k 9,99 ml destilované vody jsem napipetovala 10 μ l HOCl (desetinásobné množství jsem zvolila

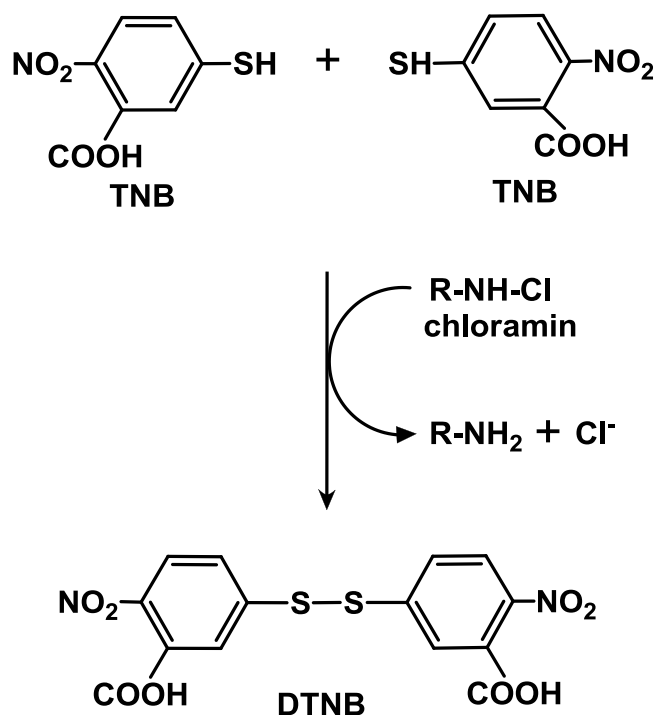
kvůli tomu, abych předešla chybě při pipetování velmi malých objemů) a pomocí 10 M NaOH jsem upravila pH na hodnotu 12. Poté jsem měřila absorbanci A při vlnové délce 292 nm v křemenné kyvetě. Jako slepý vzorek jsem použila roztok NaOH. Z naměřených hodnot absorbance jsem podle tohoto níže uvedeného vzorce vypočítala aktuální koncentraci kyseliny chlorné. Molární absorpční koeficient HOCl je $\epsilon_{292} = 350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

$$c = \frac{A}{\epsilon \times l}$$

- c koncentrace rozpuštěné látky
- A absorbance
- l tloušťka absorbující vrstvy
- ϵ molární absorpční koeficient

4.3.2 Stanovení chloraminů

Stanovení chloraminů jsem provedla na základě metody popsané Thomasem et al. (1986) s některými úpravami (Firuzi et al. 2003). Metoda je založena na reakci chloraminů (R-NH-Cl) s látkou obsahující thiolovou skupinu (5-thio-2-nitrobenzoová kyselina, TNB), při které dochází k oxidaci 2 molekul TNB na 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoovou) kyselinu (DTNB) a tím k úbytku spektrofotometricky stanovitelné TNB. TNB vykazuje intenzivní absorpci světla při 415 nm. Molární absorpční koeficient TNB je $\epsilon_{415} = 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.



4.3.2.1 Příprava roztoků pro stanovení chloraminů

Příprava 2 mM roztoku TNB

Navážku 39,6 mg DTNB jsem rozpustila ve 100 ml 0,1 M fosfátového pufru o pH 7. Upravila jsem pH pomocí 10 M NaOH na hodnotu 12 a po pěti minutách míchání jsem upravila pH zpátky na hodnotu 7 pomocí 2 M HCl. Roztok jsem uchovávala v lednici. Při stanoveních na mikrotitračních destičkách jsem naředila výchozí roztok TNB fosfátovým pufrem na koncentraci 600 μM .

4.3.2.2. Stanovení chloraminů na mikrotitrační destičce

Před každým měřením jsem si stanovila aktuální koncentraci HOCl způsobem výše popsáním a poté jsem připravila 1 mM roztok HOCl. Z tohoto roztoku jsem dále fosfátovým pufrem ředila požadované koncentrace (60-600 μM) podle následující tabulky:

Výchozí koncentrace HOCl [μM]	HOCl 1 mM [μl]	0,1 M fosfátový pufr (pH 7) [μl]	Výsledná koncentrace HOCl [μM]
60	60	940	7,5
120	120	880	15
240	240	760	30
360	360	640	45
480	480	520	60
600	600	400	75

Kalibrační křivka

Do mikrotitrační destičky jsem multikanálovou pipetou napipetovala 150 μl roztoku HSA 0,4 mg/ml (tj. 6 μM roztok), přidala jsem 30 μl HOCl 60-600 μM do všech vzorků kromě kontroly. Od každé koncentrace jsem připravila minimálně triplikát. Do kontrolních vzorků jsem přidala místo HOCl 30 μl fosfátového pufru. Destičku jsem protřepávala na termomixéru Eppendorf 10 minut při 22°C a intenzitě třepání 400 rpm. Dále jsem přidala 30 μl Troloxu 2,4 mM a znovu protřepávala v termomixéru po dobu 5 minut při 22°C. Nakonec jsem přidala 30 μl TNB 600 μM a nechala třepat dalších 5 minut při 22°C. Poté jsem změřila absorbanci při 415 nm na čtečce mikrotitračních destiček Bio-Rad.

Účinek katechinů na vznik chloraminů a získání hodnoty EC₅₀

Postup: Do mikrotitrační destičky jsem napipetovala 10 μl roztoku katechinu (30 μM -3 mM). Pak jsem přidala 150 μl roztoku HSA (výchozí 6 μM roztok) a nechala inkubovat 20 minut. Dále jsem přidala 30 μl HOCl 360 μM . Inkubace trvala 10 minut při 22°C za mírného protřepávání v termomixéru Eppendorf. Do všech vzorků jsem napipetovala 30 μl Troloxu 2,4 mM a inkubovala jsem 5 minut za stálého protřepávání. Nakonec jsem přidala 30 μl TNB 600 μM a inkubovala 5 minut a poté změřila absorbanci při 415 nm na čtečce mikrotitračních destiček. Do oxidované a nativní kontroly jsem místo AOX přidala 10 μl čistého methanolu a do nativní kontroly jsem dala místo HOCl 30 μl fosfátového pufru.

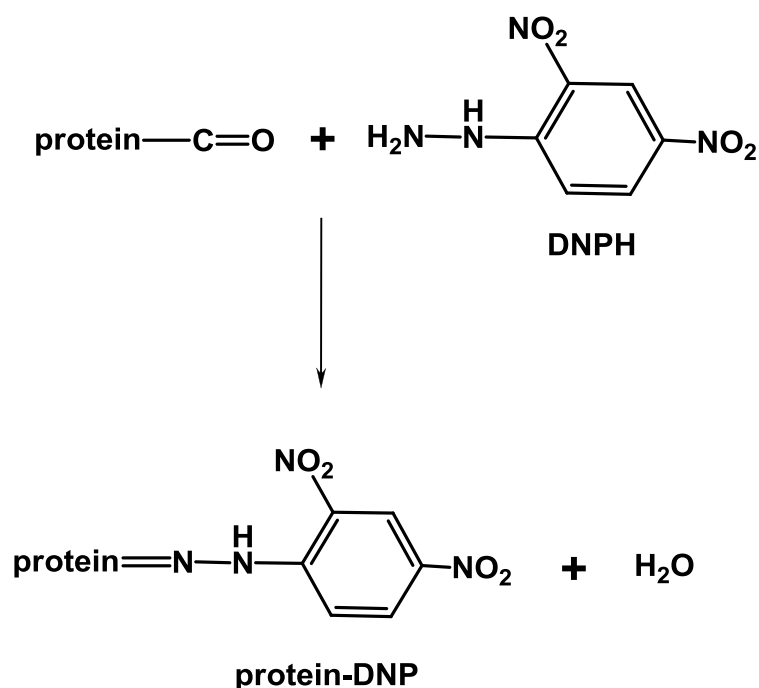
Inkubační směs	AOX 30 μM-3 mM [μl]	Methanol [μl]	HSA 6 μM [μl]	HOCl 360 μM [μl]	0,1 M fosfátový pufr (pH 7) [μl]
s AOX	10	-	150	30	-
Oxidovaná kontrola	-	10	150	30	-
Nativní kontrola	-	10	150	-	30

Inkubační směs	Výsledná koncentrace AOX [μM]	Výsledná koncentrace HSA [mg/ml]	Výsledná koncentrace HOCl [μM]
s AOX	1,2-120	0,24	43,2
Oxidovaná kontrola	0	0,24	43,2
Nativní kontrola	0	0,24	0

Hodnotu poloviční efektivní koncentrace (EC_{50}) jsem pro jednotlivé antioxidanty stanovila v programu GraphPad Prism. Kontrolu (čistý HSA) jsem při stanovení EC_{50} do grafu dávala jako koncentraci antioxidantu 10^{-8} M.

4.3.3 Stanovení karbonylových skupin vznikajících při oxidaci proteinů

Stanovení karbonylových skupin jsem provedla na základě metody popsané Levinem et al. (1990) s některými úpravami (Yan et al. 1996). Karbonylové skupiny vzniklé během oxidace proteinů jsou derivatizovány pomocí 2,4-dinitrofenylhydrazinu (DNPH). DNPH se váže na karbonylovou skupinu a mění se na hydrazon, který zbarví roztok dožluta a dá se fotometricky stanovit při 360 nm. Molární absorpční koeficient protein-DNP je $\epsilon_{360} = 22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Je nezbytné, aby minimální množství bílkoviny v měřeném vzorku bylo alespoň 0,5 mg.



4.3.3.1 Příprava roztoků pro stanovení karbonylů

2 M HCl: Napipetovala jsem 17,7 ml HCl (35%) do odměrné baňky s redestilovanou vodou a objem doplnila do 100 ml.

10 mM DNPH: Navážila jsem 19,8146 mg DNPH a rozpustila v 10 ml 2 M HCl.

10% kyselina trichloroctová (TCA): Navážku 10 g TCA jsem rozpustila v redestilované vodě a doplnila objem roztoku do 100 ml v odměrné baňce.

Ethanol/ethylacetát: Podle potřeby jsem napipetovala 1 díl ethanolu a 1 díl ethylacetátu a roztok jsem promíchala.

HSA 2 mg/ml: Roztok jsem připravila rozpuštěním přesné navážky proteinu v odpovídajícím objemu 0,1 M fosfátového pufru o pH 7.

Roztoky antioxidantů 25 μM, 50 μM, 75 μM a 100 μM: Roztoky jsem připravila naředěním výchozího roztoku katechinů (10 mM) methanolem.

Roztoky HOCl 400 μM, 600 μM, 800 μM, 1 mM a 1,2 mM: Po stanovení aktuální koncentrace kyseliny chlorné jsem pomocí 0,1 M fosfátového pufru naředila výchozí roztok kyseliny na příslušné koncentrace.

4.3.3.2. Příprava inkubačních směsí

Inkubační směsi k optimalizaci koncentrace kyseliny chlorné

V úvodních experimentech jsem nejprve vybrala vhodnou koncentraci kyseliny chlorné, kterou jsem používala v následujících experimentech s antioxidanty. Schéma přípravy oxidovaného albuminu včetně podmínek inkubace je uvedeno v následující tabulce. Použila jsem výše uvedené koncentrace HOCl (0,4-1,2 mM)

Inkubační směs	HSA 2 mg/ml [μl]	HOCl 0,4-1,2 mM [μl]	0,1 M fosfátový pufr (pH 7) [μl]	Délka inkubace 22°C [min]	Odebíraný objem [μl]
1	2440	60	-	15	512
2	2440	-	60	15	512

Inkubační směs	Výsledná koncentrace HSA [mg/ml]	Výsledná koncentrace HOCl [μM]
	1	0,7
2	0,7	0

Inkubační směsi s antioxidanty (AOX)

Pro experimenty s antioxidanty jsem používala 1,2 mM HOCl. Koncentrace použitých roztoků antioxidantů byla 25-100 μM. Schéma přípravy inkubačních směsí včetně podmínek inkubace je uvedeno v následující tabulce.

Inkubační směs	HSA 2 mg/ml [μl]	AOX 25-100 μM [μl]	Délka inkubace 22°C [min]	HOCl 1,2 mM [μl]	0,1 M fosfátový pufr pH 7 [μl]	Délka inkubace 22°C [min]	Odebíraný Objem [μl]
1	2430	-	10	-	70	15	514
2	2430	-	10	60	10	15	514
3	2430	10	10	60	-	15	514

Inkubační směs	Výsledná koncentrace HSA [mg/ml]	Výsledná koncentrace AOX [μM]	Výsledná koncentrace HOCl [μM]
1	0,7	0	0
2	0,7	0	10,5
3	0,7	0,036-0,145	10,5

4.3.3.3. Postup a podmínky stanovení

V první části experimentů jsem hledala vhodnou koncentraci HOCl. Z výše uvedené tabulky je zřejmé, že v těchto inkubačních směsích reaguje pouze protein (HSA) s kyselinou chlornou bez antioxidační ochrany katechinů. Tyto vzorky jsem nechala inkubovat 15 minut při laboratorní teplotě. Vzorky jsem stanovovala vždy minimálně v triplicátu. V další části experimentů jsem pracovala s dříve vybranou koncentrací HOCl (1,2 mM) a bílkovinu jsem nejprve pre-inkubovala 10 minut při laboratorní teplotě s příslušným antioxidantem (25-100 μM) a teprve potom jsem přidala HOCl a nechala inkubovat 15 minut při laboratorní teplotě.

Postup vlastního stanovení byl shodný jak pro vzorky s různou koncentrací HOCl, tak pro vzorky obsahující AOX. Z inkubační směsi jsem odebrala 512 μl (různá koncentrace HOCl) nebo 514 μl (různá koncentrace AOX) a nechala je inkubovat 60 minut s 10 mM DNPH (400 μl) při laboratorní teplotě. Vzorky je nutné každých 10-15 minut promíchat. Inkubaci jsem ukončila přidáním 10% TCA (500 μl), při níž došlo k precipitaci bílkoviny. Vzorky jsem s TCA inkubovala 10 minut na ledu a poté je centrifugovala při 11000 g po dobu 5 minut. Supernatant jsem odpipetovala, proteinovou peletu jsem promyla 1 ml směsí ethanol/ethylacetát (1:1). Mikrozkumavku jsem dobře promíchala na třepačce, nechala jsem ji stát 10 minut při laboratorní teplotě a opět jsem jí centrifugovala 5 minut při 11000 g. Poté jsem supernatant odpipetovala do připravené nádoby a celý proces zopakovala třikrát. Nakonec jsem proteinovou peletu rozpustila v 1 ml 0,1 M fosfátového pufru (pH 7) v termomixeru (37°C, 1000 rpm, 15 min). Slepé vzorky jsem připravovala stejným způsobem jako ostatní vzorky, jen jsem v nich nahradila roztok DNPH roztokem 2 M HCl. Absorbance všech vzorků včetně slepých vzorků jsem změřila při vlnové délce 360 nm proti destilované vodě na

UV-VIS spektrofotometru Helios-β. Při měření jsem používala křemenné kyvety. U všech vzorků jsem následně změřila koncentraci bílkoviny pomocí metody Bradfordové. Postup tohoto stanovení v mikrotitračních destičkách je uveden níže. Výsledky stanovení karbonylových skupin uvádím v nmol karbonylové skupiny na mg HSA (nmol/mg).

Pro výpočet koncentrace karbonylových skupin ve vzorku jsem použila následující vzorec:

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

[Karbonyl] - koncentrace karbonylových skupin v mol/l

A_{VZ} – absorbance měřeného vzorku

A_{PB} – absorbance vzorku bez DNPH (slepého vzorku)

ϵ_{360} – molární absorpční koeficient vzorku měřený při 360 nm

$\epsilon_{360} = 22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Množství karbonylových skupin jsem nakonec vztáhla na mg proteinu (nmol/mg). Koncentraci proteinu jsem stanovila pomocí metody Bradfordové.

4.3.3.4 Stanovení bílkoviny metodou Bradfordové

Tato metoda je založena na zjištění, že maximum absorbance kyselého roztoku Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG) se při navázání bílkoviny mění ze 465 nm na 595 nm. CBBG se vyskytuje ve dvou barevných formách. Červená forma (kyselý roztok) se po navázání na bílkovinu mění na modrou formu. Intenzita zabarvení je přímo úměrná koncentraci bílkoviny (Compton a Jones 1985).

Kalibrační křivka

Vzorek	Koncentrace bílkoviny (µg/ml)	HSA 2 mg/ml (µl)	0,1 M fosfátový pufr (pH 7) (µl)
1	0	0	500
2	200	50	450
3	400	100	400
4	600	150	350
5	800	200	300
6	1000	250	250
7	1200	300	200
8	1400	350	150

Stanovení jsem prováděla na 96 jamkové mikrotitrační destičce. K 5 µl vzorku proteinu jsem přidala 250 µl roztoku Bradfordové pomoci multikanálové pipety (nutná pokojová teplota roztoku). Směs jsem nechala inkubovat 30 minut při laboratorní teplotě za občasného míchání. Připravila jsem si též slepé vzorky (místo roztoku bílkoviny jsem napipetovala 5 µl pufru).

Na čtečce mikrotitračních destiček (Bio-Rad) jsem změřila absorbanci při 595 nm proti slepému vzorku. Z naměřených výsledků jsem sestavila kalibrační křivku a její rovnici přímky jsem použila k výpočtu koncentrace proteinu v měřeném vzorku.

4.3.4 Polyakrylamidová gelová elektroforesa (PAGE) a imunoblotting

4.3.4.1 Příprava roztoků pro nativní PAGE

Roztok 4 M HCl: Do 150 ml redestilované vody jsem přilila 88 ml konc. HCl a doplnila vodou do 250 ml. Roztok jsem uchovávala v lednici.

Zásobní roztok akrylamidu a bis-akrylamidu: Přípravu roztoku bylo nutné provádět v rukavicích a s rouškou kvůli riziku neurotoxicity a kancerogenity

akrylamidu. Po navážení 30 g akrylamidu (AA) a 0,8 g bis-akrylamidu (bisAA) jsem obě látky rozpustila v malém množství redestilované vody a doplnila v odměrné baňce do 100 ml redestilovanou vodou. Tyto roztoky jsem uchovávala v lednici pod argonovou atmosférou.

1,5 M Tris-HCl pufr (pH 8,8): Rozpustila jsem 18,5 g Trisu v 75 ml redestilované vody a po úpravě pH na pH-metru pomocí 4 M HCl (cca 5 - 6 ml) jsem doplnila v odměrné baňce do objemu 100 ml. Roztok jsem uchovávala v lednici.

0,5 M Tris-HCl pufr (pH 6,8): Po rozpuštění 6 g Trisu v 75 ml redestilované vody jsem upravila hodnotu pH roztoku pomocí 4 M HCl (cca 7-8 ml) a doplnila v odměrné baňce do 100 ml. Roztok jsem uchovávala v lednici.

Isobutanol nasycený vodou: Po smíchání čistého isobutanolu s redestilovanou vodou jsem získala dvě oddělené vrstvy, přičemž horní vrstva obsahovala isobutanol nasycený vodou potřebný k přípravě gelů. Tento roztok je nutné uchovávat v lednici.

10% APS: 25 mg persíranu amonného jsem rozpustila ve 250 μ l redestilované vody. Připravila jsem ho vždy těsně před použitím.

0,5% Bromfenolová modř (BFB): K navážce 50 mg jsem přidala 10 ml redestilované vody a uchovávala při laboratorní teplotě.

Koncentrovaný elektrodový pufr: Jednotlivé navážky 72 g glycinu a 15 g Trisu jsem rozpustila v 900 ml redestilované vody a upravila pH roztoku na 8,3 pomocí 4 M HCl. Po následném doplnění v odměrné baňce do 1000 ml jsem roztok rozlila po 100 ml do plastických nádobek a dala zamrazit.

Elektrodový pufr: Před provedením elektroforesy jsem vždy 70 ml koncentrovaného elektrodového pufru smíchala s 280 ml redestilované vody.

Vzorkový pufr pro nativní PAGE: Tento roztok vznikl smícháním 4,3 ml redestilované vody, 1 ml 0,5 M Tris-HCl pufru (pH 6,8), 2 ml glycerolu a 0,6 ml 0,5% BFB. Takto připravený zásobní vzorkový pufr jsem použila bez dalších úprav.

4.3.4.2 Příprava roztoků pro SDS-PAGE

Prvních sedm výše uvedených roztoků má stejné složení u nativní i SDS-PAGE. Roztoky, které se svým složením liší, jsou koncentrovaný elektrodový pufr, zásobní vzorkový pufr a vzorkový pufr. Jejich složení uvádím níže.

10% SDS: Tento roztok jsem připravila rozpuštěním 10 g SDS v 80 ml redestilované vody a poté jsem jeho objem doplnila v odměrné baňce do 100 ml. Uchovávala jsem ho při laboratorní teplotě.

Koncentrovaný elektrodový pufr: Jednotlivé navážky 72 g glycinu, 15 g Trisu a 5 g SDS jsem rozpustila v 900 ml redestilované vody a upravila pH roztoku na 8,3 pomocí 4 M HCl. Po následném doplnění v odměrné baňce do 1000 ml jsem roztok rozlila po 100 ml do plastických nádobek a dala zamrazit.

Elektrodový pufr: Před provedením elektroforesy jsem vždy 70 ml koncentrovaného elektrodového pufru smíchala s 280 ml redestilované vody.

Zásobní vzorkový pufr: Tento roztok vznikl smícháním 1,3 ml redestilované vody, 1 ml 0,5 M Tris-HCl pufru (pH 6,8), 2 ml glycerolu, 3 ml 10% SDS a 0,6 ml 0,5% BFB.

Vzorkový pufr: K potřebnému množství zásobního vzorkového pufru jsem těsně před použitím přidala 2-merkptoethanol (50 μ l/ml), který ruší disulfidické vazby. Díky přítomnosti SDS získají proteiny tyčinkovitý tvar a při pH 7-10 mají všechny stejný negativní náboj. Ke 142,5 μ l zásobního vzorkového pufru jsem přidala 7,5 μ l 2-merkptoethanolu a ten jsem používala jako vzorkový pufr při SDS-PAGE.

4.3.4.3 Příprava roztoků pro imunoblotting

Blotovací pufr: Navážky TRISu (6,06 g) a glycinu (28,8 g) jsem rozpustila v 500 ml redestilované vody a přidala 400 ml methanolu. Po doplnění redestilovanou vodou na objem 2000 ml jsem pufr přelila do jednolitrových lahví a uchovávala v chladicím boxu.

10 mM roztok DNPH: Navážku 19,814 mg DNPH jsem rozpustila v 10 ml 2 M HCl (připravila jsem napipetováním 17 ml 35% HCl do odměrné baňky s redestilovanou vodou a doplněním vodou do 100 ml).

0,1 M TRIS pufr, pH 8,0: Navážku 12,11 g TRISu jsem rozpustila v 800 ml redestilované vody a po úpravě pH na 8,0 pomocí 4 M HCl, doplnila v odměrné baňce na objem 1000 ml redestilovanou vodou a uchovávala v lednici.

TBST: Navážku NaCl (8,77g) jsem rozpustila v 300 ml redestilované vody a po přidání 3 ml Tweenu 20 a 100 ml 0,1 M TRIS pufru (pH 8,0) jsem doplnila objem tohoto roztoku v odměrné baňce do 1000 ml redestilovanou vodou. Roztok jsem uchovávala v lednici.

TBS: K navážce 2,19 g NaCl rozpuštěné ve 100 ml redestilované vody jsem přidala 25 ml 0,1 M TRIS pufru (pH 8,0) a doplnila v odměrné baňce na objem 250ml. Roztok jsem uchovávala v lednici.

AP (alkalická fosfatáza) pufr: 6,06 g TRISu a 508 mg $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ jsem rozpustila v 300 ml redestilované vody. Upravila jsem pH roztoku pomocí 4 M HCl na 9,5 a doplnila v odměrné baňce na objem 500 ml. Roztok jsem uchovávala v lednici.

8% mléko: Navážku 2 g mléka jsem rozpustila ve 25 ml TBST. Tento roztok jsem použila k zablokování volných epitopů na 1 membráně.

Vývojka: Roztok jsem připravila naředěním zásobního koncentrátu destilovanou vodou v poměru 1:25, cca 500 ml.

Ustalovač: Roztok jsem připravila naředěním zásobního koncentrátu destilovanou vodou v poměru 1:3, cca 1000 ml.

4.3.4.4 Příprava gelů pro nativní a SDS-PAGE

Separáční a **zaostr**ovací gel: Gely jsem si připravila vždy den před vlastním provedením elektroforesy podle rozpisu uvedeném v následující tabulce. Používala jsem 7,5% separáčn

Rozpis na 1 gel	Separáčn		Zaostr	
	Nativní PAGE	SDS-PAGE	Nativní PAGE	SDS-PAGE
Redestilovaná voda [ml]	5	2,45	3,176	1,563
1,5 M Tris.HCl (pH 8,8) [ml]	2,5	1,25	-	-
0,5 M Tris.HCl (pH 6,8) [ml]	-	-	1,25	0,625
Roztok AA+bis AA [ml]	2,5	1,25	0,5	0,25
10% SDS [ml]	-	0,05	-	0,025
10% APS [μ l]	58	58	50	60
TEMED [μ l]	4	4	5	5

Příprava gelů: Před naléváním gelů je nezbytné všechny součásti nalévacího zařízení (nalévací stojánek, skla, skla se spacerem, spony a hřebeny) důkladně umýt jarem a opláchnout redestilovanou vodou. Skla a hřebeny je nutné ještě navíc opláchnout lihomethanolem a nechat oschnout ve svislé poloze. Po spojení skel sponami jsem je umístila do nalévacího stojánku. Do kádinky jsem si nepipetovala roztoky (podle rozpisu ve výše uvedené tabulce) potřebné na přípravu spodního gelu. Roztok je potřeba lehce promíchat a ihned pipetou nalít mezi skla do výšky cca 4,5 cm od spodního okraje. Vrstvu gelu je nutné ihned opatrně převrstvit isobutanolem nasyceným vodou (cca 200 μ l, brání vyschnutí a srovná gel do roviny) po celé délce gelu. Takto připravený gel jsem nechala 45 minut polymerovat. Poté jsem opatrně isobutanol slila, gel opláchla redestilovanou vodou a opatrně vysušila filtračním papírem. Do kádinky jsem si připravila směs roztoků (podle rozpisu ve výše uvedené tabulce) na horní gel. Ihned po promíchání jsem pipetou nalila tento roztok gelu mezi skla na spodní gel až po horní okraj skel. Pod úhlem 45° jsem do horního gelu zasunula hřeben pro vytvoření jamek. Ke správnému průběhu polymerace stačí hornímu gelu

doba dvou hodin, ale většinou jsem nechala gel polymerovat přes noc v lednici zabalený do potravinářské folie.

4.3.4.5 Příprava barvicích roztoků

Barvení gelů Coomassie Blue G-250

K barvení nativních gelů Coomassie Blue G-250 jsem používala komerčně dostupný roztok EZBlue Gel Staining Reagent, který je připravený k okamžitému použití.

Barvení gelů stříbrem (Silver staining)

Barvení SDS-PAGE gelů stříbrem jsem prováděla podle metody popsané Ohsawou a Ebatou (1983) a později modifikované Oosawou, Ebatou a Hiratou (1986). Příprava jednotlivých roztoků je uvedena níže.

Fixační roztok: Roztok jsem připravila rozpuštěním 5 g PEG 2000 v 50% roztoku isopropanolu (připraveného smísením 50 ml isopropanolu a 50 ml redestilované vody).

Barvicí roztok: Napipetovala jsem 1 ml 20% roztoku AgNO_3 (navážila jsem 2g AgNO_3 a doplnila redestilovanou vodou do 10 ml), 1 ml NH_4OH , 5 ml 4% roztoku NaOH (navážila jsem 0,4g NaOH a doplnila redestilovanou vodou do 10 ml) a doplnila redestilovanou vodou do 100 ml.

Vyvíjecí roztok: Navážku 5 mg kyseliny citronové jsem rozpustila v 80 ml redestilované vody, přidala 0,054 ml 37% roztoku formaldehydu a doplnila redestilovanou vodou do 100 ml.

Barvení membrán Ponceau S

0,1% Ponceau S: Barvicí roztok jsem připravila rozpuštěním navážky 100 mg Ponceau S ve 100 ml 5% kyseliny octové.

Odbarvovací roztok: Membrány jsem odbarvovala v 10% kyselině octové.

4.3.4.6 Příprava inkubačních směsí pro nativní a SDS-PAGE

Před přípravou inkubačních směsí jsem si vždy stanovila aktuální koncentraci kyseliny chlorné podle postupu uvedeného v kapitole 4.3.1.5. Poté jsem si připravila roztoky HOCl , které jsem používala pro přípravu inkubačních směsí. Ke zředění výchozího roztoku kyseliny chlorné (0,9-1,2 M) jsem používala 0,1 M fosfátový pufr

(pH 7). Do inkubačních směsí jsem pipetovala vždy 10 μ l roztoku HOCl příslušné koncentrace (0, 66, 132, 165, 198, 264, 297 μ M nebo 0, 330, 440, 550, 660, 770, 880 μ M). Výsledné koncentrace HOCl v inkubačních směsích byly: 0; 5,5; 11; 13,75; 16,5; 22 a 24,8 μ M nebo 0; 27,5; 36,7; 45,8; 55; 64 a 73,3 μ M.

Inkubační směs	HSA 0,5-2 mg/ml [μl]	HOCl (0-297 μM) [μl]	HOCl (0-880 μM) [μl]	Trolox (6 mM) [μl]	Čas	Teplota [°C]	Výsledný objem [μl]
HSA 0,42 mg/ml +HOCl 0-24,8 μM	100	10	–	10	2 hod.	37	120
HSA 0,42 mg/ml +HOCl 0-24,8 μM	100	10	–	10	24 hod.	37	120
HSA 0,42 mg/ml +HOCl 0-73,3 μM	100	–	10	10	20 min.	22	120
HSA 0,42 mg/ml +HOCl 0-73,3 μM	100	–	10	10	20 min.	37	120
HSA 0,42 mg/ml +HOCl 0-73,3 μM	100	–	10	10	24 hod.	22	120
HSA 0,42 mg/ml +HOCl 0-73,3 μM	100	–	10	10	24 hod.	37	120
HSA 0,42 mg/ml +HOCl 0-73,3 μM	100	–	10	10	4 dny	22	120
HSA 0,42 mg/ml +HOCl 0-73,3 μM	100	–	10	10	4 dny	37	120
HSA 0,83 mg/ml +HOCl 0-24,8 μM	100	10	–	10	2 hod.	37	120
HSA 1,7 mg/ml +HOCl 0-24,8 μM	100	10	–	10	15 min.	22	120
HSA 1,7 mg/ml +HOCl 0-24,8 μM	100	10	–	10	1 hod.	22	120
HSA 1,7 mg/ml +HOCl 0-24,8 μM	100	10	–	–	1 hod.	22	120
HSA 1,7 mg/ml +HOCl 0-24,8 μM	100	10	-	10	24 hod.	37	120

4.3.4.7 Příprava inkubačních směsí pro imunoblotting

Před přípravou inkubačních směsí jsem si vždy stanovila aktuální koncentraci kyseliny chlorné podle postupu uvedeného v kapitole 4.3.1.5. Poté jsem si připravila roztoky HOCl, které jsem používala pro přípravu inkubačních směsí. Ke zředění výchozího roztoku kyseliny chlorné (0,9-1,2 M) jsem používala 0,1 M fosfátový pufr (pH 7). Po smíchání HSA 0,5 mg/ml a příslušného antioxidantu jsem vzorky 15 minut preinkubovala při laboratorní teplotě. Preinkubovala jsem všechny vzorky, tedy i ty bez antioxidantu. Poté jsem podle schématu přidala HOCl 880 mM nebo 0,1 fosfátový pufr (pH 7) a všechny vzorky jsem znovu inkubovala po dobu 10 minut.

Vzorek	HSA 0,5 mg/ml [μl]	Antioxidant 100 μM [μl]	HOCl 880 μM [μl]	0,1 M fosfátový pufr [μl]	Výsledný objem [μl]
1	100	-	-	20	120
2	100	-	10	10	120
3	100	10	10	-	120

Vzorek	Výsledná koncentrace HSA [mg/ml]	Výsledná koncentrace AOX [μM]	Výsledná koncentrace HOCl [μM]
1	0,42	-	0
2	0,42	-	73,3
3	0,42	8,3	73,3

4.3.4.8 Podmínky provedení elektroforesy a jednotlivých barvení

Pro sledování změn modelové molekuly proteinu (HSA) vlivem oxidace HOCl a potenciálního antioxidačního účinku katechinů jsem používala různé elektroforetické techniky. Pomocí nativní PAGE jsem sledovala změny v náboji molekuly HSA vyvolané působením HOCl. SDS-PAGE jsem použila ke sledování agregace a fragmentace molekuly HSA po oxidaci kyselinou chlornou. Imunoblottingem jsem pak sledovala vznik karbonylových skupin v oxidovaném proteinu.

Nejprve jsem optimalizovala podmínky elektroforesy (tj. koncentraci proteinu vstupujícího do inkubační směsi, koncentraci kyseliny chlorné, přítomnost/nepřítomnost Troloxu v inkubační směsi a podmínky inkubace). U nativní PAGE jsem na gely nanášela vzorky smíchané s odpovídajícím množstvím vzorkového pufru dle následujícího schématu. Po ukončení elektroforesy jsem tyto gely barvila pomocí Coomassie Blue G250. U SDS-PAGE jsem připravené vzorky proteinů před nanesením na gel ještě denaturovala pomocí tepla (3 minuty při 99°C, 750 rpm) v přítomnosti 2-merkapt ethanolu. Poté jsem je dala zchladit na pět minut do ledu. Takto připravené vzorky jsem napipetovala do jamek gelu a do dvou krajních jamek jsem aplikovala molekulový marker (3 µl pokud byl poté gel barvený stříbrem a 5 µl pokud následoval imunoblotting). Po ukončení elektroforesy jsem gely buď barvila stříbrem (Silver staining) nebo jsem rozdělené proteiny přenesla na PVDF membránu pomocí Western blottingu s následnou chemiluminiscenční detekcí nebo barvením pomocí Ponceau S.

V následující tabulce uvádím základní schéma, podle kterého jsem prováděla, jak nativní PAGE, tak SDS-PAGE.

Nativní PAGE	SDS PAGE
<i>1) Příprava roztoků vzorků z inkubačních směsí</i>	
0,5 mg/ml HSA 30 µl vzorku + 15 µl vzorkového pufru 1 mg/ml HSA 19,2 µl vzorku + 19,2 µl vzorkového pufru 2 mg/ml HSA 9,6 µl vzorku + 9,6 µl vzorkového pufru	0,5 mg/ml HSA 8 µl vzorku + 4 µl vzorkového pufru 0,5 mg/ml HSA + AOX 16 µl vzorku + 8 µl vzorkového pufru
<i>2) Nanesení vzorků na gel (8 µg HSA/jamka)</i>	
Pipetuji u směsí s: 0,5 mg/ml HSA 28,8 µl 1 mg/ml HSA 19,2 µl 2 mg/ml HSA 9,6 µl	Pipetuji u směsí s: 0,5 mg/ml HSA 6 µl 0,5 mg/ml HSA + AOX 12 µl
<i>3) Vlastní elektroforeza</i>	
Vanička s gely a elektrodovým pufrům ponořená do nádoby s ledem. Konstantní proud 20 mA dokud vzorky nedosáhnou rozhraní obou gelů a poté zvýšení na 30 mA. Vypnout zdroj až čelo doběhne na spodní okraj gelu.	Vanička s gely a elektrodovým pufrům ponořená do nádoby s ledem. Konstantní napětí 100 V dokud vzorky nedosáhnou rozhraní obou gelů a poté zvýšení na 200 V. Vypnout zdroj až čelo doběhne na spodní okraj gelu.
<i>4) Barvení gelů po elektroforese</i>	
Barvení Coomassie Blue G250 (EZ Blue): 1. Redestilovaná voda - 1 x 5 min (oplach) 2. Barvicí roztok - 45 až 60 min 3. Redestilovaná voda – 1-2 hod. (odbarvení gelu možné i přes noc) (u posledního kroku je nutné vodu pravidelně vyměňovat)	Silver staining (barvení stříbrem): 1. Fixační roztok - 30 min – gel se smršťuje 2. Barvicí roztok – 15 min – gel se natahuje 3. Redestilovaná voda - 3 x 1 min – gel se nemění 4. Vyvíjecí roztok - 2 a více min. (podle potřeby) – gel se nemění 5. Redestilovaná voda

Silver staining je metoda citlivější než barvení proteinů pomocí Coomassie Blue G250, ale není kvantitativní. Principem tohoto barvení je redukce stříbrných iontů některými aminokyselinovými zbytky v proteinech (Cys, Met, Arg, Lys, His). Proteinové pásy se zobrazují jako hnědé až černé proužky. Citlivost této metody je 0,1 ng proteinu.

Některé gely jsem po elektroforese nebarvila a podrobila jsem je imunoblottingu. Po vyjmutí gelů ze skel jsem je nechala asi 5 minut volně plavat v blottovacím pufru v nerezové misce. Po aktivaci PVDF membrány methanolem (5 min) a následném ponoření do blottovacího pufru jsem sestavila blottovací sendvič:

- bílá houbička
- silný filtrační papír (8 x 10 cm, BioRad)
- gel
- PVDF membrána (9 x 6,5 cm)
- silný filtrační papír (8 x 10 cm, BioRad)
- bílá houbička

Všechny součásti jsem vždy nejprve namočila do blottovacího pufru a před uzavřením sendviče jsem odstranila vzduchové bublinky pomocí skleněné tyčinky. Opatrně jsem uzavřela blottovací sendvič, dva takto připravené sendviče jsem umístila do blottovacího zařízení a to jsem vložila do blottovací nádoby spolu s ledítkem. Nádobku jsem naplnila blottovacím pufrem, připojila jsem elektrody a celé zařízení jsem vložila do ledové lázně. Blotting probíhal při konstantním napětí 100 V po dobu 120 min a po jeho ukončení následovalo několikanásobné promývání a inkubace s předem připravenými roztoky protilátek podle rozpisu, který uvádím v následující tabulce. Všechny použité roztoky měly pokojovou teplotu.

Ponoření membrány do roztoku DNPH Derivatizace karbonylových skupin v molekulách proteinů činidlem DNPH (vytváří se epitop DNP, na který se posléze váže primární protilátka).	5 min
Vymývání volného DNPH v 2 M HCl	3 x 5 min
Vymývání ve 100% methanolu	7 x 5 min
<i>Blokování membrány</i> Zablokování volných míst na membráně, aby se zabránilo nespecifické vazbě protilátek: 8% roztoku mléka v TBST	přes noc v lednici
<i>Promývání membrány ve skleněných miskách umístěných na kývačce</i>	následující den
<i>Oplach membrány</i> 25 ml TBST	2 x 5 min
<i>Inkubace s primární protilátkou (rabbit anti-DNP, 1:1000)</i> 25 ml TBST + 125 mg mléka + 25 µl Ab	45 min
<i>Oplach membrány po inkubaci:</i> TBST	6 x 5 min
<i>Inkubace se sekundární protilátkou (goat anti-rabbit IgG-AP, 1:2000)</i> 25 ml TBST + 12,5 µl sekundární Ab-AP	45 min
<i>Oplach membrány po inkubaci</i> TBST TBS AP-pufr	6 x 5 min 2 x 5 min 2 x 5 min

Nakonec jsem PVDF membránu v temné komoře (pod ochranným světlem) podrobila chemiluminiscenční detekci. Luminiskující proužky byly zachyceny na negativní fotografický film, který byl poté vyvolán standardním způsobem.

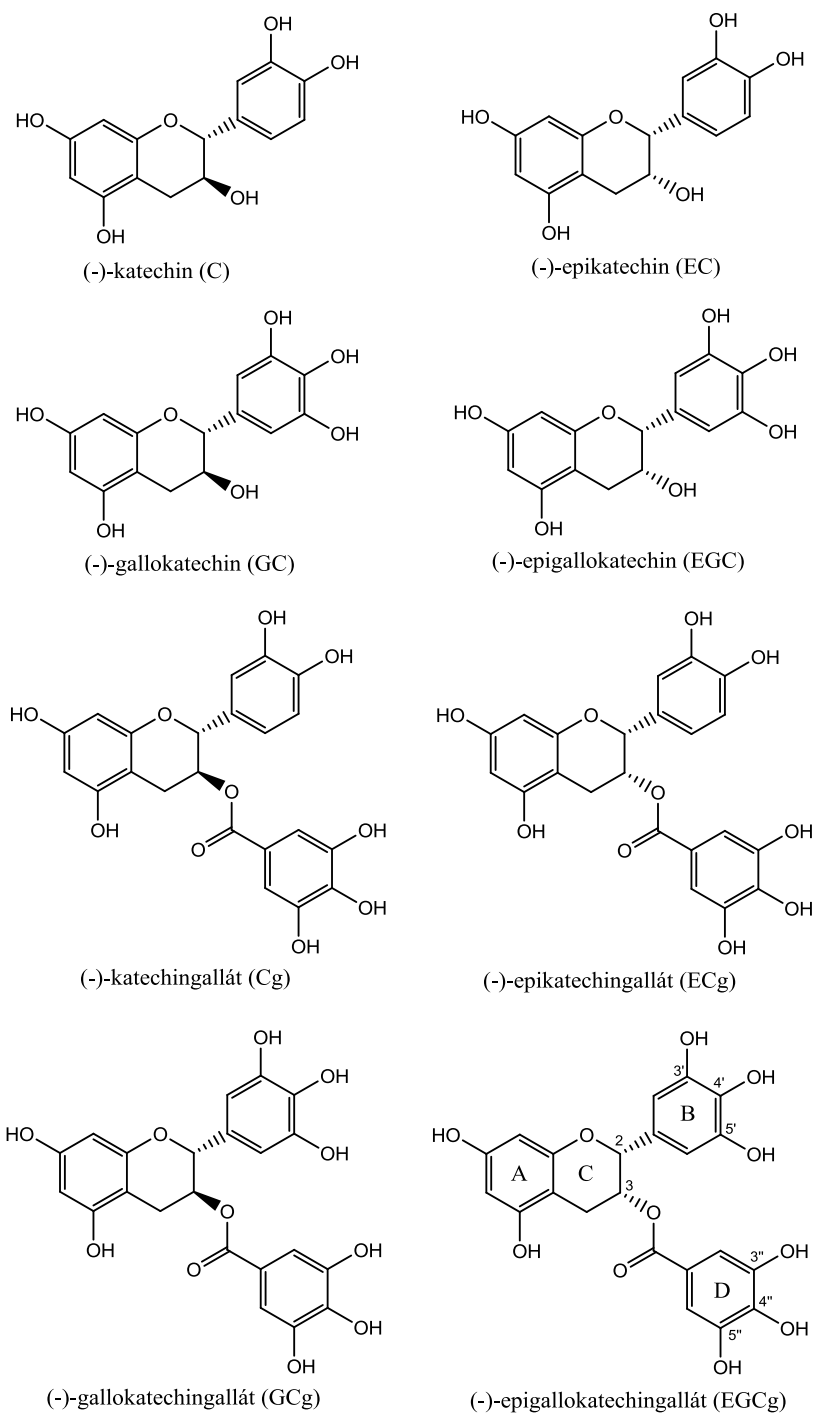
Postup chemiluminiscenční detekce	
V temné komoře jsem si připravila fotomisky s vývojkou a ustalovačem, dvě skleněné misky s destilovanou vodou, kazetu, RTG filmy, fotopinzetu, nůžky, potravinářskou fólii, nastříhané fólie na membrány	
Slít z membrány AP - pufr	
Aplikace substrátu (1,5 ml) na povrch membrány, při tlumeném světle	5 min
Zabalení membrány do folie: Membránu za jeden roh zvednout pinzetou, nechat okapat a přenést mezi dva listy fólie. Následně umístit do kazety.	
Expozice: PVDF membrána (ve fólii) a fotografický film se nechají exponovat v uzavřené kazetě	5 min
Vyvíjení: Ponoření celého filmu do naředěného roztoku vývojky, nutné neustálé kývání filmu pomocí fotopinzety	Ihned po expozici
Oplach v destilované vodě (ukončení vyvíjení)	
Ustálení: Ponoření do naředěného roztoku ustalovače.	cca 1 min
Oplach v destilované vodě.	

Membránu jsem po chemiluminiscenční detekci obarvila pomocí barviva Ponceau S. Toto je rychlá a reverzibilní metoda barvení používaná pro lokalizaci bílkovin na blottovacích membránách. Membránu jsem 1 minutu kývala s 0,1% barvicím roztokem a poté jsem přebytečné barvivo odstranila pomocí opakovaného oplachu 10% kyselinou octovou.

Všechny gely, filmy a membrány jsem nakonec naskenovala pomocí dokumentačního zařízení GelDoc XR a vyhodnocovala v programu QuantityOne.

5. VÝSLEDKY

Výsledkovou část jsem rozdělila do tří částí podle jednotlivých metodik, kterými jsem zkoumala potenciální antioxidační aktivitu osmi přírodních derivátů katechinu, které se vyskytují v čaji. Jejich struktury jsou uvedeny v Obr. 5.



Obr. 5: Struktura studovaných derivátů katechinu.

5.1 Spektrofotometrické stanovení chloraminů

Touto metodou jsem studovala protektivní vliv jednotlivých derivátů katechinu proti oxidačnímu poškození HSA kyselinou chlornou. Sledovaným parametrem byla koncentrace vznikajících chloraminů. Všechny katechiny jsem studovala v koncentracích 0-3 mM a z grafu závislosti koncentrace antioxidantu na jeho aktivitě jsem získala hodnoty EC_{50} jednotlivých katechinů (Obr. 6-13, Tab. 3-10).

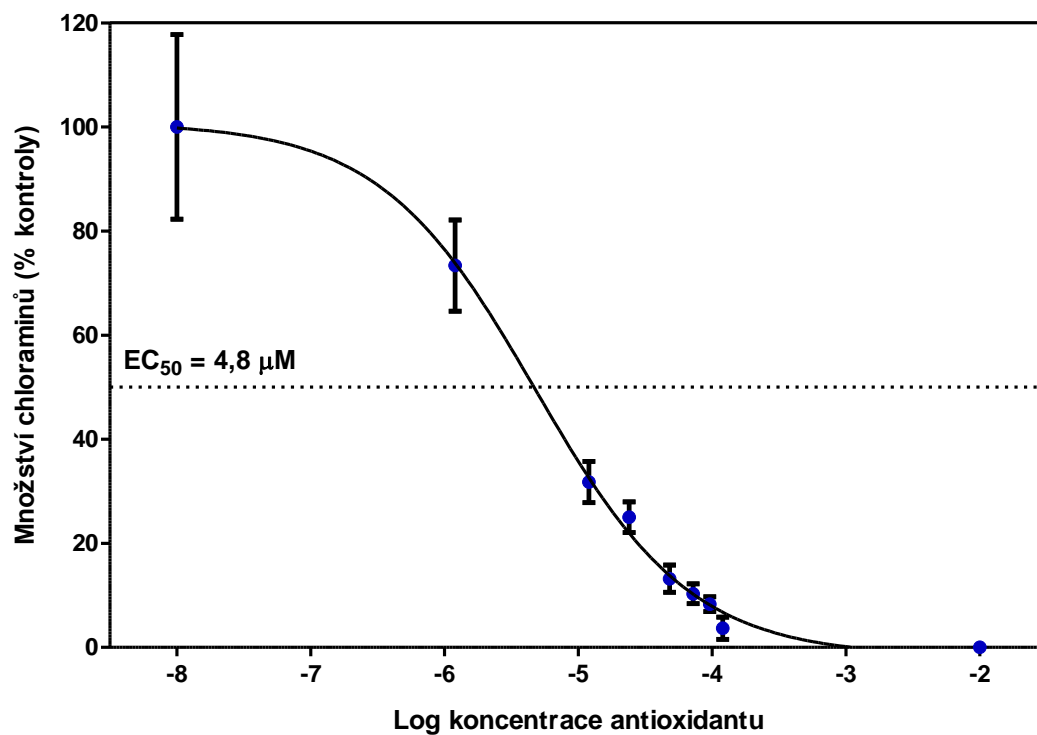
Do grafů pro získání hodnoty EC_{50} jsem jako vzorek obsahující 100% chloraminů dosazovala hodnoty získané pro oxidovanou kontrolu a jako koncentraci antioxidantu v tomto vzorku jsem zvolila hodnotu 10^{-8} M. Hodnoty naměřené pro nativní kontrolu jsem zvolila jako vzorek s nulovou koncentrací chloraminů a jako koncentraci antioxidantu v tomto vzorku jsem zvolila hodnotu 10^{-2} M. Pouze tímto způsobem šlo obejít nastavení programu GraphPad Prism.

Největší vychytávací schopnost a tedy i nejmenší hodnotu EC_{50} měl katechin ($EC_{50} = 4,8 \mu\text{M}$). Ze získaných výsledků se zdá, že *trans* isomery (katechiny) mají vyšší antioxidační aktivitu než odpovídající *cis* isomery (epikatechiny, oba substituenty na kruhu C jsou orientovány stejným směrem). Dále z výsledků vyplývá, že vyšší počet hydroxylových skupin antioxidační účinnost katechinů snižuje (Obr. 14, Tab. 11). Pořadí, ve kterém stoupala antioxidační aktivita katechinů je následující: GC > ECg > GCg >> EGCg > EGC > Cg > EC > C.

Katechin

Tab. 3: Vliv katechinu na vznik chloraminů a jeho vychytávací aktivita.

Vzorek	Chloraminy [% kontroly]	SD [%]	Vychytávací aktivita [%]
oxidovaná kontrola	100,00	17,74	-
nativní kontrola	0	1,10	-
1,2 μM AOX	73,37	8,76	26,63
12 μM AOX	31,78	3,97	68,22
24 μM AOX	25,03	2,95	74,97
48 μM AOX	13,21	2,63	86,79
72 μM AOX	10,29	1,91	89,71
96 μM AOX	8,32	1,42	91,68
120 μM AOX	3,69	2,11	96,31

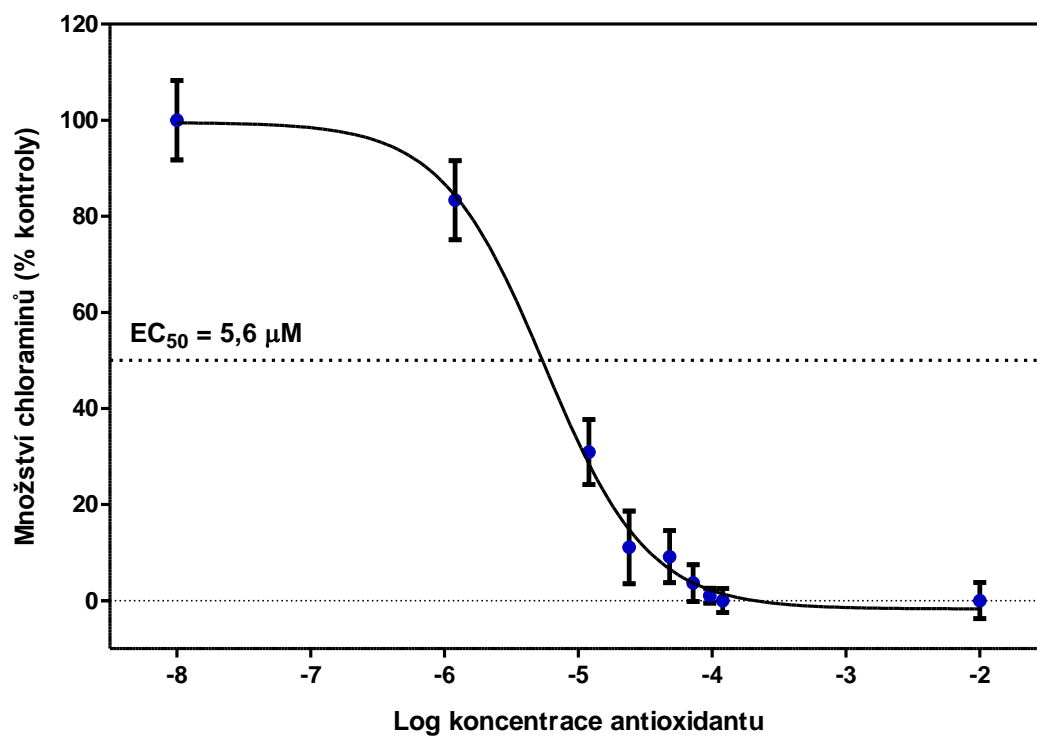


Obr. 6: Stanovení EC_{50} katechinu.

Epikatechin

Tab. 4: Vliv epikatechinu na vznik chloraminů a jeho vychytávací aktivita.

Vzorek	Chloraminy [% kontroly]	SD [%]	Vychytávací aktivita [%]
oxidovaná kontrola	100,00	8,27	-
nativní kontrola	0	3,76	-
1,2 μM AOX	83,35	8,23	16,65
12 μM AOX	30,93	6,78	69,07
24 μM AOX	11,10	7,57	88,90
48 μM AOX	9,15	5,43	90,85
72 μM AOX	3,65	3,82	96,35
96 μM AOX	1,03	1,55	98,97
120 μM AOX	0	2,50	100,00

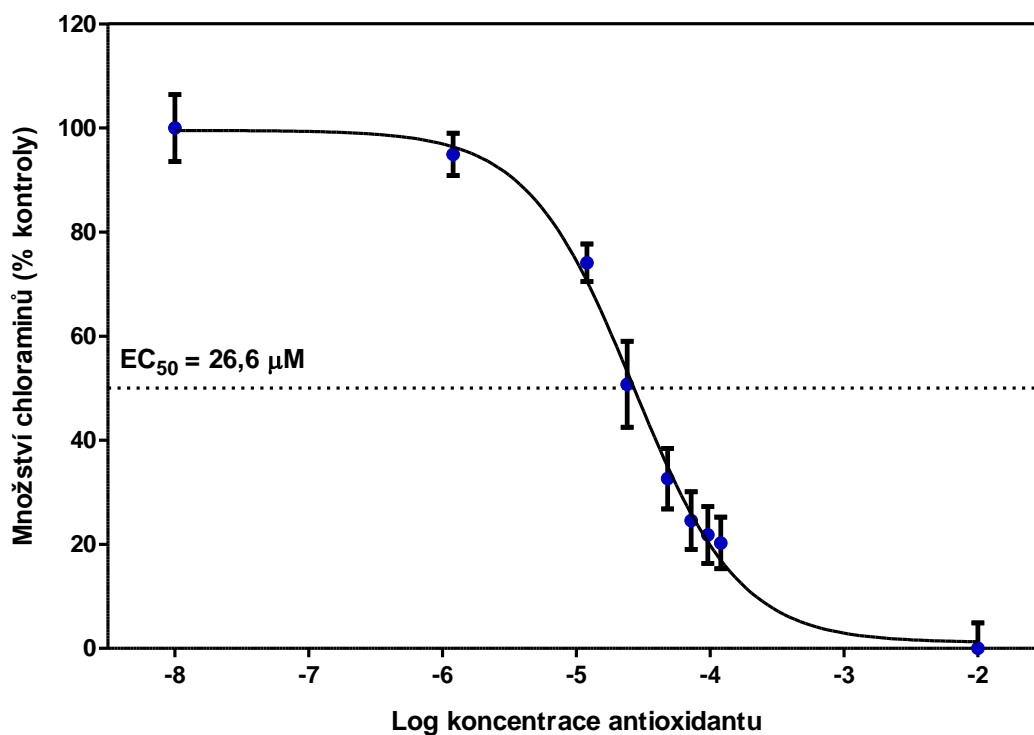


Obr. 7: Stanovení EC₅₀ epikatechinu.

Gallokatechin

Tab. 5: Vliv gallokatechinu na vznik chloraminů a jeho vychytávací aktivita.

Vzorek	Chloraminy [% kontroly]	SD [%]	Vychytávací aktivita [%]
oxidovaná kontrola	100,00	6,42	-
nativní kontrola	0	4,91	-
1,2 μM AOX	64,59	2,80	35,41
12 μM AOX	47,59	2,49	52,41
24 μM AOX	29,15	3,32	70,85
48 μM AOX	27,08	3,87	72,92
72 μM AOX	24,12	2,50	75,89
96 μM AOX	20,71	2,80	79,29
120 μM AOX	18,93	1,28	81,07

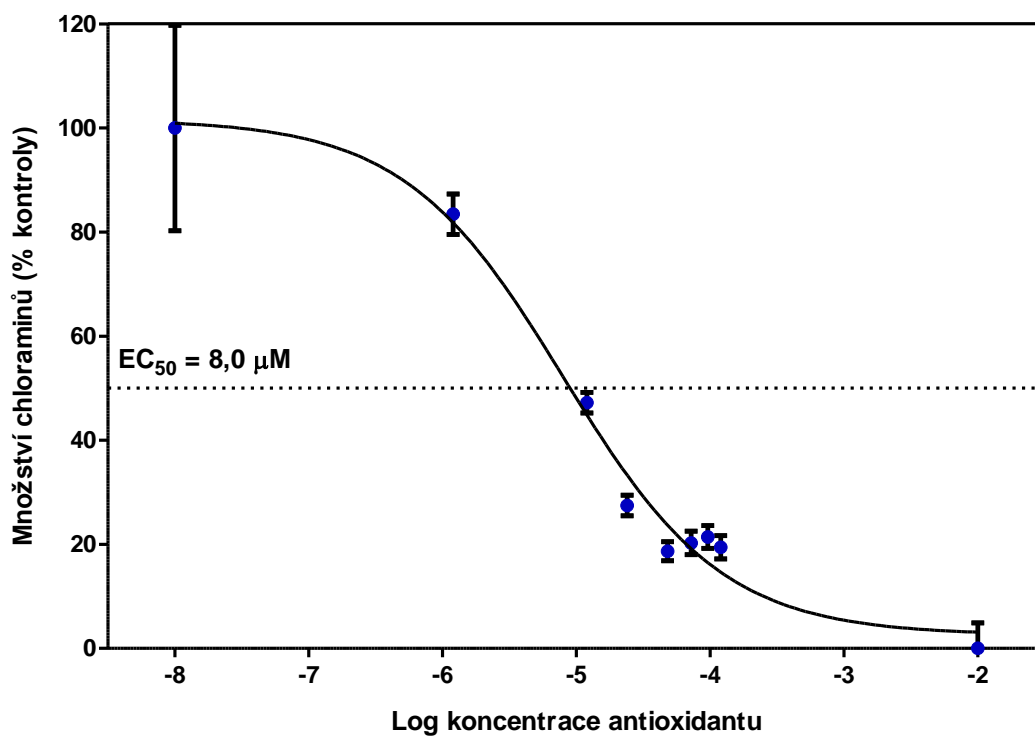


Obr. 8: Stanovení EC₅₀ gallokatechinu.

Epigallokatechin

Tab. 6: Vliv epigallokatechinu na vznik chloraminů a jeho vychytávací aktivita.

Vzorek	Chloraminy [% kontroly]	SD [%]	Vychytávací aktivita [%]
oxidovaná kontrola	100,00	19,74	-
nativní kontrola	0	4,89	-
1,2 μM AOX	83,43	3,89	16,57
12 μM AOX	47,22	2,00	52,78
24 μM AOX	27,47	1,97	72,53
48 μM AOX	18,66	1,82	81,34
72 μM AOX	20,26	2,25	79,74
96 μM AOX	21,41	2,17	78,59
120 μM AOX	19,44	2,23	80,56

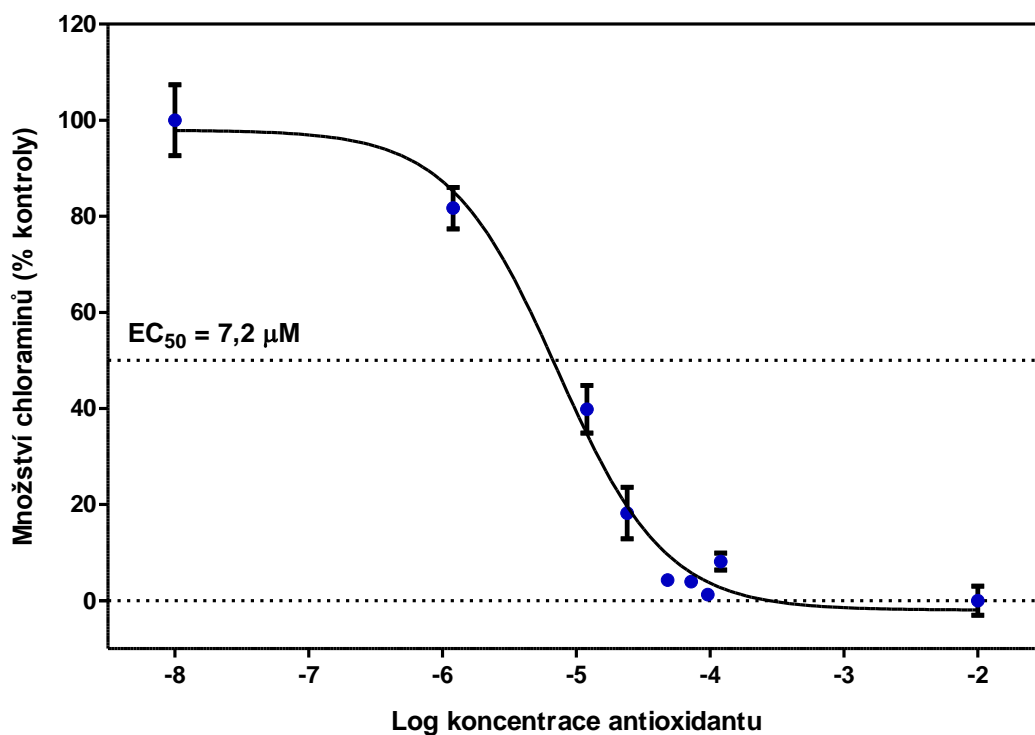


Obr. 9: Stanovení EC₅₀ epigallokatechinu.

Katechingallát

Tab. 7: Vliv katechingallátu na vznik chloraminů a jeho vychytávací aktivita.

Vzorek	Chloraminy [% kontroly]	SD [%]	Vychytávací aktivita [%]
oxidovaná kontrola	100,00	7,38	-
nativní kontrola	0	3,02	-
1,2 μM AOX	81,72	12,7	26,31
12 μM AOX	39,82	4,95	64,10
24 μM AOX	18,21	5,36	83,58
48 μM AOX	4,30	1,07	96,13
72 μM AOX	3,95	1,18	96,43
96 μM AOX	1,26	0,96	98,86
120 μM AOX	8,13	1,77	92,67

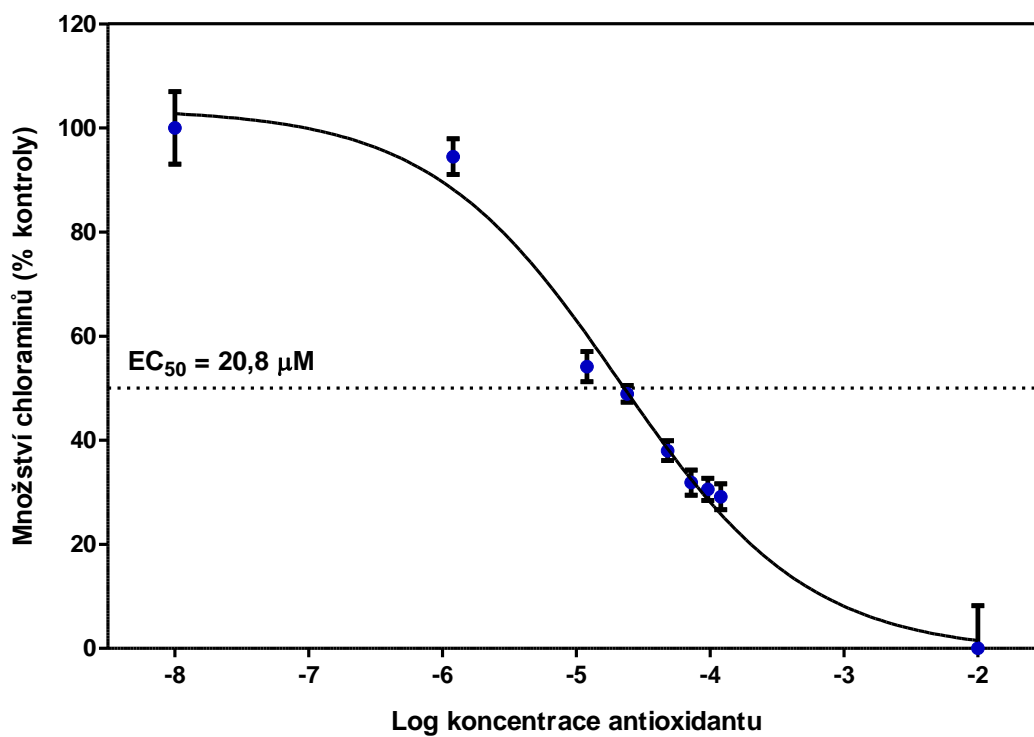


Obr. 10: Stanovení EC₅₀ katechingallátu.

Epikatechingallát

Tab. 8: Vliv epikatechingallátu na vznik chloraminů a jeho vychytávací aktivita.

Vzorek	Chloraminy [% kontroly]	SD [%]	Vychytávací aktivita [%]
oxidovaná kontrola	100,00	6,96	-
nativní kontrola	0	8,23	-
1,2 μM AOX	94,5	3,42	13,32
12 μM AOX	54,13	2,88	50,82
24 μM AOX	48,92	1,60	55,67
48 μM AOX	37,99	1,91	65,81
72 μM AOX	31,87	2,42	71,49
96 μM AOX	30,55	2,14	72,71
120 μM AOX	29,15	2,48	74,02

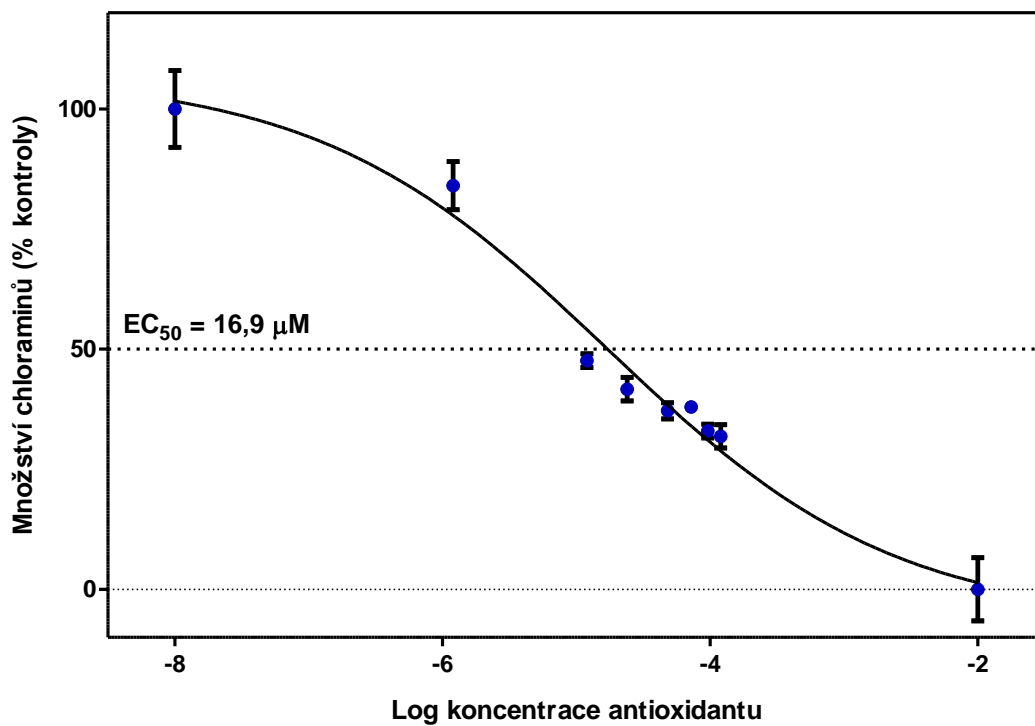


Obr. 11: Stanovení EC₅₀ epikatechingallátu.

Gallokatechingallát

Tab. 9: Vliv gallokatechingallátu na vznik chloraminů a jeho vychytávací aktivita.

Vzorek	Chloraminy [% kontroly]	SD [%]	Vychytávací aktivita [%]
oxidovaná kontrola	100,00	8,00	-
nativní kontrola	0	6,58	-
1,2 μM AOX	84,06	5,01	15,94
12 μM AOX	47,58	1,44	52,42
24 μM AOX	41,68	2,45	58,32
48 μM AOX	37,17	1,66	62,83
72 μM AOX	38,00	1,15	62,03
96 μM AOX	32,95	1,41	67,05
120 μM AOX	31,87	2,43	68,13

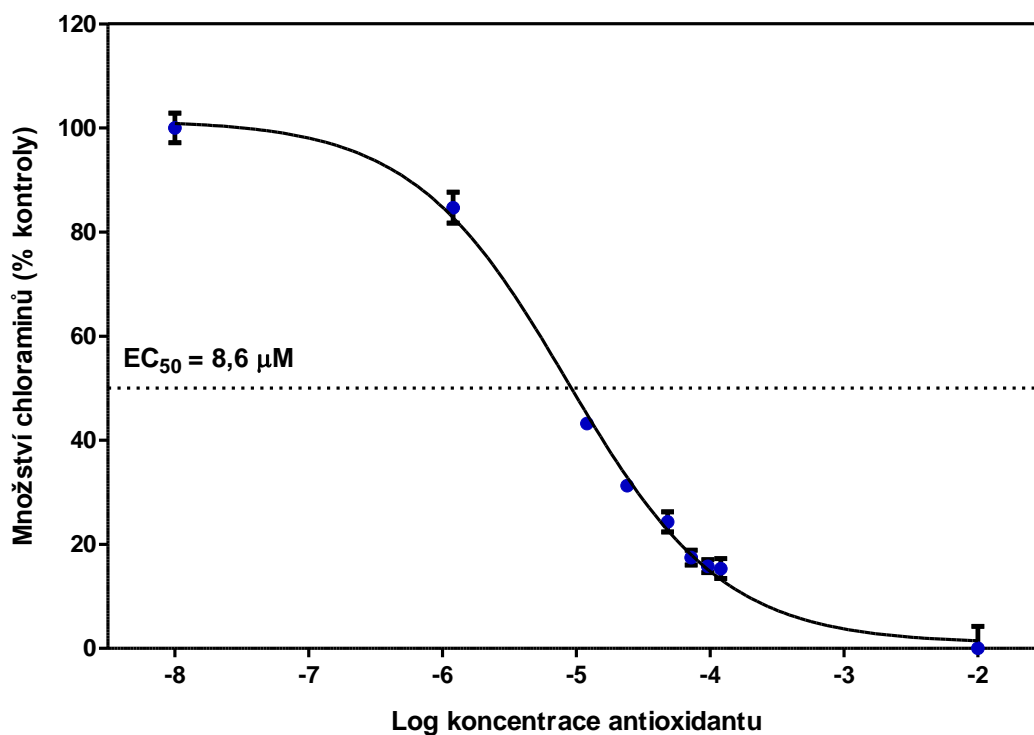


Obr. 12: Stanovení EC₅₀ gallokatechingallátu.

Epigallokatechingallát

Tab. 10: Vliv epigallokatechingallátu na vznik chloraminů a jeho vychytávací aktivita.

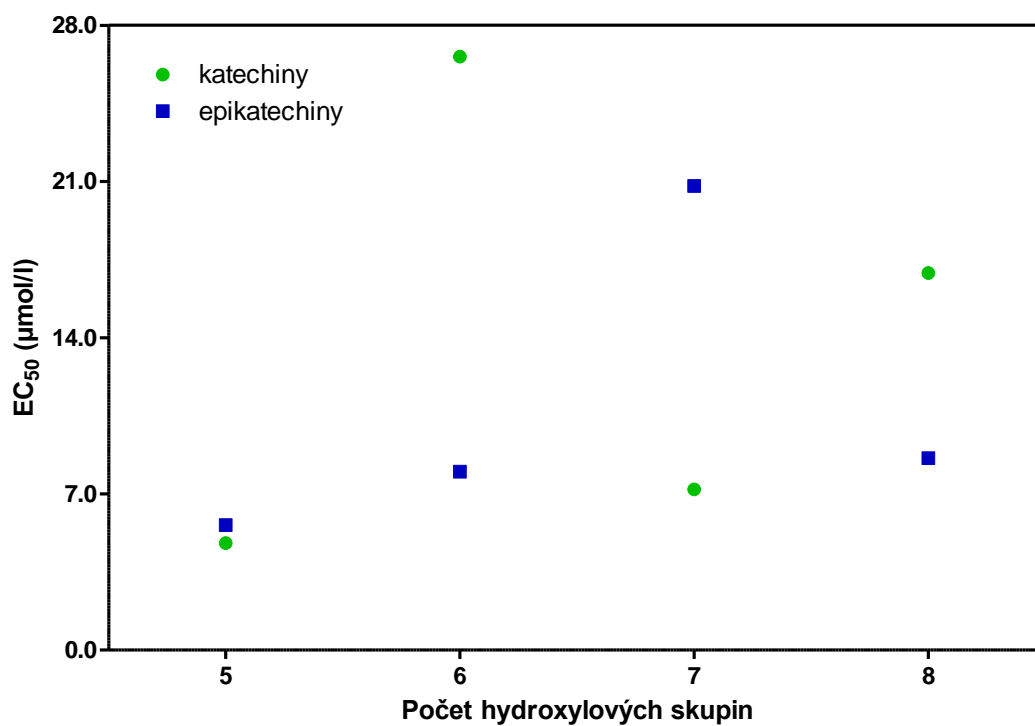
Vzorek	Chloraminy [% kontroly]	SD [%]	Vychytávací aktivita [%]
oxidovaná kontrola	100,00	2,84	-
nativní kontrola	0	4,25	-
1,2 μM AOX	84,68	2,98	20,00
12 μM AOX	43,23	0,98	67,35
24 μM AOX	31,27	1,11	81,02
48 μM AOX	24,30	1,93	88,98
72 μM AOX	17,45	1,43	96,80
96 μM AOX	15,80	1,23	98,70
120 μM AOX	15,33	1,89	99,22



Obr. 13: Stanovení EC₅₀ epigallokatechingallátu.

Tab. 11: Vztah mezi počtem hydroxylových skupin a hodnotou EC_{50} u jednotlivých derivátů katechinu.

Počet OH skupin	EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)	
	Katechiny	Epikatechiny
5	4,8	5,6
6	26,6	8,0
7	7,2	20,8
8	16,9	8,6



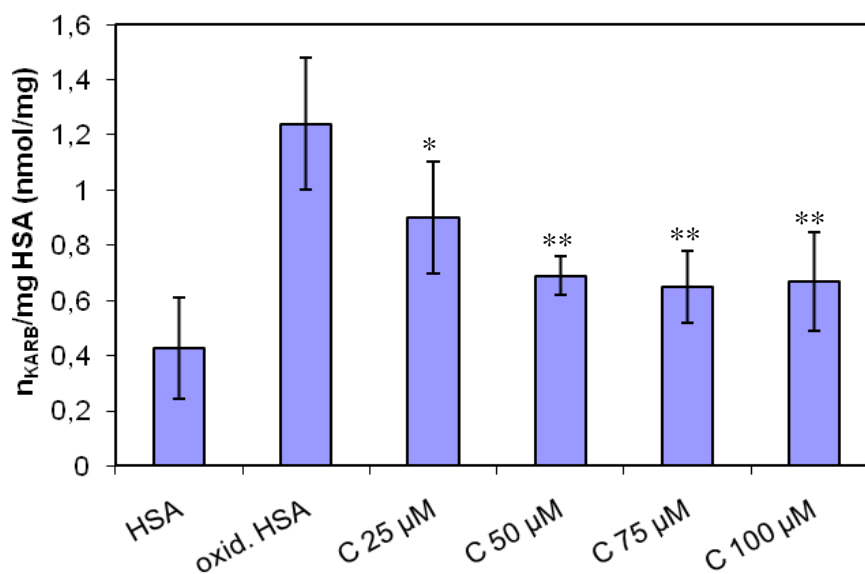
Obr. 14: Vyhodnocení závislosti EC_{50} na počtu OH skupin u katechinů a epikatechinů.

5.2 Spektrofotometrické stanovení karbonylových skupin

Touto metodou jsem studovala protektivní vliv jednotlivých derivátů katechinu proti oxidačnímu poškození HSA kyselinou chlornou. Sledovaným parametrem byla koncentrace vznikajících karbonylových skupin na miligram HSA. (Obr. 15-22). Všechny katechiny jsem studovala v koncentracích 0-100 μM . Výsledky jsem hodnotila pomocí Studentova nepárového *t*-testu s pravděpodobností 95% ($p < 0,05$) a 99% ($p < 0,01$).

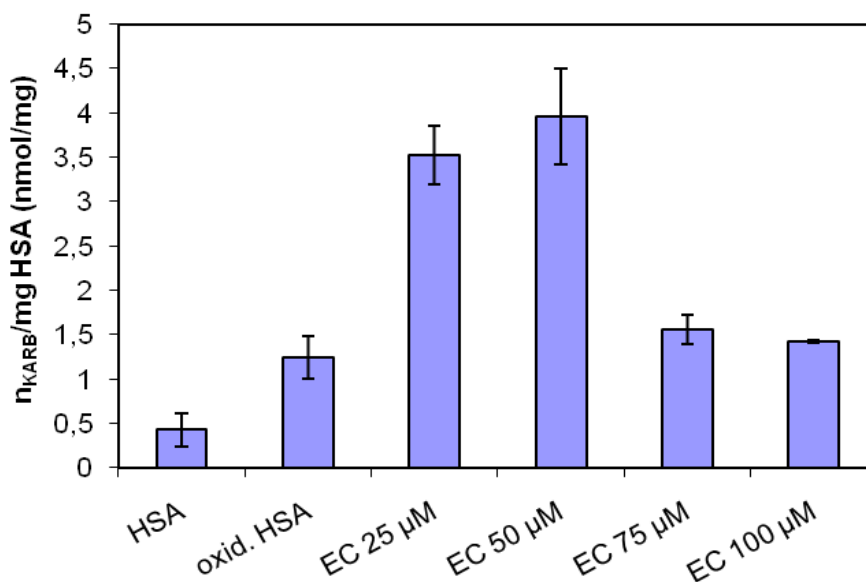
Největší vychytávací schopnost měl katechin, který byl v koncentraci 100 μM schopen snížit vznik karbonylových skupin o 70,2% ve srovnání s oxidovanou kontrolou. Ze získaných výsledků se zdá, že *trans* isomery (katechiny) měly větší ochranný účinek než odpovídající *cis* isomery (epikatechiny). U epikatechinů se projevoval spíše prooxidační účinek a to často již v nejnižší studované koncentraci (25 μM).

Katechin



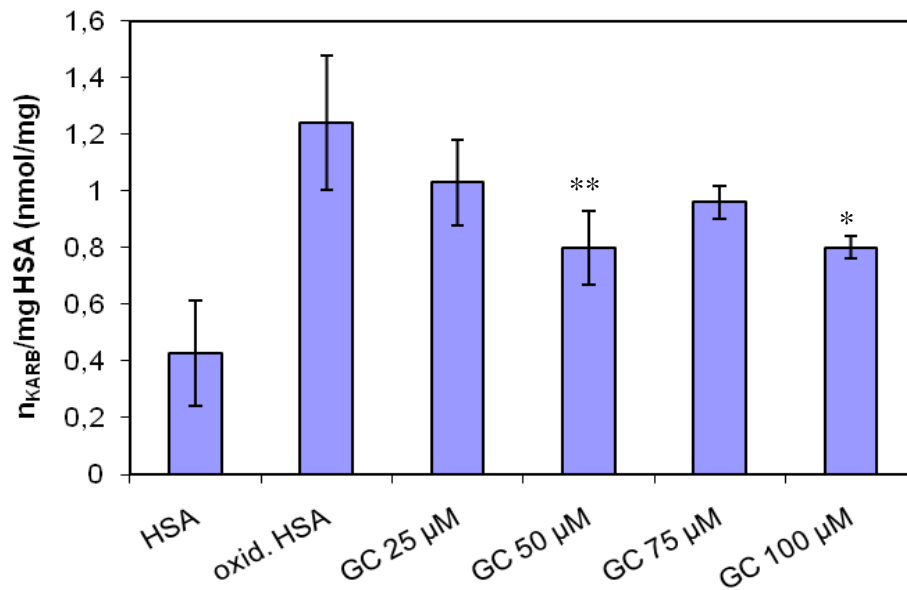
Obr. 15: Vliv katechinu na vznik karbonylových skupin. Studentův nepárový *t*-test, * $p < 0,05$ a ** $p < 0,01$.

Epikatechin



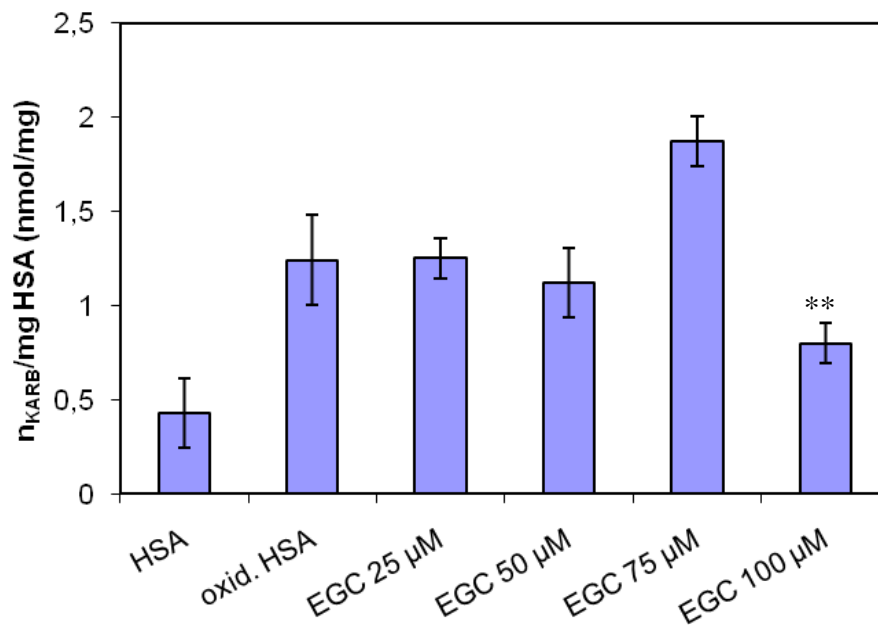
Obr. 16: Vliv epikatechinu na vznik karbonylových skupin.

Gallokatechin



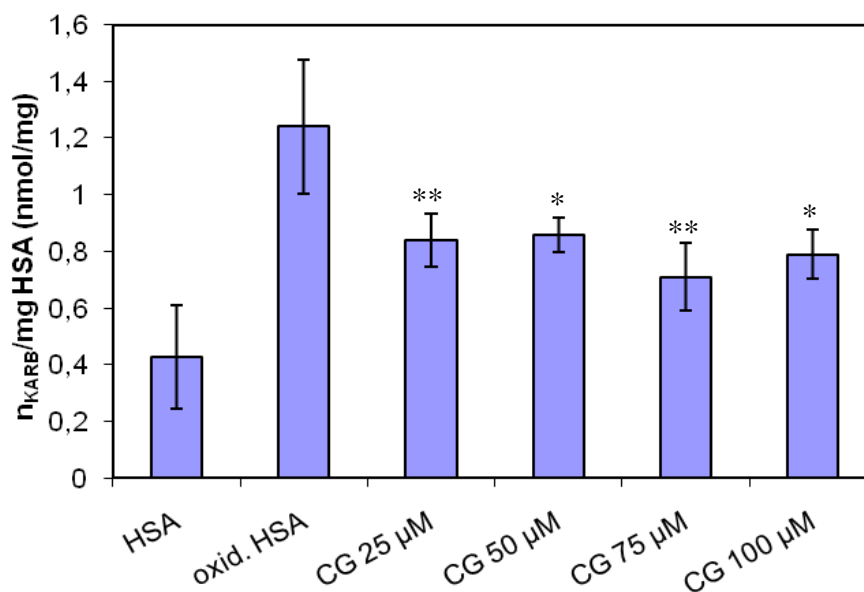
Obr. 17: Vliv gallokatechinu na vznik karbonylových skupin. Studentův nepárový t -test, $*p < 0,05$ a $**p < 0,01$.

Epigallokatechin



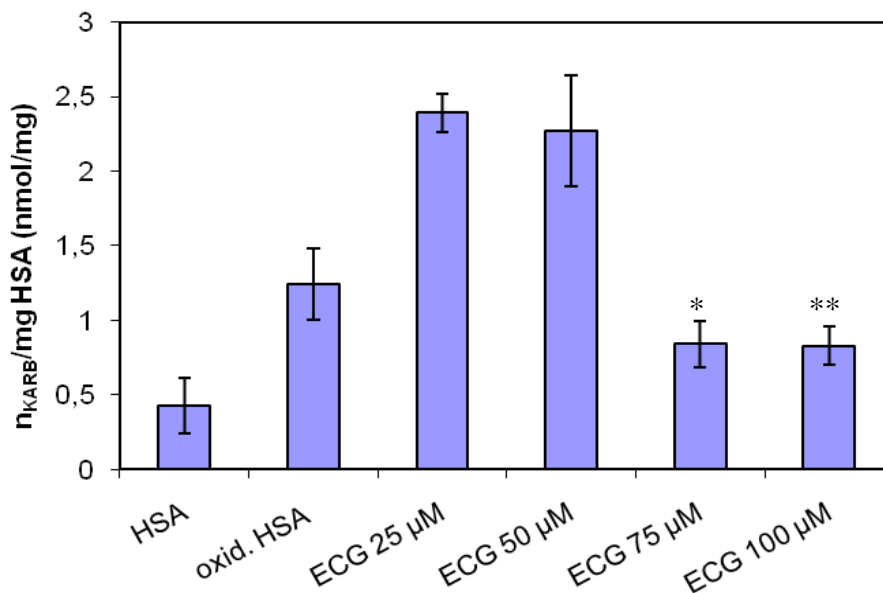
Obr. 18: Vliv epigallokatechinu na vznik karbonylových skupin. Studentův nepárový t -test, $**p < 0,01$.

Katechingallát



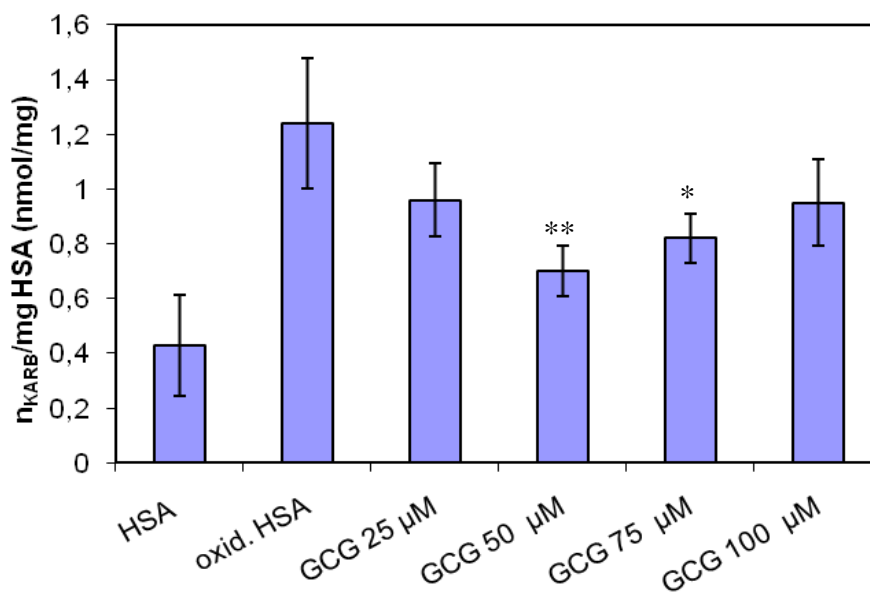
Obr. 19: Vliv katechingallátu na vznik karbonylových skupin. Studentův nepárový t -test, $*p < 0,05$ a $**p < 0,01$.

Epikatechingallát



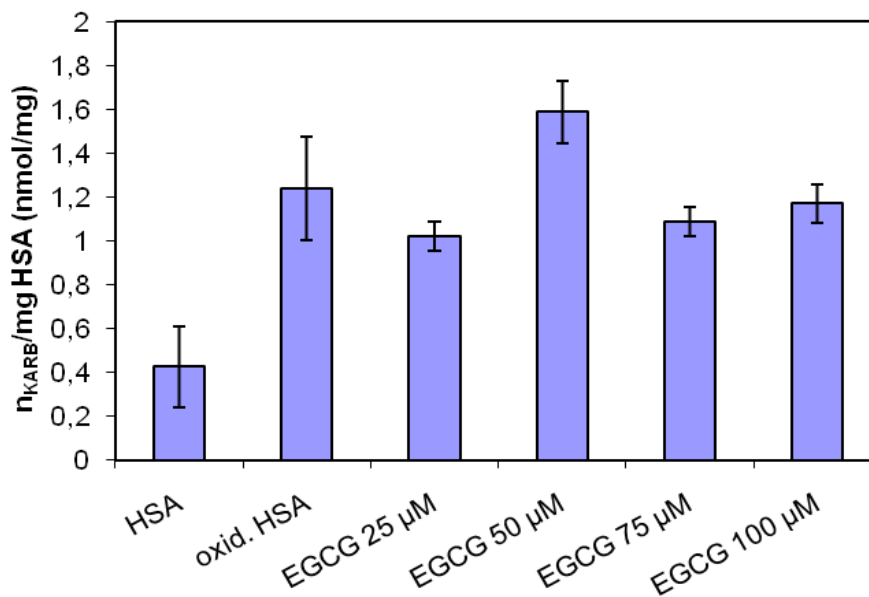
Obr. 20: Vliv epigallokatechinu na vznik karbonylových skupin. Studentův nepárový t -test, $*p < 0,05$ a $**p < 0,01$.

Gallokatechingallát



Obr. 21: Vliv gallokatechingallátu na vznik karbonylových skupin. Studentův nepárový *t*-test, * $p < 0,05$ a ** $p < 0,01$.

Epigallokatechingallát



Obr. 22: Vliv epigallokatechingallátu na vznik karbonylových skupin.

5.3 Elektroforesa a Imunoblotting

Touto metodou jsem studovala protektivní vliv jednotlivých derivátů katechinu proti oxidačnímu poškození HSA kyselinou chlornou. Sledovaným parametrem u nativní PAGE byla relativní mobilita (Rf), u SDS-PAGE jsem sledovala případnou agregaci či fragmentaci molekuly HSA pomocí relativní molekulové hmotnosti proteinu a u imunoblottingu s chemiluminiscenční detekcí jsem hodnotila vznik karbonylových skupin v molekule HSA. Všechny katechiny jsem studovala v koncentracích 100 μM .

5.3.1 Nativní PAGE

V úvodu elektroforetických experimentů jsem nejprve optimalizovala podmínky nativní PAGE (tj. koncentraci proteinu v inkubační směsi, koncentraci kyseliny chlorné, přítomnost/nepřítomnost Troloxu v inkubační směsi, teplotu a délku inkubace). Hodnotila jsem relativní mobilitu (Rf) jednotlivých vzorků, neboť při oxidaci HSA kyselinou chlornou by mělo docházet ke změnám v náboji molekuly proteinu a rozšiřování původního bandu provázeného poklesem jeho denzity (Grippa et al. 2000). Relativní mobilita (Rf) je vzdálenost neznámé bílkoviny od startu/vzdálenost čela od startu.

Nejprve jsem používala HSA 2 mg/ml s HOCl o koncentraci 0-24,8 μM (Obr. 23-25, Tab. 12-14), očekávané změny v hodnotě Rf a denzitě proužků nenastaly, takže jsem postupně snížila koncentraci HSA na 1 mg/ml a poté na 0,5 mg/ml (Obr. 26, Tab. 15). Ani v tomto případě jsem nepozorovala žádné výrazné změny v Rf a denzitě proužků, proto jsem zvýšila koncentraci HOCl na 0-73,3 μM . (Obr. 27-29, Tab. 16-18). Pozitivní vliv na změny v denzitě proužků měla délka a teplota inkubace. Nejvýraznější změny byly patrné při 24 hodinové a 96 hodinové inkubaci při 37°C. (Obr. 28-29, Tab. 17-18). Zjistila jsem, že přítomnost/nepřítomnost Troloxu v inkubačních směsích nemá zásadní vliv na denzitu proužků. (Obr. 24-25, Tab. 13-14). Nanášené množství bílkoviny bylo vždy 8 μg /jamku. Vzhledem k příliš malým změnám v migraci oxidovaného HSA jsem upustila od použití katechinů.

Nejprve jsem do inkubačních směsí používala HOCl o koncentraci 0-297 μM . Výsledná koncentrace HOCl v inkubační směsi je uvedena v následující tabulce.

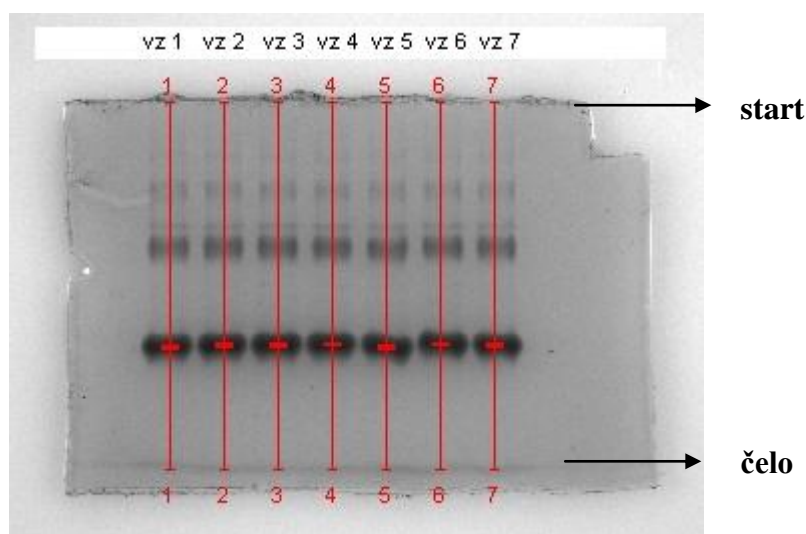
vzorek	Výchozí koncentrace HOCl [μM]	Výsledná koncentrace HOCl [μM]
1	0	0
2	66	5,5
3	132	11
4	165	13,75
5	198	16,5
6	264	22
7	297	24,8

Po několika experimentech jsem zjistila, že se hodnota R_f nemění a zvýšila jsem koncentraci HOCl na 0-880 μM . Výsledná koncentrace HOCl v inkubační směsi je uvedena v následující tabulce.

vzorek	Výchozí koncentrace HOCl [μM]	Výsledná koncentrace HOCl [μM]
1	0	0
2	330	27,5
3	440	36,7
4	550	45,8
5	660	55
6	770	64
7	880	73,3

Tab. 12: Složení inkubačních směsí pro nativní PAGE a dosažená hodnota Rf.

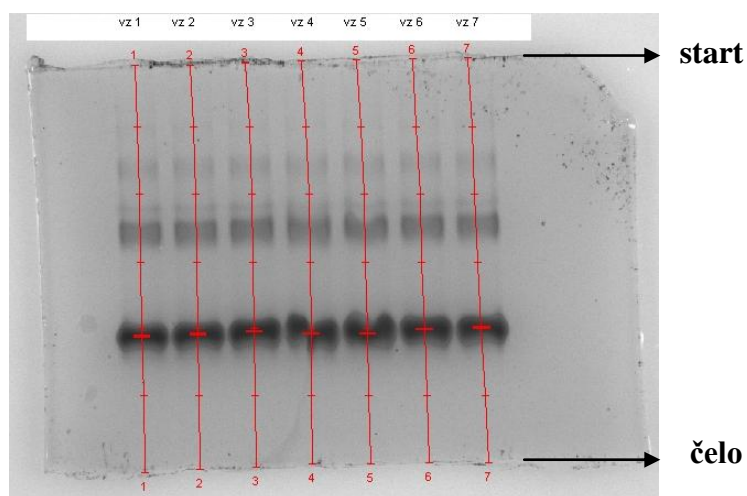
vzorek	HSA mg/ml	HOCl [μ M]	Trolox [μ M]	Hodnota Rf
1	1,7	0	500	0,692
2	1,7	5,5	500	0,690
3	1,7	11	500	0,691
4	1,7	13,75	500	0,688
5	1,7	16,5	500	0,710
6	1,7	22	500	0,687
7	1,7	24,8	500	0,695



Obr. 23: Nativní PAGE pro HSA 2 mg/ml oxidovaný HOCl 0-24,8 μ M. Vzorky byly inkubovány za přítomnosti Troloxu 500 μ M při 22°C po dobu 15 minut. Koncentrace zaostřovacího a separačního gelu byla 4% a 7,5%, nanášené množství bílkoviny bylo 8 μ g/jamku, barvení Coomassie Blue G250.

Tab. 13: Složení inkubačních směsí pro nativní PAGE a dosažená hodnota Rf.

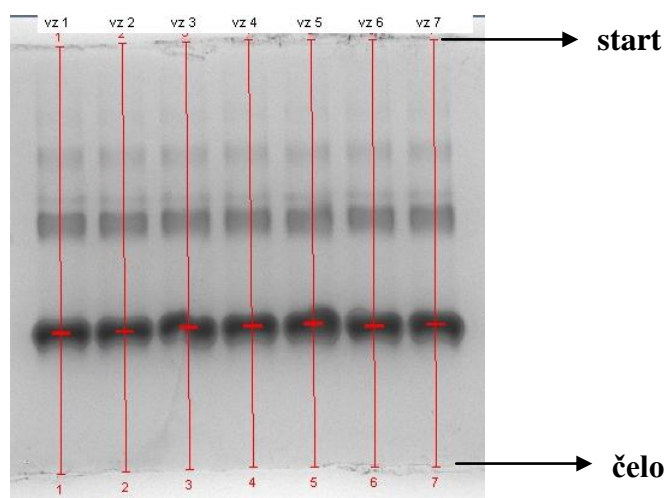
vzorek	HSA mg/ml	HOCl [μM]	Trolox [μM]	Hodnota Rf
1	1,7	0	-	0,667
2	1,7	5,5	-	0,668
3	1,7	11	-	0,665
4	1,7	13,75	-	0,678
5	1,7	16,5	-	0,679
6	1,7	22	-	0,670
7	1,7	24,8	-	0,666



Obr. 24: Nativní PAGE pro HSA 2 mg/ml oxidovaný HOCl 0-24,8 μ M. Vzorky byly inkubovány v nepřítomnosti Troloxu při 22°C po dobu 1 hodiny. Koncentrace zaostřovacího a separačního gelu byla 4% a 7,5%, nanášené množství bílkoviny bylo 8 μ g/jamku, barvení Coomassie Blue G250.

Tab. 14: Složení inkubačních směsí pro nativní PAGE a dosažená hodnota Rf.

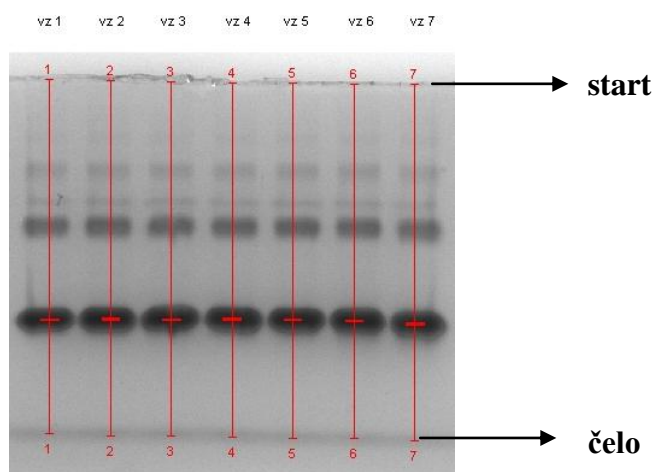
vzorek	HSA mg/ml	HOCl [μ M]	Trolox [μ M]	Hodnota Rf
1	1,7	0	500	0,669
2	1,7	5,5	500	0,671
3	1,7	11	500	0,666
4	1,7	13,75	500	0,669
5	1,7	16,5	500	0,663
6	1,7	22	500	0,669
7	1,7	24,8	500	0,664



Obr. 25: Nativní PAGE pro HSA 2 mg/ml oxidovaný HOCl 0-24,8 μ M. Vzorky byly inkubovány za přítomnosti Troloxu 500 μ M při 22°C po dobu 1 hodiny. Koncentrace zaostřovacího a separačního gelu byla 4% a 7,5%, nanášené množství bílkoviny bylo 8 μ g/jamku, barvení Coomassie Blue G250.

Tab. 15: Složení inkubačních směsí pro nativní PAGE a dosažená hodnota Rf.

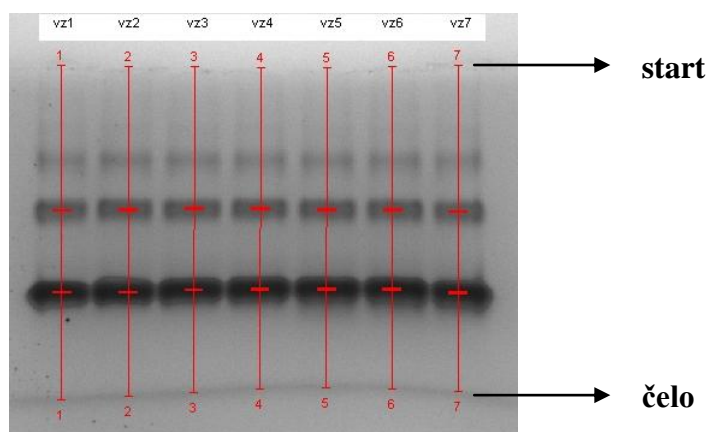
vzorek	HSA mg/ml	HOCl [μ M]	Trolox [μ M]	Hodnota Rf
1	0,42	0	500	0,677
2	0,42	5,5	500	0,672
3	0,42	11	500	0,671
4	0,42	13,75	500	0,667
5	0,42	16,5	500	0,666
6	0,42	22	500	0,668
7	0,42	24,8	500	0,673



Obr. 26: Nativní PAGE pro HSA 0,5 mg/ml oxidovaný HOCl 0-24,8 μ M. Vzorky byly inkubovány za přítomnosti Troloxu 500 μ M při 37°C po dobu 2 hodin. Koncentrace zaostřovacího a separačního gelu byla 4% a 7,5%, nanášené množství bílkoviny bylo 8 μ g/jamku, barvení Coomassie Blue G250.

Tab. 16: Složení inkubačních směsí pro nativní PAGE a dosažená hodnota Rf.

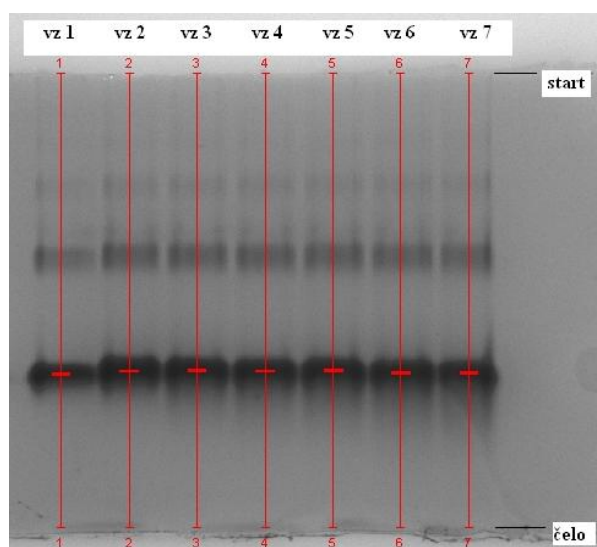
vzorek	HSA mg/ml	HOCl [μ M]	Trolox [μ M]	Hodnota Rf
1	0,42	0	500	0,677
2	0,42	27,5	500	0,685
3	0,42	36,7	500	0,685
4	0,42	45,8	500	0,690
5	0,42	55	500	0,693
6	0,42	64	500	0,689
7	0,42	73,3	500	0,697



Obr. 27: Nativní PAGE pro HSA 0,5 mg/ml oxidovaný HOCl 0-73,3 μ M. Vzorčky byly inkubovány za přítomnosti Troloxu 500 μ M při 37°C po dobu 20 minut. Koncentrace zaostřovacího a separačního gelu byla 4% a 7,5%, nanášené množství bílkoviny bylo 8 μ g/jamku, barvení Coomassie Blue G250.

Tab. 17: Složení inkubačních směsí pro nativní PAGE a dosažená hodnota Rf.

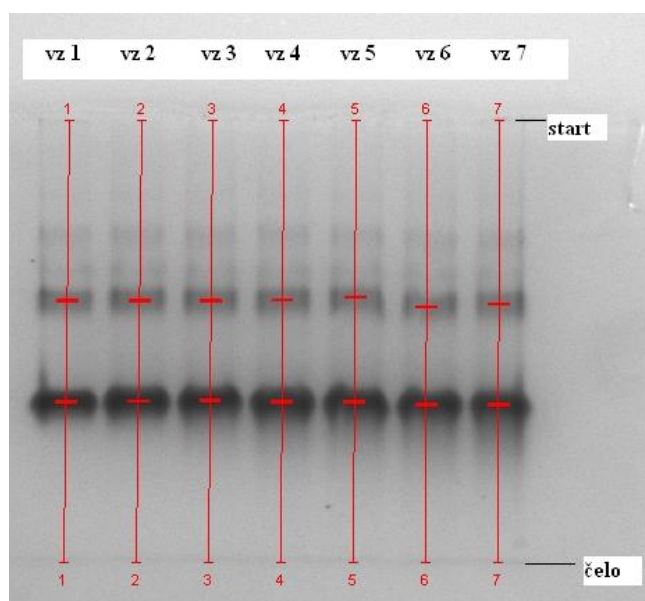
vzorek	HSA mg/ml	HOCl [μ M]	Trolox [μ M]	Hodnota Rf
1	0,42	0	500	0,661
2	0,42	27,5	500	0,655
3	0,42	36,7	500	0,653
4	0,42	45,8	500	0,656
5	0,42	55	500	0,655
6	0,42	64	500	0,659
7	0,42	73,3	500	0,659



Obr. 28: Nativní PAGE pro HSA 0,5 mg/ml oxidovaný HOCl 0-73,3 μ M. Vzorky byly inkubovány za přítomnosti Troloxu 500 μ M při 37°C po dobu 24 hodin. Koncentrace zaostřovacího a separačního gelu byla 4% a 7,5%, nanášené množství bílkoviny bylo 8 μ g/jamku, barvení Coomassie Blue G250.

Tab. 18: Složení inkubačních směsí pro nativní PAGE a dosažená hodnota Rf.

vzorek	HSA mg/ml	HOCl [μM]	Trolox [μM]	Hodnota Rf
1	0,42	0	500	0,637
2	0,42	27,5	500	0,635
3	0,42	36,7	500	0,633
4	0,42	45,8	500	0,637
5	0,42	55	500	0,637
6	0,42	64	500	0,642
7	0,42	73,3	500	0,642



Obr. 29: Nativní PAGE pro HSA 0,5 mg/ml oxidovaný HOCl 0-73,3 μ M. Vzorky byly inkubovány za přítomnosti Troloxu 500 μ M při 37°C po dobu 96 hodin. Koncentrace zaostřovacího a separačního gelu byla 4% a 7,5%, nanášené množství bílkoviny bylo 8 μ g/jamku, barvení Coomassie Blue G250.

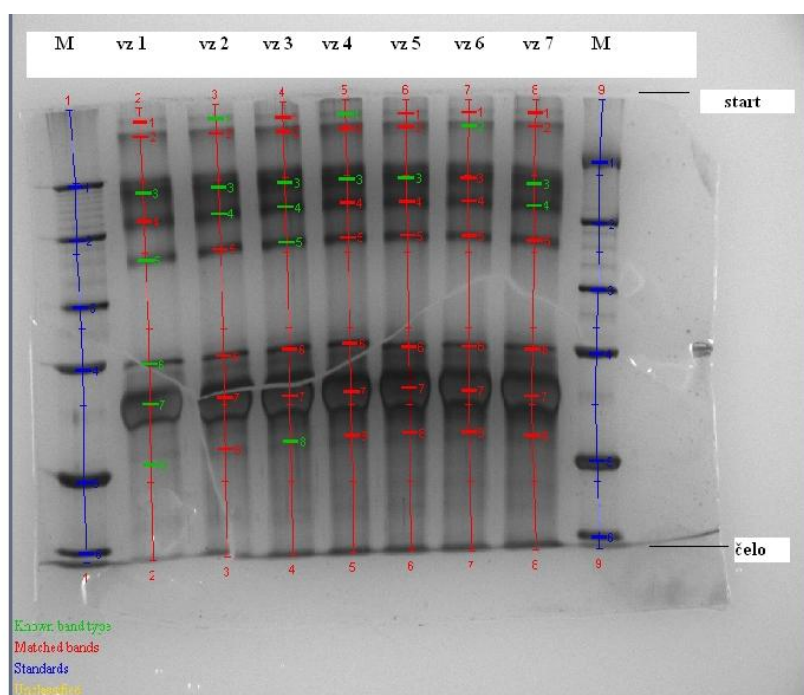
5.3.2 SDS-PAGE a Imunoblotting

Pomocí SDS-PAGE jsem sledovala vznik vysokomolekulárních komplexů, které vznikly sřetěžením molekul HSA po oxidaci kyselinou chlornou. K přípravě inkubačních směsí jsem použila stejnou koncentraci HSA a HOCl (HSA 0,5 mg/ml s HOCl 0-73,3 μ M) (Tab. 19). i stejné podmínky inkubace (4 dny, 37°C) jako v případě poslední nativní PAGE, protože u tohoto uspořádání jsem pozorovala vliv HOCl na náboj molekuly HSA. Do jamky jsem nanášela 4 μ g proteinu. Po provedení SDS-PAGE jsem nenalezla významný rozdíl mezi oxidovaným a nativním HSA (Obr. 30, Tab. 20), proto jsem v dalších experimentech s katechiny nepokračovala.

Pro sledování účinku katechinů na vznik karbonylových skupin jsem použila imunoblotting (Tab. 21) s chemiluminiscenční detekcí, což je vysoce citlivá a specifická metoda. Bohužel ani při imunoblottingu jsem nenalezla rozdíl mezi oxidovaným a nativním HSA a účinek katechinů se tedy nepodařilo prokázat. Na RTG filmu (Obr. 31 a 33) jsem našla proužky o přibližné molekulové hmotnosti 66 kDa (HSA), 140 kDa, 200 kDa a > 250 kDa. Poslední tři zmiňované proužky by mohly patřit vysokomolekulárním agregátům HSA, ale našla jsem je i v nativní kontrole. Membrány jsem po chemiluminiscenční detekci ještě obarvila pomocí barviva Ponceau S (Obr. 32 a 34).

Tab. 19: Složení inkubačních směsí pro SDS-PAGE.

vzorek	HSA mg/ml	HOCl [μ M]	Trolox [μ M]
1	0,42	0	500
2	0,42	27,5	500
3	0,42	36,7	500
4	0,42	45,8	500
5	0,42	55	500
6	0,42	64	500
7	0,42	73,3	500



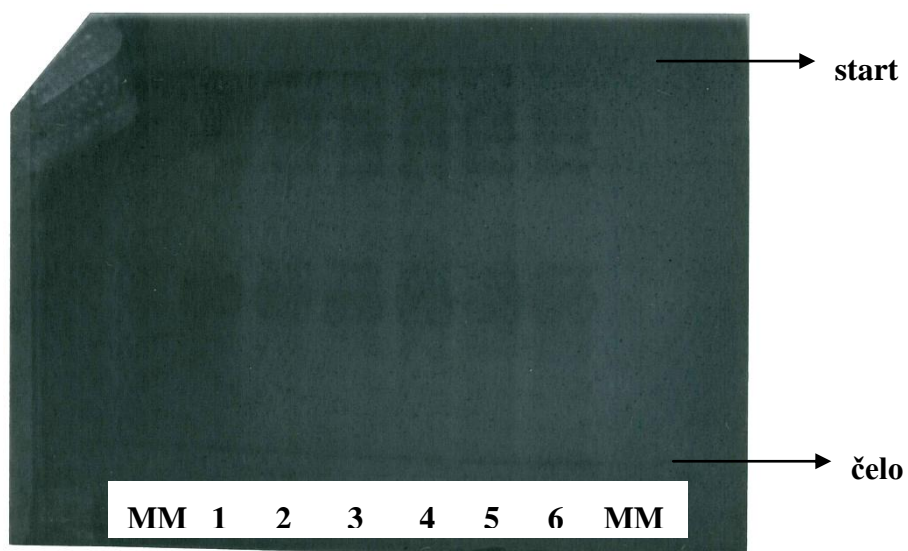
Obr. 30: SDS-PAGE pro HSA 0,5 mg/ml oxidovaný HOCl 0-73,3 μ M. Vzorky byly inkubovány za přítomnosti Troloxu 500 μ M při 37°C po dobu 96 hodin. Koncentrace zaostřovacího a separačního gelu byla 4% a 7,5%, nanášené množství bílkoviny bylo 4 μ g/jamku, barvení Silver Staining, molekulový marker Precision Plus.

Tab. 20: Molekulová hmotnost jednotlivých proužků na SDS-PAGE. Hodnoceno pomocí programu QuantityOne.

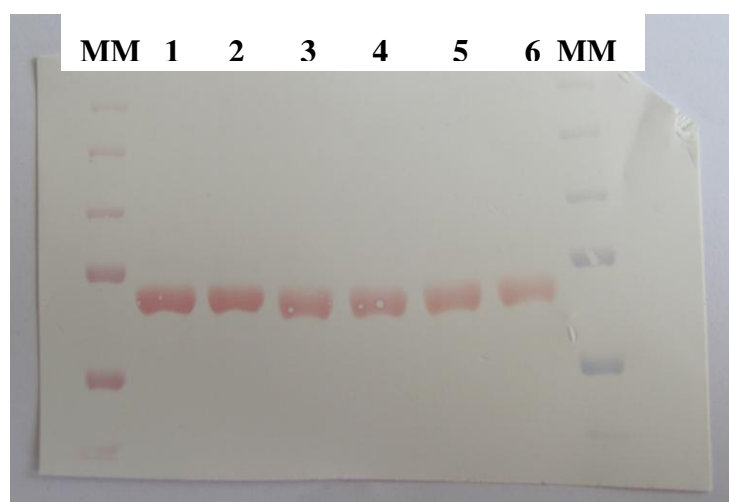
Band	Relativní molekulová hmotnost proteinu (kDa)						
	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5	Vzorek 6	Vzorek 7
1	428,4	422,3	418,5	422,3	417,8	432,6	437,5
2	369,0	363,8	359,0	360,2	356,4	370,0	374,7
3	212,9	212,9	212,9	212,9	212,9	219,7	212,9
4	184,0	186,2	186,2	186,3	184,8	188,9	186,2
5	136,3	137,7	136,3	137,0	137,7	139,0	138,2
6	76,0	76,2	76,0	76,9	75,7	76,3	75,9
7	65,5	65,3	64,2	64,4	65,2	64,6	63,3
8	52,5	54,6	55,1	55,6	55,9	55,9	55,1

Tab. 21: Složení vzorků pro imunoblotting.

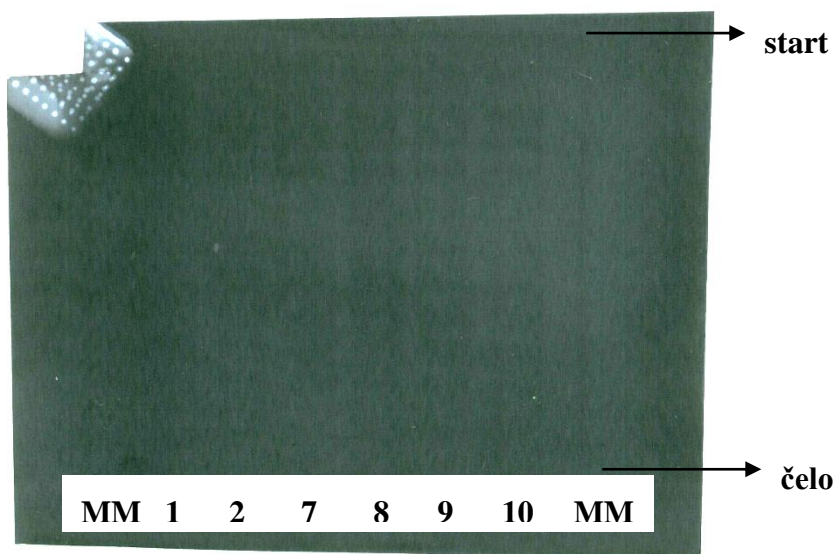
Vzorek č.	Složení inkubační směsi	HSA mg/ml	AOX [μM]	HOCl [μM]	Trolox [μM]
1	Nativní kontrola	0,42	-	-	500
2	Oxidovaná kontrola	0,42	-	73,3	500
3	HSA + HOCl + C	0,42	8	73,3	500
4	HSA + HOCl + EC	0,42	8	73,3	500
5	HSA + HOCl + GC	0,42	8	73,3	500
6	HSA + HOCl + EGC	0,42	8	73,3	500
7	HSA + HOCl + Cg	0,42	8	73,3	500
8	HSA + HOCl + ECg	0,42	8	73,3	500
9	HSA + HOCl + GCg	0,42	8	73,3	500
10	HSA + HOCl + EGCg	0,42	8	73,3	500



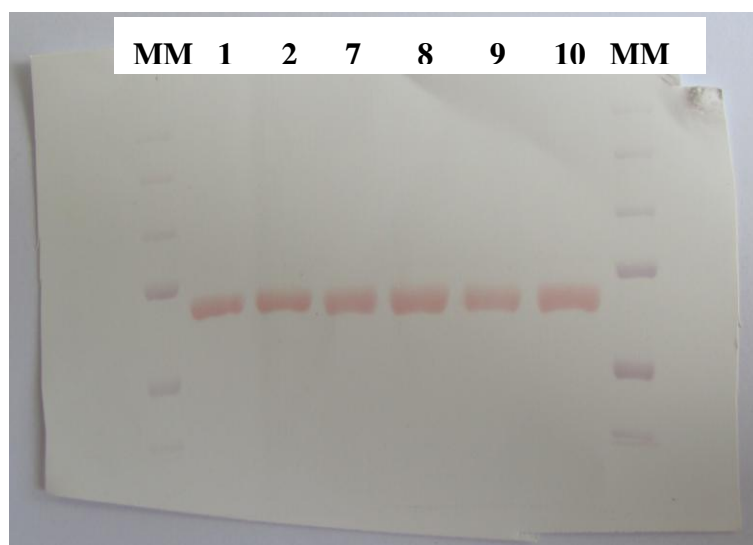
Obr. 31: RTG film po imunoblottingu pro HSA 0,5 mg/ml oxidovaný HOCl 73,3 μ M. Vzorky byly inkubovány za přítomnosti katechinů 8 μ M a Troloxu 500 μ M při 37°C po dobu 15 minut.



Obr. 32: Membrána po imunoblottingu pro HSA 0,5 mg/ml oxidovaný HOCl 73,3 μ M. Vzorky byly inkubovány za přítomnosti katechinů 8 μ M a Troloxu 500 μ M při 37°C po dobu 15 minut. Koncentrace zaostřovacího a separačního gelu byla 4% a 7,5%, nanášené množství bílkoviny bylo 4 μ g/jamku, barvení Ponceau S, molekulový marker Precision Plus.



Obr. 33: RTG film po imunoblottingu pro HSA 0,5 mg/ml oxidovaný HOCl 73,3 μ M. Vzorky byly inkubovány za přítomnosti katechinů 8 μ M a Troloxu 500 μ M při 37°C po dobu 15 minut.



Obr. 34: Membrána po imunoblottingu pro HSA 0,5 mg/ml oxidovaný HOCl 73,3 μ M. Vzorky byly inkubovány za přítomnosti katechinů 8 μ M a Troloxu 500 μ M při 37°C po dobu 15 minut. Koncentrace zaostřovacího a separačního gelu byla 4% a 7,5%, nanášené množství bílkoviny bylo 4 μ g/jamku, barvení Ponceau S, molekulový marker Precision Plus.

6. DISKUZE

Teoretická část této práce byla zaměřena zejména na oxidační stres, poškození jednotlivých biomolekul se zaměřením na proteiny, ale i na fyziologické funkce reaktivních forem kyslíku a v neposlední řadě také na antioxidační terapii. Dále v této části diplomové práce uvádím flavonoidy jako významné přírodní antioxidanty. V experimentální části jsem sledovala vznik oxidačních produktů při oxidaci albuminu kyselinou chlornou *in vitro* a ovlivnění tohoto procesu antioxidanty přírodního původu (flavonoidy ze skupiny katechinů). Jako oxidační činidlo jsem používala kyselinu chlornou v různých koncentracích.

Kyselina chlorná je reaktivní sloučenina, patřící do skupiny slabých kyselin. Její schopnost oxidačním způsobem destruovat strukturu proteinů byla popsána již v mnoha publikacích (Štípek 2002, Hawkins a Davies 1998, Summers et al. 2008). Hlavní výhodou použití HOCl jako oxidačního činidla je velmi krátká doba inkubace potřebná k vytvoření oxidačních produktů (pouze několik minut). Kyselinu chlornou jsem používala v několika koncentracích podle použité metody. Při stanovení vzniku chloraminů jsem albumin oxidovala 43,2 μM HOCl, při stanovení karbonylových skupin pak 10,5 μM , při sledování vlivu HOCl na náboj molekuly HSA pomocí nativní PAGE jsem nejprve používala koncentrace 0-24,8 μM a později 0-73,3 μM . Poslední zmíněnou koncentrací HOCl jsem použila i při sledování agregace a fragmentace molekuly proteinu pomocí SDS-PAGE a při sledování vzniku karbonylových skupin pomocí imunoblottingu s chemiluminiscenční detekcí.

Jako modelovou bílkovinu jsem zvolila **lidský sérový albumin**, což je nejvíce zastoupená bílkovina krevní plazmy. Jeho molekula je tvořena jediným polypeptidovým řetězcem složeným z 585 aminokyselin a obsahujícím 17 intramolekulárních disulfidickými můstky (Peters 2006). HSA jsem používala v koncentracích 0,24 mg/ml (stanovení chloraminů), 0,7 mg/ml (stanovení karbonylů), 0,42 mg/ml (SDS-PAGE a imunoblotting) a 1,7 mg/ml, 0,83 mg/ml a 0,42 mg/ml (nativní PAGE).

Katechiny jsou rostlinné polyfenolické sloučeniny, které se vyskytují ve vyšších koncentracích ve fazolích, hroznech, višních, hruškách a čokoládě (Ďuračková 2008). Nejvýznamnějším a nejbohatším přírodním zdrojem je však nepochybně zelený čaj. Hlavními katechiny z čaje jsou epigallokatechin, epikatechin, epikatechingallát a

epigallokatechingallát, který je též nejdůležitější aktivní složkou čaje. Tyto sloučeniny jsou zodpovědné za pozitivní účinky zeleného čaje v prevenci či léčbě různých onemocnění (diabetes mellitus, rakovina, neurodegenerativní onemocnění). Mají též antioxidační, protizánětlivé, antimikrobiální a antivirové účinky (Basu, Lucas 2007, Wolfram 2007). Jedním z cílů této práce bylo objasnit, zda jsou tyto sloučeniny schopné ochránit HSA před oxidačním poškozením. Používala jsem katechiny v následujících koncentracích: 30 μ M-3 mM (stanovení chloraminů), 25-100 μ M (stanovení karbonylů) a 100 μ M (imunoblotting).

Průběh vzniku oxidačních produktů jsem sledovala pomocí spektrofotometrických a elektroforetických metod.

Při spektrofotometrickém stanovení chloraminů jsem studovala protektivní vliv jednotlivých derivátů katechinů na oxidaci HSA kyselinou chlornou. Sledovaným parametrem byla koncentrace vznikajících chloraminů. Výsledky prezentuji ve formě grafů a tabulek. Z grafu závislosti logaritmu koncentrace antioxidantu na jeho aktivitě jsem získala hodnoty EC_{50} jednotlivých katechinů. Z naměřených hodnot a grafů vyplývá, že největší vychytávací schopnost a tedy i nejmenší hodnotu EC_{50} měl katechin ($EC_{50} = 4,8 \mu$ M). Pořadí, ve kterém stoupala antioxidační aktivita katechinů bylo následující: GC > ECg > GCg >> EGCg > EGC > Cg > EC > C. Stejná metoda byla dříve použita ke stanovení antioxidačního účinku dalších flavonoidů ze skupiny flavonů, flavanolů a flavanonů. Jediným testovaným zástupcem flavanolů byl katechin (Firuzi et al. 2004). Výsledky jsou prezentovány pomocí hodnot EC_{25} . Antioxidační aktivita klesá (a EC_{25} tedy vzrůstá) v pořadí katechin, quercetin, taxifolin, baikalein, hesperetin, naringenin, apigenin, rutin, fisetin, 3-hydroxyflavon, hesperidin a 7-hydroxyflavon. Autoři popsali, že pro antioxidační účinek je rozhodující přítomnost hydroxylové skupiny v poloze 3 v kruhu C, zatímco 2,3-dvojná vazba v kruhu C nemá na antioxidační účinek žádný vliv. Z mnou dosažených výsledků plyne, že nejsilnějším antioxidantem byl trans isomer katechin, který obsahuje pouze 5 hydroxylových skupin v molekule. Se zvyšujícím se počtem hydroxylových skupin klesala antioxidační účinnost jednotlivých katechinů.

Spektrofotometrické stanovení karbonylových skupin jsem provedla na základě metody popsané Levinem et al. (1990) s některými úpravami (Yan et al. 1996). Karbonylové skupiny vzniklé během oxidace proteinů jsou derivatizovány pomocí 2,4-dinitrofenylhydrazinu, který se váže na karbonylovou skupinu a mění se na hydrazon. Ten zbarví měřený roztok dožluta a dá se fotometricky stanovit při 360 nm. Naměřené hodnoty jsem zpracovala do grafů. Sledovaným parametrem byla koncentrace vznikajících karbonylových skupin na miligram HSA. Největší vylučovací schopnost měl opět katechin, který byl v koncentraci 100 μM schopen snížit vznik karbonylových skupin o 70,2% ve srovnání s oxidovanou kontrolou. Ze získaných výsledků se zdá, že *trans* isomery (katechiny) měly větší ochranný účinek než odpovídající *cis* isomery (epikatechiny). U epikatechinů se projevoval spíše prooxidační účinek a to často již v nejnižší studované koncentraci (25 μM).

Elektroforetickými metodami lze sledovat jak změny v náboji molekuly proteinu způsobené oxidací (nativní PAGE) tak vznik vysokomolekulárních agregátů vzniklých zesíťtím molekul proteinů vlivem oxidačního činidla (SDS-PAGE a imunoblotting). Výsledky jsou rozděleny po jednotlivých experimentech a jsou zdokumentovány na obrázcích naskenovaných na přístroji GelDoc XR. Pro lepší přehlednost jsou výsledky dokumentovány formou tabulky popisující složení inkubačních směsí a příslušné hodnoty relativní mobility (nativní PAGE) a molekulové hmotnosti (SDS-PAGE).

V úvodních experimentech s **nativní PAGE** jsem se snažila optimalizovat podmínky elektroforetické separace oxidovaného HSA pomocí metody popsané Grippou et al. (2000). Tato skupina popsala snížení denzity a změny v R_f u HSA oxidovaného různými koncentracemi kyseliny chlorné. Markantní změny v denzitě a R_f HSA pozorovali již po 15 minutách inkubace s kyselinou chlornou při laboratorní teplotě. I přes četné změny inkubačních podmínek (teplota a délka inkubace, koncentrace kyseliny chlorné a HSA), které jsem v průběhu experimentální práce provedla, jsem nedosáhla podobných výsledků. Proto jsem se rozhodla tuto metodu opustit a nestudovat vliv katechinů.

U **SDS–PAGE** jsem použila stejné koncentrace kyseliny chlorné a HSA (0-73,3 μM HOCl a 0,42 mg/ml HSA) i podmínky inkubace (96 hodin, 37°C) jako u posledního experimentu s nativní PAGE. Nicméně jsem nezaznamenala ani agregaci ani fragmentaci oxidovaného proteinu. Protože se oxidované vzorky nelišily od nativní kontroly, tak jsem k použití katechinů nepřistoupila.

V poslední části elektroforetických experimentů jsem sledovala vliv jednotlivých katechinů na vznik karbonylových skupin pomocí **imunoblottingu s chemiluminiscenční detekcí**. Koncentrace HSA byla 0,42 mg/ml, HOCl 73,3 μM a katechinů 8,3 μM . Bohužel ani u tohoto citlivého stanovení jsem nenalezla rozdíl mezi oxidovanou a nativní kontrolou a všechny vzorky obsahující katechiny měly stejnou skladbu jako kontroly.

Ze získaných výsledků stanovení chloraminů a karbonylových skupin jsou patrné pozitivní účinky studovaných katechinů. Vztah mezi strukturou a účinkem není jednoznačně patrný, i když se zdá, že trans deriváty s volnou hydroxylovou skupinou v poloze 3 v kruhu C mají vyšší účinek než odpovídající substituované deriváty (galláty). Při elektroforetických metodách se nepodařilo prokázat změnu v molekule HSA vlivem oxidace kyselinou chlornou ani pozitivní účinky jednotlivých katechinů.

7. ZÁVĚR

- 1) Podařilo se mi optimalizovat metodu na stanovení chloraminů, které vznikají při oxidaci proteinů kyselinou chlornou.
 - a) Sledovala jsem závislost účinku osmi přírodních derivátů katechinu na jejich koncentraci a podařilo se mi získat hodnoty EC₅₀. Nejefektivnějším scavengerem kyseliny chlorné byl katechin, jehož EC₅₀ byla 4,8 μM. Z výsledků vyplývá, že celkově vyšší antioxidační aktivitu měly *trans* isomery (katechiny).

- 2) Nejprve jsem hledala vhodnou koncentraci kyseliny chlorné pro další experimenty a pak jsem s touto koncentrací prováděla všechny experimenty s antioxidanty.
 - a) Zvolila jsem výslednou 10,5 μM koncentraci HOCl.
 - b) Nejefektivnějším antioxidantem byl opět katechin, který v koncentraci 100 μM dokázal snížit vznik karbonylových skupin o 70,2%. U derivátů epikatechinu (*cis* deriváty) se projevoval spíše prooxidační účinek.

- 3) Nepodařilo se mi prokázat významný vliv kyseliny chlorné na elektroforetickou migraci oxidovaného HSA ani nalézt produkty agregace či fragmentace. Kyselina chlorná způsobila jen malé rozšíření proužku obsahujícího HSA a to až po 96 hodinové inkubaci při 37°C (nativní PAGE). Nenalezla jsem významný rozdíl mezi nativním a oxidovaným HSA (SDS-PAGE). Ani při imunoblottingu jsem nenalezla rozdíl mezi oxidovaným a nativním HSA a účinek katechinů se tedy nepodařilo prokázat.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	absorbance
AA	akrylamid
Ab	protilátka
Ab-AP	protilátka s navázanou alkalickou fosfatase
AGE	koncové produkty pokročilé glykace
ANCA	protilátky proti cytoplazmě neutrofilních leukocytů
AOPP	produkty pokročilé oxidace proteinů
AOX	antioxidant
AP	alkalická fosfatasa
AP-pufr	pufr pro alkalickou fosfatasu
A _{PB}	absorbance vzorku bez DNPH (slepého vzorku)
APS	persíran amonný
A _{VZ}	absorbance měřeného vzorku
BFB	bromfenolová modř
bisAA	bis-akrylamid
c	molární koncentrace
C	Katechin
CBBG	Coomassie Brilliant Blue G-250
CG	Katechingallát
DM	diabetes mellitus
DNPH	2,4-dinitrofenylhydrazin
DTNB	5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina)
EC	Epikatechin
EC ₅₀	poloviční efektivní koncentrace
ECG	Epikatechingallát
EGC	Epigallokatechin
EGCG	Epigallokatechingallát
ELFO	elektroforesa

GC	Gallokatechin
GCG	Gallokatechingallát
G6PD	glukosa-6-fosfátdehydrogenase
HDL	high density lipoprotein
4-HNE	4-hydroxynonenal
HOCl	roztok kyseliny chlorné
HMW	high molecular weight
HSA	lidský sérový albumin (human serum albumin)
iNOS	indukovatelná syntasa oxidu dusnatého
l	tloušťka absorbující vrstvy
LDL	low density lipoprotein
LMW	low molecular weight
LO	lipidový alkoxylový radikál
LOO	lipidový alkylperoxylový radikál
M	marker
n	látkové množství
NADPH	redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
NaOCl (6-14%)	zásobní roztok kyseliny chlorné
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforesa
PEG	polyethylenglykol
PVDF	polyvinylidenfluorid
R _f	relativní mobilita
ROS	reactive oxygen species
RNS	reactive nitrogen species
RONS	reactive oxygen and nitrogen species
SDS	laurylsíran sodný (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	denaturující polyakrylamidová gelová elektroforesa
TCA	kyselina trichloroctová
TBS	TRISový pufr (TRIS buffered saline)

TBST	TRISový pufr obsahující Tween-20
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid
Trolox	hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina
Tween 20	polyoxyethylensorbitanmonolaurát
V	objem měřeného vzorku
VLDL	very low density lipoprotein
vz	vzorek

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Basu A, Lucas E A (2007) *Mechanism and effects of green tea on cardiovascular health.* Nutr. Rev. 65. 361-375

Beneš L (2008) Antioxidancia. *Prakt lékáren.* 4(4): 183-185 (převzato z Vejvalková H 2009)

Boušová I (2006) *Natural compounds with potential antioxidant activity, in vitro study in a model of protein glycooxidation.* Disertační práce

Ďuračková Z (1998) *Vol'né radikály a antioxidanty v medicíne (I).* 1. vydání. Slovak Academic Press. s. 285

Ďuračková Z (1999) *Vol'né radikály a antioxidanty v medicíne (II).* 1. vydání. Slovak Academic Press. s. 315

Ďuračková Z (2008) *Príroda a zdravie človeka (Prírodné látky a ich význam v prevencii a liečbe ochorení).* Slovak Academic Press. s. 288

Firuzi et al. (2004) *Hypochlorite scavenging activity of flavonoids.* JPP. 56(6): 801-807

Grippa et al. (2000) *In vitro evaluation of antioxidant activity by electrophoresis and high performance liquid chromatography.* Biochim Biophys Acta 1524(2-3): 171-7

Hawkins CL, Davies MJ (1998) *Hypochlorite-induced damage to proteins: formation of nitrogen-centred radicals from lysine residues and their role in protein fragmentation.* Biochem J. 332 (Pt3): 617-25

Kalousová M (2004) *Habilitační a Inaugurační přednášky na 1. lékařské fakultě UK v Praze: Produkty pokročilé glykace a oxidace*. 1. vyd. Praha. Česká Republika: Galén. s 233 (převzato z Vejvalková H 2009).

Khan N, Mukhtar H (2007) *Tea polyphenols for health promotion*. Life Sci. 81: 519-533

Ledvina M, Stoklasová A, Cerman J (2006) *Biochemie pro studující medicíny II. díl*. Karolinum. s. 281-562

Ledvina M, Stoklasová A, Cerman J (2006) *Biochemie pro studující medicíny I. díl*. Karolinum. s. 5-274

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

Ohsawa K, Ebata N (1983) *Silver stain for detecting 10-fentogram quantities of protein after polyacrylamide gel electrophoresis*. Anal Biochem. 135(2): 409-15

Peters (1996) *All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications*. Academic Press

Racek J (2003) *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění*. Galén. s. 89

Spilková J, Dušek J (1996) *Vybrané přírodní látky s antioxidační aktivitou*. Čes Slov Farm. 45(6): 293-301

Summer et al (2008) *Evaluation of a „direct-compariso“ approach to automatic switching in omnidirectional/directional hearing aids*. J Am Acad Audiol. 19(9): 708-20

Štípek S a kol. (2000) *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing. s. 314

Wolfram S (2007) *Effects of green tea and EGCG on cardiovascular and metabolic health*. J. Am. Coll. Nutr. 26: 373S-388S

Yan et al (1995) *Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins*. Anal Biochem. 228(2): 349-51