

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd



**Vliv hydroxyskořicových kyselin na glykaci  
proteinů methylglyoxalem**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2009

Hana Vejvalková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. 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 odborné vedení, cenné rady a pomoc a také za trpělivost při zpracování této práce.

# **ABSTRAKT**

Vypracovala: Hana Vejvalková

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

Název: Vliv hydroxyskořicových kyselin na glykaci proteinů methylglyoxalem

Školitel: PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Diplomová práce byla zaměřena na potenciální antiglykační vliv antioxidantů přírodního původu (hydroxyskořicových kyselin) na modifikaci bovinního sérového albuminu a aspartátaminotransferasy vlivem methylglyoxalu jako glykačního činidla. Vliv hydroxyskořicových kyselin na vznik glykačních produktů jsem sledovala pomocí fluorescenčních, absorpčních a elektroforetických metod. Hydroxyskořicové kyseliny neměly jednoznačný účinek na glykaci modelových bílkovin. Jediným derivátem, u kterého byl prokázán antiglykační účinek na tvorbu nespecifických glykačních produktů a pentosidinu měřených fluorescenčně a spektrofotometricky, byla kyselina *p*-kumarová ve 100  $\mu\text{M}$  koncentraci. Naproti tomu 100  $\mu\text{M}$  kyselina chlorogenová projevovovala silné proglykační účinky ve všech použitých metodách detekce glykačních produktů. Účinek všech testovaných látek byl závislý na použité koncentraci. Z výsledků vyplývá, že čím více substituentů daná kyselina ve své molekule obsahovala, tím silnější proglykační účinek tato látka vykazovala.

# **ABSTRACT**

Author: Hana Vejvalková

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

Title: Influence of hydroxycinnamic acids on methylglyoxal-induced protein glycation

Supervisor: PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

The diploma thesis was aimed at potential antiglycation effect of antioxidants of natural origin (hydroxycinnamic acids) on the modification of bovine serum albumine and aspartate aminotransferase by methylglyoxal as a glycating agent. I monitored the effect of hydroxycinnamic acids on generation of glycation products using fluorescent, absorption, and electrophoretic methods. The influence of hydroxycinnamic acids on the glycation of model proteins was ambiguous. The only derivative with proven antiglycation effect on production of non-specific glycation products and pentosidine measured by fluorescence and spectrophotometry was *p*-coumaric acid in 100  $\mu$ M concentration. On the other hand, chlorogenic acid 100  $\mu$ M displayed strong proglycation effects in all methods used for detection of glycation products. The effect of all tested substances was concentration dependent. Results show that the more substituents given acid contained in its molecule, the stronger proglycation effect this compound exerted.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>2. SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ</b> .....	<b>9</b>
2.1 NEENZYMOVÁ GLYKACE .....	9
2.1.1 Mechanismus neenzymové glykace .....	9
2.1.2 Koncové produkty pokročilé glykace (AGEs).....	12
2.1.2.1 Struktura, vlastnosti a výskyt.....	12
2.1.2.2 Účinky a metabolismus.....	15
2.1.2.3 Ovlivnění vzniku AGEs.....	17
2.1.2.4 Onemocnění spojená se zvýšeným výskytem AGEs.....	17
2.1.3 Methylglyoxal jako glykační činidlo.....	19
2.1.4 Metody používané k detekci AGEs .....	21
2.1.4.1 Chromatografické metody.....	21
2.1.4.2 Fluorescence .....	23
2.1.4.3 Elektroforeza, Imunoblotting .....	24
2.1.4.4 ELISA.....	25
2.1.4.5 Stanovení koncentrace thiolových skupin.....	26
2.2 OXIDAČNÍ STRES .....	27
2.2.1 Antioxidační systém organismu.....	28
2.2.2 Antioxidanty .....	29
2.2.3 Látky fenolické povahy.....	30
2.3 BOVINNÍ SÉROVÝ ALBUMIN .....	34
<b>3. CÍL PRÁCE</b> .....	<b>36</b>
<b>4. MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>37</b>
4.1 MATERIÁL .....	37
4.2 PŘÍSTROJE PRO MĚŘENÍ .....	37
4.3 METODIKA .....	38
4.3.1 Příprava základních reagentů.....	38
4.3.1.1 Příprava pufru .....	38
4.3.1.2 Příprava roztoku proteinu.....	38
4.3.1.3 Příprava roztoku glykačního činidla .....	38
4.3.1.4 Příprava roztoků antioxidantů.....	38
4.3.2 Příprava inkubačních směsí.....	39
4.3.3 Měření fluorescence.....	40
4.3.3.1 Inkubační směsi .....	40
4.3.3.2 Podmínky měření.....	40
4.3.4 Sledování vlivu na absorpční spektrum BSA .....	41
4.3.4.1 Inkubační směsi .....	41
4.3.4.2 Podmínky měření.....	41
4.3.5 Elektroforeza a imunoblotting.....	42
4.3.5.1 Příprava roztoků pro PAGE a polyakrylamidových gelů.....	42
4.3.5.2 Příprava roztoků pro barvení gelů (Silver staining) .....	44
4.3.5.3 Příprava pracovních a barvicích roztoků pro Imunoblotting .....	44
4.3.5.4 Inkubační směsi .....	45
4.3.5.5 Podmínky měření.....	46
<b>5. VÝSLEDKY</b> .....	<b>49</b>
5.1 FLUORESCENČNÍ STANOVENÍ.....	49
5.1.1 Kyselina o-kumarová .....	50
5.1.2 Kyselina m-kumarová.....	53
5.1.3 Kyselina p-kumarová .....	56
5.1.4 Kyselina sinapová .....	59
5.1.5 Kyselina chlorogenová.....	62
5.1.6 Kyselina rozmarýnová.....	65
5.1.7 Kyselina kávová .....	68
5.1.8 Kyselina ferulová .....	71

5.2 UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIE.....	74
5.2.1 <i>Stabilita BSA a vznik glykačních produktů vlivem MGO</i> .....	75
5.2.2 <i>Kyselina o-kumarová</i> .....	78
5.2.3 <i>Kyselina m-kumarová</i> .....	83
5.2.4 <i>Kyselina p-kumarová</i> .....	85
5.2.5 <i>Kyselina sinapová</i> .....	87
5.2.6 <i>Kyselina chlorogenová</i> .....	89
5.2.7 <i>Kyselina rozmarýnová</i> .....	91
5.2.8 <i>Kyselina kávová</i> .....	93
5.2.9 <i>Kyselina ferulová</i> .....	95
5.3 ELEKTROFORESA A IMUNOBLOTTING .....	98
<b>6. DISKUZE .....</b>	<b>108</b>
<b>7. ZÁVĚR .....</b>	<b>115</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>117</b>
<b>9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>120</b>

# 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 několik let pracovníci a diplomanti zabývají problematikou neenzymových glykací a možností ovlivnění tohoto procesu *in vitro*.

Problematika neenzymových glykací je velmi aktuální téma, a to nejen z hlediska neustálého zvyšování počtu metabolických a kardiovaskulárních onemocnění, ale i s ohledem na všeobecné stárnutí populace. Pozdní produkty glykace komplexně poškozují lidský organismus a spolu s oxidačním stresem jsou jednou z mnoha příčin dávaných do souvislosti se vznikem civilizačních chorob. Na základě dílčích závěrů jednotlivých prací se utřídí poznatky a vypracovává se metodika a možnosti detekce AGEs i sledování jejich vlivu na různých modelech glykace. Navazovala jsem na předešlé diplomové práce, ve kterých byly používány rozmanité modely glykace pro hodnocení vlivu jednotlivých antioxidantů. V experimentech jsem jako glykační činidlo používala methylglyoxal, jakožto reaktivní fyziologicky vznikající  $\alpha$ -oxoaldehyd, který se osvědčil již v předchozích pokusech a byla u něj prokázána rychlejší schopnost glykace než u jednoduchých cukrů (Švehlová 2007, Bacílková 2008). V průběhu experimentů byl fluorescenční, elektroforetickou a spektrofotometrickou metodou sledován vliv jednotlivých antioxidantů na modifikaci dvou modelových bílkovin. První z nich byl bovinní sérový albumin (BSA), u kterého se projevila nevhodnost použití daného komerčně dostupného preparátu pro elektroforetické experimenty v důsledku obsažených příměsí. Z tohoto důvodu jsem pro další elektroforetické pokusy použila jako modelovou bílkovinu aspartátaminotransferasu. Tento enzym je komerčně dostupný v čistém stavu a v předešlých pracích se osvědčil i z hlediska stability v podmínkách dlouhodobé inkubace *in vitro*.

Hlavním záměrem diplomové práce bylo sledování potenciálních antiglykačních účinků hydroxyskořicových kyselin v různých koncentracích na modelech glykací *in vitro* pomocí několika metod. Nutnost poznání a prozkoumání všech účinků antioxidantů na jednotlivé biochemické „pochody“ v lidském organismu se stupňuje se zvyšujícím se užíváním těchto látek jakožto „zázračných látek“ v boji proti onemocnění a nezdravému životnímu stylu.



## 2. SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ

Na začátku vypracování své diplomové práce se pokusím shrnout doposud publikované poznatky o problematice neenzymových glykací, tvorbě pozdních produktů glykace (AGEs), vlastnostech a možnostech ovlivnění jejich vzniku. Uvedu také princip metod nejčastěji využívaných k detekci AGEs a krátce se zmíním o antioxidačním systému lidského organismu a možnostech jeho ovlivnění látkami přírodního i syntetického původu. Tímto teoretickým úvodem se budu snažit poskytnout krátké a výstižné seznámení s problematikou neenzymových glykací.

### 2.1 Neenzymová glykace

Tento posttranslační proces vedoucí k nefyziologické modifikaci proteinů a probíhající bez katalytického působení enzymů byl poprvé popsán na počátku 20. století *Louisem Camille Maillardem* (Singh a kol. 2001). Maillard pozoroval vznik žlutohnědého zabarvení roztoku bílkovin zahříváného s cukry, které bylo způsobené nukleofilní adicí aldehydové skupiny cukru a aminoskupiny proteinu (Obšil a Pavlíček 1997).

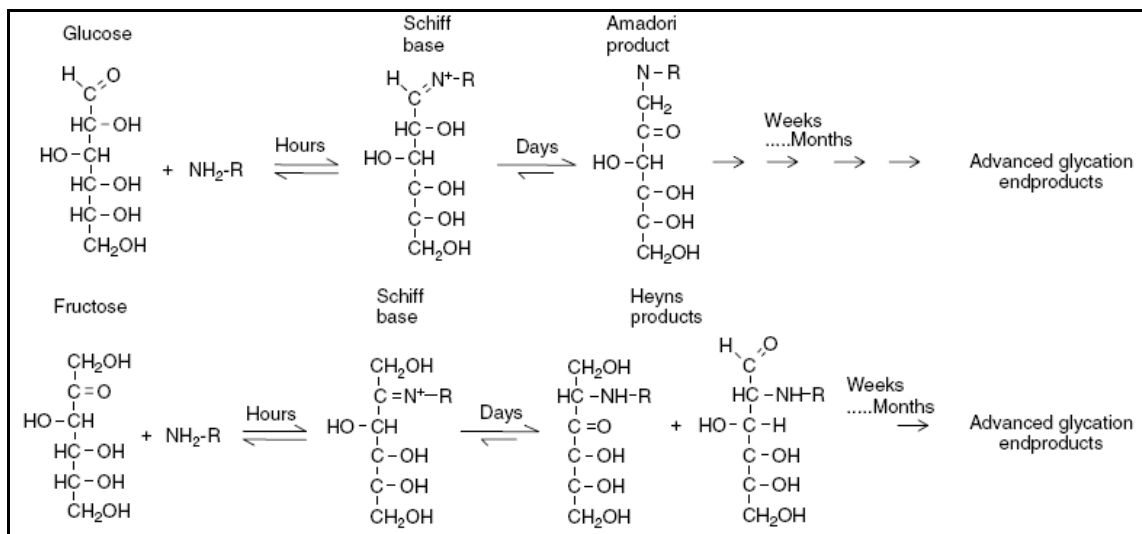
#### 2.1.1 Mechanismus neenzymové glykace

Podstatou neenzymové glykace, jak již bylo dříve zmíněno, je reakce aldehydové skupiny redukujících cukrů (glukosa, fruktosa) nebo  $\alpha$ -dikarboonylových sloučenin s volnou aminoskupinou biomolekul s dlouhým biologickým poločasem (proteiny, lipidy, nukleové kyseliny).

Nejprve dochází k vytvoření nestabilní Schiffovy báze, které spočívá ve vazbě aldehydové skupiny redukujícího cukru na  $\epsilon$ -aminoskupinu lysinu v molekule proteinu. **Schiffova báze (tzv. early glycated product)** se může vyskytovat ve dvou formách, buď jako *aldiminová* s otevřeným řetězcem anebo stabilnější forma s *glykosylaminovým kruhem* (Jakuš 2003).

Po několika hodinách dochází k přesmyku Schiffovy báze na stabilnější **Amadoriho produkty (intermediate glycated product)**, které chemicky představují ketoaminy

s kovalentní vazbou (Jakuš 2003). Heynsův produkt je obdobou Amadoriho produktu, pouze s tím rozdílem, že vzniká při reakci ketosy s bílkovinou (obr. 1).



Obr. 1: Schéma neenzymové glykace při reakci bílkoviny s glukosou a fruktosou (Schalkwijk a kol. 2004).

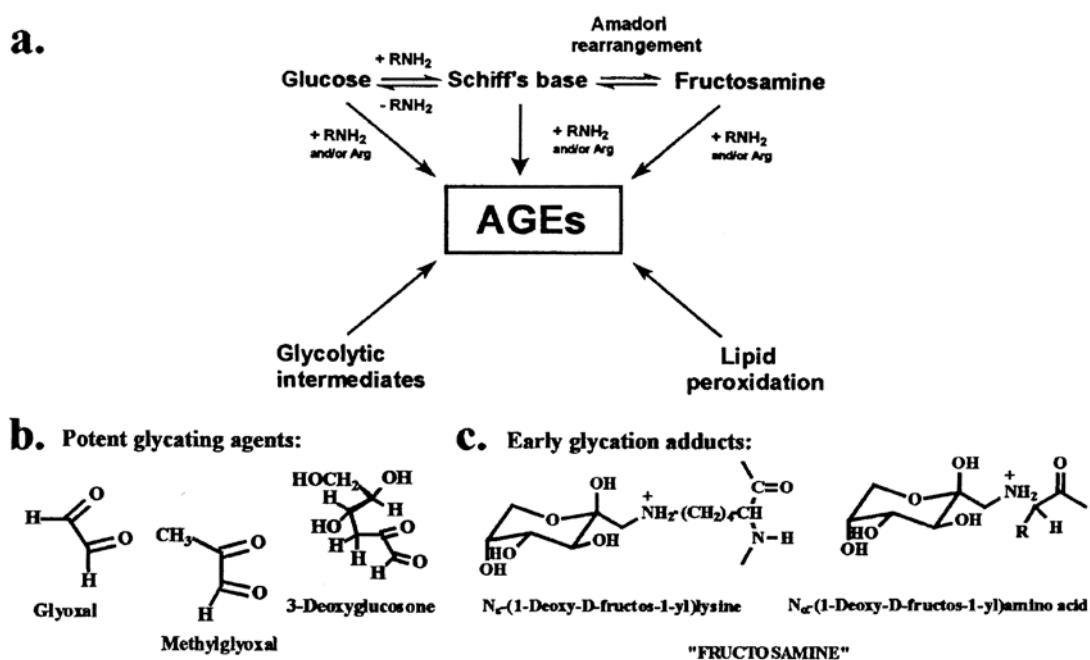
Dalším velmi důležitým procesem celé neenzymové glykace je vznik reaktivních  $\alpha$ -dikarboxylových sloučenin (např. glukoson, 3-deoxyglukoson, methylglyoxal, glyoxal), které vznikají jednak degradací sacharidů a Schiffových bází, dále ve fázi přeskupování Amadoriho produktů i během celého glykoxydačního procesu a jako výsledek metabolismu základních živin (např. oxidačního rozkladu nenasycených mastných kyselin).

- **3-deoxyglukoson (3-deoxy-D-erythro-2-hexulosa)** vzniká neoxidativním přesmykem Amadoriho produktu a také hydrolýzou fruktosa-3-fosfátu jako produktu polyolové cesty (Bohlender a kol. 2005). V průběhu *polyolové cesty* je glukosa přeměněna na sorbitol a dále na fruktosu, která se může přímo rozkládat na 3-deoxyglukoson (3-DG) nebo se nejprve metabolizuje na fruktosa-3-fosfát a dále na 3-DG. Fruktosa se ale také může přímo podílet na glykaci prostřednictvím Heynsových produktů. Společným účinkem těchto sloučenin je potenciace tvorby AGEs (King a Brownlee 1996).
- **Glyoxal** může být vytvořen během dvou odlišných dějů. Takzvaná *Namikiho cesta* zahrnuje lipoperoxidaci a fragmentaci Schiffovy báze a *Wolffova cesta* zase autooxidativní degradaci glukosy za přítomnosti přechodných kovů (Fe, Cu) jako katalyzátorů (Obšil a Pavlíček 1997). Glyoxal může také vznikat při peroxidaci

lipidů a potom je nazýván jako prekurzor koncových produktů peroxidace lipidů (ALEs) (Jakuš 2003).

- **Methylglyoxal** se může tvořit, kromě již zmiňované Namikiho a Wolffovy cesty, také během  $\beta$ -oxidace vícenenasycených mastných kyselin a při anaerobní glykolýze.
- **Glukoson** vzniká přesmykem a oxidací Amadoriho produktů v tzv. *Hodgeho cestě*.

Vznik časných glykačních produktů a AGEs je znázorněn na obr. 2.



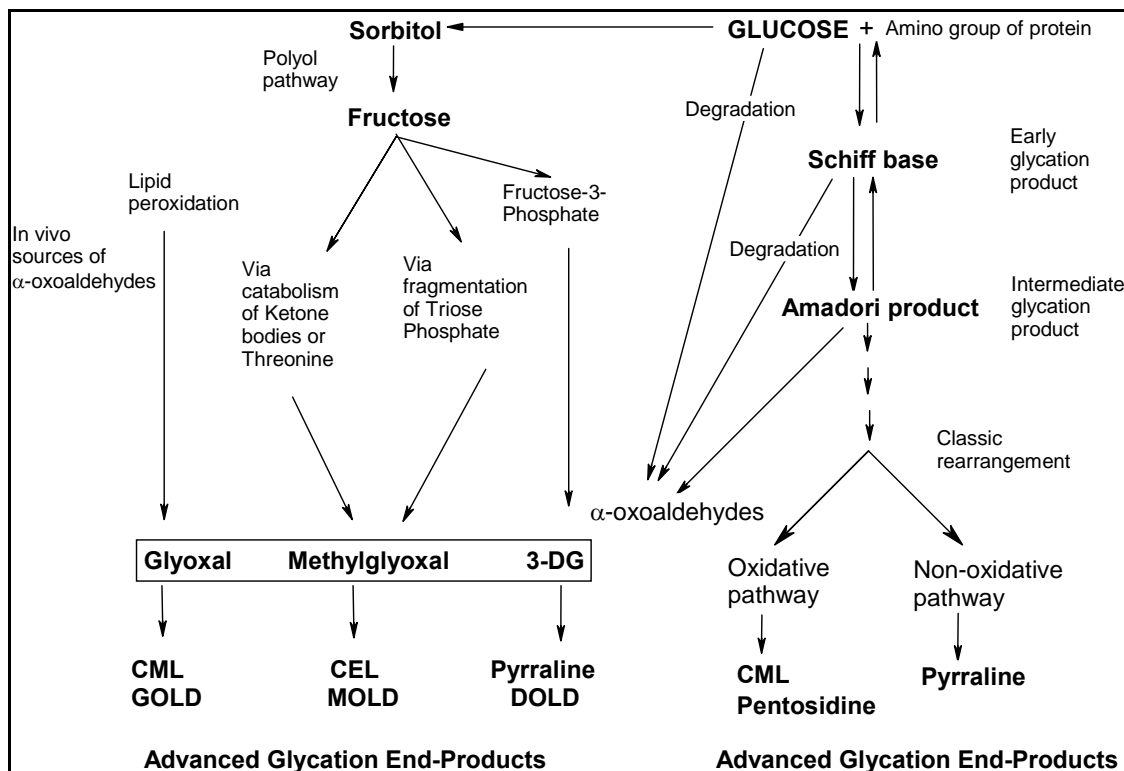
Obr. 2: Vznik časných glykačních aduktů a AGEs.

a) Schéma možností vzniku AGEs v lidském organismu, b) Reaktivní  $\alpha$ -oxoaldehydy ve fyziologickém procesu glykace, c) Zástupci produktů časné glykace (fruktosaminy).

Obrázek byl převzat z článku Ahmed a kol. (2002) a upraven.

Tyto reaktivní meziproducty, označované za ústřední sloučeniny při tvorbě koncových produktů pokročilé glykace (Advanced Glycation End Products – AGEs), propagují společně s Amadoriho produkty Maillardovu reakci a tvoří inter- a intramolekulární můstky (cross-linky), které jsou podstatou nevratných změn v molekulách proteinů a mohou také indukovat oxidační stres a buněčnou apoptózu. Nahromadění  $\alpha$ -dikarboonylových sloučenin v lidském organismu se označuje jako *karboonylový stres* (Singh a kol. 2001).

Při zvýšené koncentraci reaktivních meziproductů se pomalou cyklickou kondenzací, oxidací, dehydratací a přesmyky vytváří za fyziologických podmínek AGEs, a proto se tyto meziproducty souhrnně označují jako *prekurzory AGEs*. Cesty vzniku AGEs jsou uvedeny na obr. 3.



Obr. 3: *Glukosa a cesty vzniku AGE produktů*, které zahrnují polyolovou cestu, AGE vzniklé z  $\alpha$ -oxoaldehydů (Singh a kol. 2001).

## 2.1.2 *Koncové produkty pokročilé glykace (AGEs)*

### 2.1.2.1 *Struktura, vlastnosti a výskyt*

Přestože zatím nebyly objasněny všechny struktury pozdních produktů glykace, byly již popsány sloučeniny umístěné uprostřed nebo na konci řetězců glykací modifikovaných proteinů. Tyto sloučeniny se označují jako *modelové AGEs* (Jakuš 2000).

Pozdní produkty glykace mohou tedy vznikat:

- přeskupováním Amadoriho produktů a následnou oxidací – **CML, pentosidin**
- přeskupováním Amadoriho produktů a neoxidativní cestou – **pyrralin, imidazol**

- reakcí  $\alpha$ -dikarboonylových sloučenin s volnými aminoskupinami proteinů – **CML** a **GOLD** (z glyoxalu); **CEL** a **MOLD** (z methylglyoxalu); **DOLD** a **pyrralin** (z 3-deoxyglukosonu).

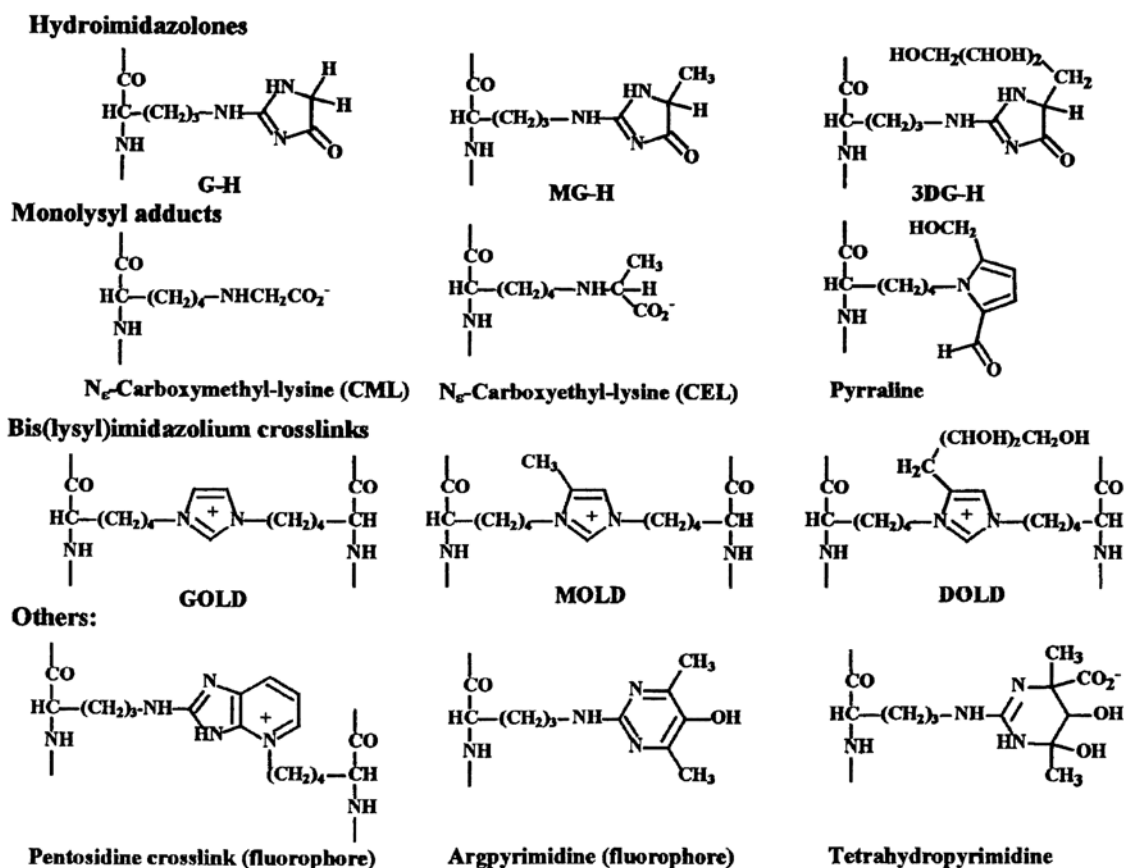
Z výše uvedeného rozdělení je patrné, že jednotlivé AGEs nevznikají pouze jednou cestou, ale tvorby těchto produktů se v organismu účastní více procesů.

Mezi nejlépe popsané struktury, označované jako *biomarkery oxidačního stresu*, můžeme zařadit monolysinový adukt **N- $\epsilon$ -(karboxymethyl)lysin** (CML) a **pentosidin**. Pomocí imunohistochemické metody bylo v souvislosti se stárnutím organismu prokázáno ukládání CML v kůži, plicích, ledvinách, střevech, intervertebrálních discích, artériích a také v pěnových buňkách diabetiků (Schleicher a kol. 1997). *Pentosidin* je fluorescenční AGE produkt, který vzniká spojením lysinového a argininového zbytku v řetězcích bílkovin prostřednictvím pětiuhlíkatého cyklu pentosy, čímž dochází k sřetení molekul bílkovin a k vytvoření intramolekulární sítě. Poprvé byl izolován z mozkové pleny diabetických pacientů (Sell a Monnier 1989).

Glyoxal, methylglyoxal a 3-DG vytvářejí po reakci s dvěma lysinovými zbytky glyoxal-lysinový dimer (**GOLD**), methylglyoxal-lysinový dimer (**MOLD**) a deoxyglukoson-lysinový dimer (**DOLD**) (Jakuš 2003). V plazmě pacientů trpících uremií byl popsán výskyt volného i vázaného **pyrralinu** ( $\epsilon$ -2-formyl-5-hydroxymethyl-pyrol-1-yl)-L-norleucinu), jako hlavního produktu reakce 3-DG s proteiny (Odani a kol. 1996).

Obdobou CML jako biomarkeru oxidačního stresu je karboxymethylethanolamin (**CME**) jako *biomarker modifikace fosfolipidů in vivo* (Requena a kol. 1997). Mezi dále navržené biomarkery patří Maillardův reakční produkt X (**MRX**) – *biomarker hyperglykémie* izolovaný z inkubační směsi cysteinu, argininu a glukosy (Oya a kol. 1998).

Struktury nejvýznamnějších zástupců AGEs jsou uvedeny na obr. 4.



Obr. 4: Přehled základních zástupců AGEs rozdělených podle struktury (Ahmed a kol. 2002).

Proteiny modifikované glykací mají pozměněnou většinu svých *fyzikálně-chemických vlastností*, a to především následkem nárůstu molekulové hmotnosti (cross-linky a zesíťování).

<b>Fyzikálně-chemické vlastnosti AGE modifikovaných proteinů ve srovnání s původními</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• změna rozpustnosti</li> <li>• nižší isoelektrický bod</li> <li>• negativnější náboj</li> <li>• schopnost zesíťování – cross-linking</li> <li>• rezistence k proteolytickému štěpení</li> <li>• zvýšená rezistence k tepelné denaturaci</li> <li>• snadná chemická hydrolýza</li> <li>• relativní stabilita k působení kyselin</li> </ul>

Tvorby příčných vazeb (tzv. cross-linků) se většinou účastní aminokyselinové zbytky argininu a lysinu, které obsahují volnou aminoskupinu. Tyto nově vznikající vazby často vytvářejí chromofory v molekulách proteinů, z nichž některé i fluoreskují (Janebová a kol. 1999). A právě podle schopnosti tvořit příčné vazby a fluoreskovat je možné AGEs rozdělit do následujících skupin (Ahmed 2005):

**1. vytvářející cross-linky** (vazba aminoskupin ve dvou molekulách proteinů)

- a) fluoreskující – pentosidin, crossliny, vesperlysiny
- b) nefluoreskující – glukosapan, GOLD, MOLD, DOLD, GODIC, MODIC

**2. nevytvářející cross-linky** (vazba pouze na jeden protein)

pyrralin, CML, CEL, imidazolony

### 2.1.2.2 Účinky a metabolismus

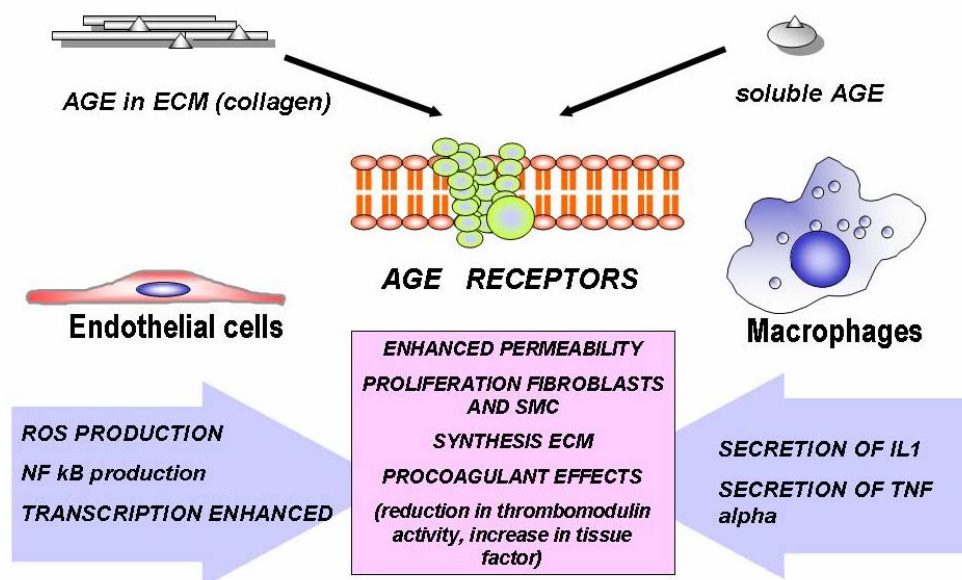
AGEs vykazují *přímé*, na receptorech nezávislé účinky, zahrnující poškození struktury a změny vlastností extracelulární matrix, mezi které můžeme zařadit sřetěžení molekul proteinů s jejich následnou rigiditou a rezistencí k proteolytickému štěpení, indukci lipoperoxidace, různé modifikace proteinových řetězců a změny jejich vlastností (např. defektní degradace a akumulace fibrinogenu a fibrinu ve tkáních). Receptory zprostředkované *nepřímé* účinky AGEs jsou zodpovědné za indukci oxidačního stresu (Janebová a kol. 1999).

Vlassara a kol. (1985) jako první poukázali na přítomnost receptorů, které zprostředkovávají absorpci a následnou endocytózu proteinů modifikovaných různými aldehydovými sloučeninami, na myších peritoneálních makrofázích.

Sano a kol. (1999) tento fakt potvrdili objevem stejných receptorů pro AGE-modifikované proteiny na jaterních sinusových buňkách a jejich experimenty odhalily tři společné rysy těchto receptorů. Prvním z nich je jejich *specifita* pro AGE-modifikované proteiny, ovšem ne pro nemodifikované proteiny nebo produkty časné fáze glykace (Schiffovy báze, Amadoriho produkty). Dalšími společnými rysy jsou *zvýšená exprese receptorů* na buňkách makrofágů a *polyaniontová senzitivita* těchto receptorů. V závěru studie autoři poukazují na význam receptorů pro AGEs na jaterních buňkách, který spočívá v urychlené clearance modifikovaných proteinů z plazmy. Toto odstranění poté přispívá k ochraně extrahepatálních buněk před působením AGEs.

Dle Singha a kol. (2001) můžeme mezi identifikované receptory pro AGEs, které se vyskytují především na buňkách hladkých svalů, monocytech, makrofázích, endoteliálních buňkách, astrocytech, podocytech a mikroglíích, zařadit:

- **Makrofágový scavengerový receptor typu I, II (MSR)**
- **AGE-R1** (oligosacharyltransferasa), **AGE-R2** (fosfoproteid), **AGE-R3** (galektin-3)
- **RAGE** (receptor pro AGE), který je nejlépe popsán ze všech receptorů pro AGE, patří do nadrodiny imunoglobulinů a zprostředkovává intracelulární signalizaci. Tento receptor byl za pomoci imunochemických metod lokalizován především na endoteliálních buňkách, které byly poškozeny aterosklerózou. RAGE na makrofázích a mikroglíích indukuje po navázání AGEs oxidační stres a aktivuje transkripční faktor *NF-κB*, který zpětně stimuluje makrofágy k produkci prozánětlivých cytokinů *IL-1α*, *IL-6* a *TNF-α* (Singh a kol. 2001). Buňky s vyšším obsahem AGEs ve zvýšené míře exprimují RAGE, což je způsobeno up-regulací syntézy těchto receptorů prostřednictvím *NF-κB*, který zde vystupuje jako promotor. Zvýšená exprese RAGE je spojena s patologickými stavy jako jsou diabetická vaskulopatie, nefropatie, retinopatie a neuropatie (Singh 2001). Následky vyplývající z vazby AGEs na RAGE jsou zachyceny na obr. 5.



Obr. 5: Následky vazby pozdních produktů glykace na receptor RAGE. Převzato z internetových stránek Warwick Medical School, Velká Británie.



Janebová a kol. (1999) ve své práci poukazují na přítomnost specifických enzymů, které v organismu detoxikují prekurzory AGEs, a zabraňují tak tvorbě pozdních produktů glykace. Dokladem potvrzujícím tuto hypotézu je průkaz specifických enzymů – reduktas, které detoxikují 3-DG. AGEs jsou po endocytóze tkáňovými makrofágy degradovány na nízkomolekulární peptidy, které představují opětovné nebezpečí pro další proteiny. Pokud totiž nejsou tyto peptidy včas odstraněny ledvinami, kvůli renálnímu poškození nebo snížené clearance kreatininu, dávají po reakci s proteiny vzniknout tzv. *druhé generaci AGEs* (tzv. recyklace AGEs).

### 2.1.2.3 Ovlivnění vzniku AGEs

*Počáteční fáze glykace* (tvorba Schiffovy báze) je závislá na počtu reaktivních aminoskupin v proteinu, a také na koncentraci a typu redukujícího cukru (Beránek a kol. 2001). U cukrů byla prokázána nejpomalejší glykační schopnost glukosy v porovnání s tzv. intracelulárními cukry, jako jsou např. fruktosa, glukosa-6-fosfát a glyceraldehyd-3-fosfát. Nezáleží ovšem jen na počtu aminoskupin, ale i na sterickém vlivu okolních substituentů. Tato skutečnost byla objevena při porovnání vzniku AGEs vázaných na lipidy fosfatidylethanolamin a fosfatidylcholin. U prvního z nich přispěla volná aminoskupina ke vzniku pozdních produktů glykace, zatímco u druhého, vzniku AGEs zabránily tři methylové zbytky (Obšil a Pavlíček 1997).

Produkce AGEs je urychlována oxidačním stresem, který se významně projevuje např. u chronického renálního selhání a zvyšuje hladinu pentosidinu a CML (Janebová 1999). Hammes a kol. (1999) se domnívají, že tvorba AGEs může být urychlena i bez přítomnosti glukosy, a dokládají tuto hypotézu vznikem pentosidinu a CML z askorbátu a proteinu při současném výskytu oxidačního stresu. Zvýšená tvorba AGEs může být katalyzována i ionty přechodných kovů, a naopak inhibována látkami s redukčními vlastnostmi jako jsou nízkomolekulární antioxidanty (Singh a kol. 2001).

### 2.1.2.4 Onemocnění spojená se zvýšeným výskytem AGEs

Pozdní produkty glykace jsou dávány do souvislosti především s komplikacemi při diabetes mellitus a mnoha dalších onemocněních, jako je revmatoidní artritida, Alzheimerova choroba, amyloidosa nebo koncové stádium renálního selhání. Také mají svoji úlohu při fyziologickém procesu stárnutí, kdy se jejich výskyt v moči a v séru s věkem zvyšuje (Janebová a kol. 1999, Dolhofer-Bliesener a kol. 1995).

U diabetických pacientů se pomocí koncentrace Amadoriho produktů a AGEs sleduje stav kompenzace jejich onemocnění. U těchto lidí byly zjištěny malé změny v obsahu AGE produktů v kolagenu kůže (pomocí specifické fluorescence), které byly označeny za *rizikový marker mikrovaskulárních komplikací*. Značný vliv na rozvoj pozdních komplikací diabetu mají především vrozené genetické rozdíly v kapacitě detoxikace AGE prekurzorů i produktů (Jakuš 2003).

Poškození glykací zasahuje především do biochemických a imunologických funkcí dlouho žijících proteinů (např. kolagenu), ovšem některé studie prokázaly glykaci u všech makromolekul obsahujících primární aminoskupinu, jako je například DNA (Beránek a Palička 1998). Významné poškození kolagenu zejména tvorbou cross-linků a s tím související atherogenezi může vyústit v arteriální hypertenzi s následnými komplikacemi (Bohlender 2005).

V experimentech *in vitro* i *in vivo* se zjistilo, že AGEs vyčerpávají oxid dusnatý, čímž se zmenšuje jeho účinek na endotel a dochází tak k nedokonalé vasodilataci. Tímto mechanismem se zvyšuje transendoteliální chemotaxe monocytů a sekrece PDGF (platelet derived growth factor), stejně jako exprese adhezních molekul VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) a ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1).

Kombinace glykace extracelulární matrix a zánětlivých podnětů umocňuje proces endoteliální adheze. Sklerosou bývají také postiženy renální glomeruly a bazální membrána (Singh a kol. 2001).

V plazmě můžeme najít *modifikovaný albumin*, který mění na základě glykace svoje prostorové uspořádání a to z  $\beta$ -skládaného listu na cross- $\beta$  strukturu, která je charakteristická především pro amyloidní fibrily (Bohlender 2005). Modifikace albuminu může ovlivňovat také vazebné parametry různých farmakologických skupin léčiv. Glykací pozměněná vazebná místa vykazují menší afinitu k jednotlivým léčivům, a tím se zvyšuje volná frakce daného léčiva v séru. Beránek a Palička (1998) ve své studii uvádějí srovnání volných a vázaných frací léčiv a klinicky významné změny, které zaznamenali především ve skupině sulfonamidů. Modifikace intracelulárních proteinů mohou souviset s řadou dalších poškození (DNA) až s dysfunkcí buňky a jejím patologickým růstem (Bohlender 2005).

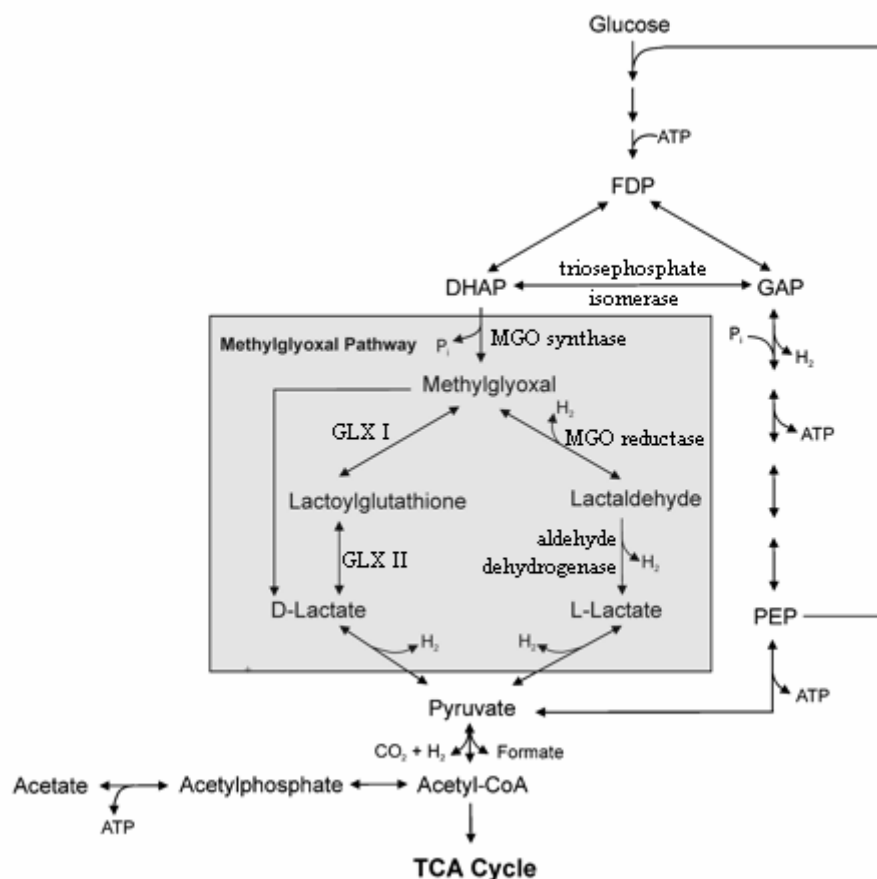
U diabetiků je díky zvýšené hladině cukru a oxidačnímu stresu umocněný vznik AGEs, které jsou mimo klasických komplikací diabetu také příčinou zvýšené náchylnosti těchto lidí k bakteriálním infekcím. Náchylnost souvisí právě se zvýšenou

koncentrací AGEs v séru, kde se tyto produkty váží na lysosym i laktoferin, a svojí vazbou inhibují antibakteriální aktivitu těchto enzymů (Vlassara 1997).

### **2.1.3 Methylglyoxal jako glykační činidlo**

Z chemického hlediska se jedná o *2-oxopropanal (pyruvaldehyd)*. Methylglyoxal se jako vysoce reaktivní  $\alpha$ -oxoaldehyd řadí mezi jeden z nejdůležitějších prekurzorů vzniku AGEs. Hlavním zdrojem MGO je rozklad *triosafosfátů* (meziproduktů glykolýzy) *dihydroxyacetonfosfátu* (DHAP) a *glyceraldehyd-3-fosfátu* (GAP) prostřednictvím dvou enzymů: *triosafosfátisomerasy*, která katalyzuje vzájemnou přeměnu těchto dvou substrátů, a *methylglyoxalsyntasy*. Metabolismus acetonu, autooxidace monosacharidů, Maillardova reakce a peroxidace lipidů jsou dalšími zdroji MGO (Ramasamy a kol. 2006)

Proti škodlivému působení MGO se organismus brání pomocí enzymové detoxikace *glyoxalovým systémem* za účasti glutathionu (GSH). Při této metabolické cestě vzniká jako první hemithioacetal po kondenzaci MGO s GSH. Prostřednictvím *glyoxalasy I (GXL I)* je tento hemithioacetal konvertován na laktoylglutathion. Shinohara a kol. (1998) popisuje snížení vzniku intracelulárních AGEs za podmínek hyperglykémie, a to v důsledku cíleně zvýšené exprese právě tohoto enzymu. Enzym *glyoxalasa II (GXL II)* hydrolyzuje vzniklý laktoylglutathion na D-laktát a glutathion. Metabolismus methylglyoxalu je uveden na obr. 6.

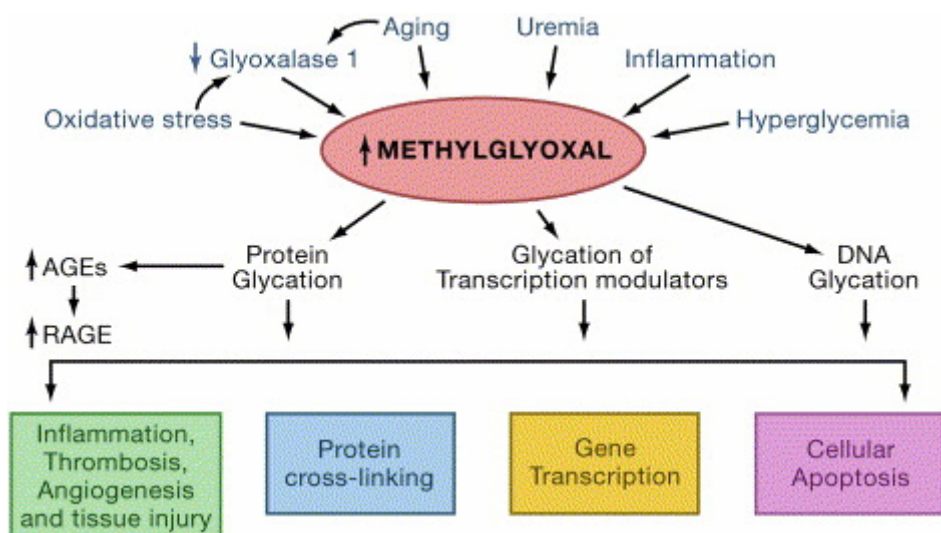


Obr. 6: *Metabolismus methylglyoxalu* (Weber a kol. 2005).

Problémy s detoxikací MGO v organismu touto dráhou nastanou při nedostatku cytosolického glutathionu, který může nastat např. při působení oxidačního stresu. V důsledku těchto okolností může tedy docházet k akumulaci methylglyoxalu, při které začínají nabývat na významu i jiné cesty jeho přeměny. MGO se působením aldehyddehydrogenasy přeměňuje přes laktaldehyd na L-laktát, který se společně s D-laktátem v savčích buňkách metabolizuje na pyruvát a vstupuje do Krebsova cyklu (Weber a kol. 2005).

Hlavním cílem této reaktivní sloučeniny (MGO) jsou argininové zbytky, s kterými reaguje za vzniku argpyrimidinu a fluoreskujících hydroimidazonů. AGE produkty vzniklé na zbytcích argininu a lysinu se považují za stabilní na rozdíl od hemiacetalů vzniklých po reakci s cysteinovými zbytky (Bourajjaj a kol. 2003).

Schéma znázorňující příčiny vzniku a následky působení MGO je uvedeno na obr. 7.



Obr. 7: Příčiny a důsledky působení methylglyoxalu v lidském organismu (Ramasamy a kol. 2006).

## 2.1.4 Metody používané k detekci AGEs

Stanovení produktů pozdní glykace je velmi náročné vzhledem k heterogenitě této skupiny látek, obtížné přípravě standardů (nejsou komerčně dostupné), náročnosti analytických procedur a požadavkům na přístrojové vybavení. Mezi možnosti stanovení řadíme metodu imunochemickou *ELISA* s použitím polyklonálních či monoklonálních protilátek, *spektrofluorimetrii* využívající charakteristického fluorescenčního spektra AGEs, *vysokoučinnou kapalinovou chromatografii* a *hmotnostní spektrometrii* (Kalousová 2004). K bližší charakterizaci se využívají také další *metody chromatografické* a *elektroforetické*. Stanovení AGE produktů také komplikuje skutečnost, že jejich struktura není dosud přesně popsána, a proto je volba metody detekce často založena na některé charakteristické vlastnosti těchto sloučenin.

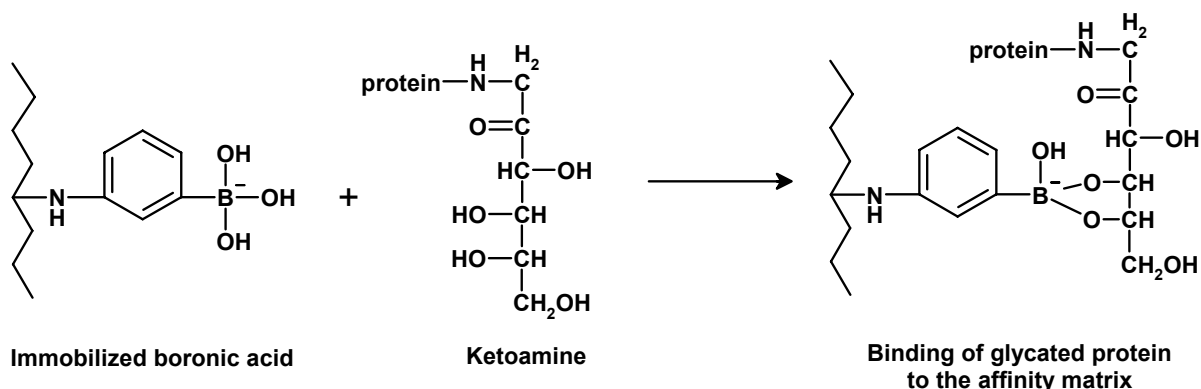
### 2.1.4.1 Chromatografické metody

Mezi často používané metody ke stanovení koncentrace pentosidinu nebo dalších AGE produktů patří např. afinitní chromatografie, HPLC s reverzními fázemi nebo kombinace HPLC a hmotnostní spektrometrie.

Rozšířenou metodou stanovení glykovaných proteinů je *afinitní chromatografie* (Klenk a kol. 1982; Peters 1996; Rendell a kol. 1985). Při použití této metody existují dvě základní podmínky, a to vazba sledované látky na sorbent a volba takových

podmínek, které způsobí desorpci navázané látky. Eluční podmínky jsou zpravidla šetrné, takže riziko nevratné denaturace je minimální a metoda může od sebe rozlišit a oddělit specificky i nespecificky navázané látky. Nespecifická absorpce je většinou způsobena vlastnostmi matrice nebo imobilizovaného ligandu ([www.iontosorb.cz](http://www.iontosorb.cz)).

Afinitní chromatografie byla použita jako základní metoda v experimentech Klenka a kol. (1982), kteří porovnávali výsledky stanovení glykovaného hemoglobinu pomocí různých metodik. Jako specifický imobilizovaný ligand (sorbent), který zabezpečoval navázání glykovaného proteinu, byla použita kyselina *m*-aminofenylboritá. Ta reagovala s cis-diol uskupením glykovaného proteinu za vzniku nerozpustného komplexu obsahujícího pětičlenný cyklus navázaný na chromatografickou kolonu (obr. 8.). Po výměně promývacího pufru za eluční pufr obsahující sorbitol, který kompetuje s vazbou glykovaného proteinu na kys. *m*-aminofenylboritou, nastala disociace komplexu a vymývání glykovaného hemoglobinu z kolony. Výsledky této práce poukázaly na nezastupitelnou roli afinitní chromatografie při dlouhodobé kontrole diabetu, která spočívá v možnosti průkazu různých druhů glykovaného hemoglobinu a možnost detekce i ve vzorcích obsahujících velké množství HbA<sub>1C</sub>.



Obr. 8: Interakce glykovaných proteinů s imobilizovaným ligandem – kyselinou boritou.

Obrázek byl převzat z článku Klenk a kol. (1982) a upraven.

V mnoha studiích se koncentrace pentosidinu, jako spolehlivého biomarkeru neenzymových modifikací proteinů v biologických vzorcích, stanovuje pomocí *HPLC s reverzními fázemi* (Dyer a kol. 1991; Takahashi a kol. 1995). Obvyklým uspořádáním bývá použití C18-kolony s gradientovou elucí voda - acetonitril (s 0,1% heptafluoromáselnou nebo trifluoroctovou kyselinou) a s fluorescenční detekcí ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ : 328/378 nm). Naměřené množství pentosidinu v lidské oční čočce je vyjádřeno v jednotkách  $\mu\text{mol}$  pentosidinu/mol lysinu (Dyer a kol. 1991).

Kombinace *kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií* je vysoce senzitivní a specifická metoda. Tohoto uspořádání (HPLC-MS/MS) bylo použito také v experimentech zabývajících se kvantifikací 16 biomarkerů indukujících v lidském organismu glykaci, oxidaci a nitraci. Stanovení probíhalo po předchozím odstranění lipidů a enzymové hydrolýze vzorků intra- i extracelulárních proteinů a srovnával se jejich vzájemný poměr koncentrací (Ahmed a Thornalley 2003).

#### 2.1.4.2 Fluorescence

Luminiscence je emise světla z molekul látky po absorpci budícího (excitačního) záření z UV nebo viditelné oblasti. Podle povahy *excitovaného stavu* a doby dohasínání se dělí do dvou formálních kategorií: fluorescence ( $10^{-9} - 10^{-6}$  s) a fosforescence ( $10^{-6} - 10^2$  s). U fluorescence dochází při návratu excitovaného elektronu do základního stavu k emisi fotonu. Její intenzita je přímo úměrná intenzitě absorpce násobené kvantovým výtěžkem fluorescence. Životnost excitovaného stavu (*fluorescence lifetime*,  $\tau$ ) je určena průměrným časem, který molekula stráví v excitovaném stavu před návratem do stavu základního. Obecně je životnost fluorescence kolem  $10^{-8}$  s (Lakowicz 2004; Jandera 1999). Princip fluorescenční spektroskopie spočívá v průchodu budícího záření excitačním monochromátorem a dopadem na vzorek (obvykle temperovaná kyveta s roztokem). Nejčastěji ve směru kolmém k budícímu paprsku se měří emitované fluorescenční záření, které nejprve prochází emisním monochromátorem a je detekováno pomocí fotonásobiče (Jandera 1999).

Za fluorescenční vlastnosti proteinů jsou zodpovědné aromatické aminokyseliny a to zejména tryptofan a tyrosin. Jelikož je podíl tryptofanu na emisi fotonů dominantní, používá se pro vnitřní (intrinsic) fluorescenci bílkovin také termín *tryptofanová fluorescence* (Vostrý 2006). Ta je vysoce citlivá vůči změnám v okolním prostředí, a lze ji tedy využít ke studiu konformačních změn v molekule proteinu (Lakowicz 2004).

Sledování fluorescence tryptofanových zbytků využíval Bourdon a kol. (1999) v experimentech, které byly navrženy k určení vlivu glukosy na konformační změny molekul proteinů při dlouhodobé inkubaci. Jako modelový protein zvolili BSA obsahující ve své molekule 2 tryptofanové zbytky. Autoři inkubovali BSA (0,01 mg/ml a 0,5 mg/ml) s glukosou 0 - 500 mM po dobu 60-ti dní při 37°C. Poté měřili fluorescenci vzorků při vlnových délkách excitace a emise 280/340 nm a 350/425 nm odpovídajících fluorescenci Trp zbytků a AGE produktů. Zaznamenali pokles hodnot

vnitřní fluorescence u vzorků obsahujících BSA a glukosu proti vzorkům obsahujícím pouze BSA. Spolu s poklesem tryptofanové fluorescence došlo k nárůstu intenzity fluorescence v oblasti odpovídající AGE produktům. Pokles vnitřní fluorescence byl způsoben konformačními změnami molekuly BSA.

Vznik glykačních produktů s fluorescenčními vlastnostmi při inkubaci proteinů s redukujícími cukry pozorovali Monnier a Cerami (1981), kteří měřili tyto nespecifické AGE produkty při vlnové délce excitace a emise 370/440 nm. Pentosidin je jedním z nejlépe popsaných AGE produktů a jeho fluorimetrické stanovení probíhá při vlnových délkách excitace a emise 335/385 nm, případně 328/378 nm (Njoroge a Monnier 1981; Lyons a kol. 1991). Naměřená intenzita fluorescence se obvykle vyjadřuje v jednotkách *AU* (*arbitrary unit*) nebo AU/mg proteinu.

#### 2.1.4.3 Elektroforesa, Imunoblotting

*Elektroforetické metody* se používají k separaci látek nesoucích náboj (ionty) v elektrickém poli. Pohyb elektricky nabitých částic k elektrodě s opačným nábojem závisí na jejich velikosti, tvaru, velikosti náboje a na intenzitě vloženého elektrického pole. Elektroforetické metody separace se podle základního principu dělí do tří skupin: zónová elektroforesa, izotachoforesa a izoelektrofokusace (Westermeier 2005).

V praxi se pro separaci proteinů velice často využívá denaturující zónová elektroforesa *SDS-PAGE* (*sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*). Denaturace proteinů je zajištěna povařením vzorku (99°C), přítomností merkaptoethanolu ve vzorkovém pufru a SDS v polyakrylamidovém gelu a ve vzorku. SDS také propůjčuje denaturovaným proteinům záporný náboj, který jim napomáhá k snažšímu průniku gelem ke kladné elektrodě, a právě tento uniformní náboj umožňuje separaci proteinů závislou na jejich molekulové hmotnosti a hustotě gelu (Rumlová a kol. 2003). Proteiny s rozdílnou pohyblivostí migrují v gelu jako pásy, tzv. *bandy*. Fyzikální vlastnosti gelu jsou dány podílem akrylamidu a stupněm zesíťování. V případech, kdy je nutné zachovat nativní strukturu proteinu a jeho katalytickou aktivitu, se používá *nativní PAGE* (bez přídavku SDS a povaření vzorku), u které se jednotlivé proteiny dělí podle náboje, velikosti a tvaru molekuly a tzv. „prosívacího“ efektu gelu.

**Western blotting** (též imunoblotting) je technika založená na principu kapilárního přenosu proteinů z gelu po SDS-PAGE na membránu. Proteiny jsou v membráně



zakotveny a jsou přístupné k reakci s imunodetekčními činidly. Všechna nespecifická vazebná místa na membráně se nejprve blokují roztokem obsahujícím protein (např. odtučněné mléko). Pak je membrána inkubována s primární protilátkou a dále s konjugátem sekundární protilátky s enzymem (křenová peroxidasa, alkalická fosfatasa). Po přidání chromogenního substrátu na membránu poskytuje reakce enzymu se substrátem barevný produkt. Další možností je použití chemiluminiscenčního substrátu s následnou detekcí na fotografickém filmu (Westermeier 2005).

#### 2.1.4.4 ELISA

*ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)*, někdy označována jako *EIA (Enzyme Immuno Assay)*, je jednou z nejpoužívanějších metod sloužících k průkazu jak protilátek, tak i antigenů. Existuje několik způsobů provedení (kompetitivní x nekompetitivní; přímá x nepřímá x sendvičová), které se liší způsobem provedení a detekce.

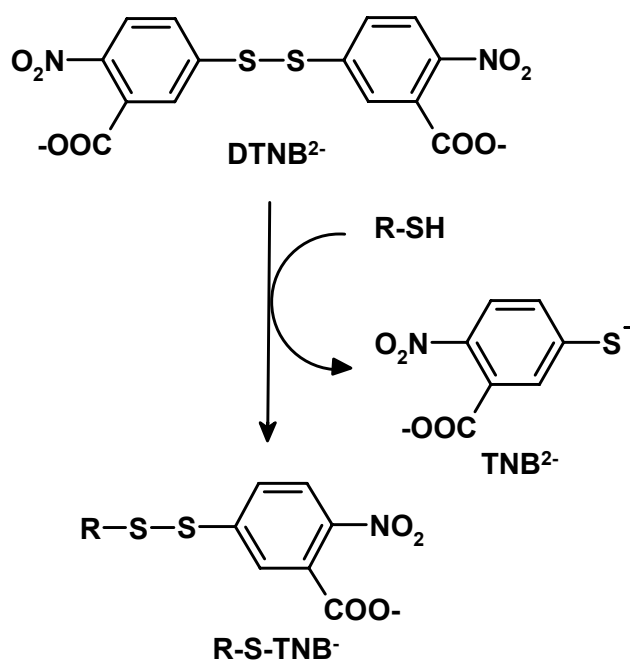
Právě *kompetitivní ELISA* byla využita při analýze plazmatických proteinů ve studii, která měla za cíl určit rozsah poškození plazmatických proteinů glyoxalem (GO). V této práci Sady a kol. (2000) připravili protilátky proti GO-modifikovaným proteinům imunizací králíků ribonukleasou A modifikovanou glyoxalem (100 mg/ml ribonukleasy A, 100 mM GO, 5 dnů, 37°C). IgG frakce byly na koloně Protein G-Sepharosa očištěny od protilátek proti CML, který v organismu vzniká více cestami, a není tedy vhodným indikátorem proteinů modifikovaných glyoxalem. Mikrotitrační destičky byly inkubovány s 1 µg GO-BSA/jamku přes noc při teplotě 4°C, poté blokovány 5% odtučněným mlékem v PBS a následně promyty roztokem PBS s Tweenem. Následovaly inkubace s primární protilátkou proti GO-modifikovaným proteinům (preinkubovanou s potenciálně kompetujícím vzorkem), se sekundární protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatasou a substrátem *p*-nitrofenylfosfátem. Poté byla měřena absorbance při vlnové délce 410 nm na čtečce mikrotitračních destiček. Autoři definovali jednu jednotku GO-AGEs jako množství způsobující 1% inhibici navázání protilátky. Autoři práce pozorovali akumulaci GO-AGEs v lidských čočkách během stárnutí, což poukazuje na význam GO v modifikaci proteinů s rostoucím věkem. Významný nárůst koncentrace GO-AGEs v plazmatických proteinech pacientů trpících diabetem naznačuje, že cesty produkující GO jsou u diabetiků urychleny.

Shibayama a kol. (1999) využili *nekompetitivní ELISu* ve snaze dokázat, že CML může sloužit jako imunogenní epitop pro tvorbu autoprotilátek proti AGEs *in vivo*, a může být tedy používán jako potenciální biomarker diabetické neuropatie a chronického renálního selhání. Autoři inkubovali vzorky plazmy získané od 6 různých skupin pacientů v mikrotitračních destičkách přes noc při 4°C, poté vymyli nenavázané vzorky a volné epitopy blokovali 0,5% roztokem želatiny. Následovala inkubace s primární protilátkou proti AGE produktům (klon 6D12), sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidasou a substrátem *o*-fenylendiaminem. Inkubace se substrátem byla ukončena přidavkem kyseliny sírové. Následně byla změřena absorbance destiček při 492 nm. Podařilo se zjistit, že pacienti s renálním selháním diabetické i nediabetické patologie měli zvýšenou autoprotilátkovou aktivitu proti CML než diabetici bez renálního selhání nebo zdravá kontrola.

#### 2.1.4.5 Stanovení koncentrace thiolových skupin

Dalším z přístupů, kterými se dá sledovat rozsah poškození proteinu vlivem glykace nebo oxidace je stanovení *koncentrace volných thiolových skupin*. Ty jsou totiž *in vivo* dávány do souvislosti s antioxidačními vlastnostmi např. molekuly albuminu. Byla vyvinuta celá řada elektrochemických, fluorimetrických a spektrofotometrických metod. Spektrofotometrické metody jsou sice méně citlivé než ostatní metody, ale jsou velmi rychlé a snadné na provedení, což vysvětluje jejich popularitu (Riener a kol. 2002).

Ze spektrofotometrických metod se nejčastěji používá reakce s *Ellmanovým činidlem* [DTNB, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina)]. Princip stanovení spočívá v reakci látky obsahující volnou thiolovou skupinu s DTNB za vzniku smíšeného disulfidu (R-S-TNB<sup>-</sup>) a jednoho ekvivalentu 5-thio-2-nitrobenzoové kyseliny (TNB<sup>2-</sup>), který lze při vlnové délce 412 nm spektrofotometricky stanovit (obr. 9.). Nevýhodou stanovení je, že u některých proteinů neproběhne reakce s DTNB úplně, a to vlivem stérických nebo elektrostatických zábran. Tento kinetický problém se dá vyřešit použitím cystaminu, který slouží jako prostředník mezi proteinem a činidlem (Riener a kol. 2002).



Obr. 9: *Reakce Ellmanova činidla s látkou obsahující thiolovou (sulfhydrylovou) skupinu* (Riener a kol. 2002).

Faure a kol. (2005) ve své práci poukazují na souvislost mezi modifikací SH – skupin (především tvorba disulfidických můstků) u molekuly BSA vlivem neenzymové glykace a významným snížením protektivního efektu této bílkoviny. Vystavili HeLa buňky oxidaci peroxidem vodíku v přítomnosti nativní molekuly BSA nebo BSA modifikované methylglyoxalem (MGO-BSA). Po 24 hodinové inkubaci v přítomnosti MGO-BSA pozorovali cytotoxicitou pozměněné buňky. Naproti tomu buňky v přítomnosti nativního BSA byly nezměněné. Molekula MGO-BSA měla o 40% méně volných SH- skupin než nativní BSA, a ztratila také 30% tryptofanové fluorescence. Glykovaný albumin nebyl tudíž schopen zabránit cytotoxickému působení peroxidu vodíku na HeLa buňky, protože tato modifikace vedla k významné ztrátě antioxidantních vlastností proteinu.

## 2.2 Oxidační stres

Náplní mé diplomové práce bylo sledování a hodnocení vlivu některých antioxidantů na vznik AGEs, a proto v této kapitole krátce zmíním oxidační stres a antioxidantní systém lidského organismu. AGEs totiž potřebují ke svému vzniku

přítomnost kyslíku, protože za anaerobních podmínek pozdní fáze glykace neprobíhá (Janebová a kol. 1999).

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 peroxynitrit (Beneš 2008). Velmi často se můžeme setkat se směřováním pojmu volné radikály a reaktivní sloučeniny kyslíku.

Oxidační stres je definován jako porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním ROS z organismu. Mezi příčiny se řadí nadměrná tvorba ROS, nedostatečná činnost antioxidačního systému nebo jejich kombinace (Štípek a kol. 2000).

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*.

### **2.2.1 Antioxidační systém organismu**

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. atherosklerosa, revmatoidní artritida, ischemicko-reperfusní stavy, neurodegenerativní onemocnění a rakovina (Boušová 2006).

Mnohé studie prokázaly spojitosti mezi oxidačním stresem a tvorbou AGE prekurzorů. Například *peroxynitrit* může indukovat tvorbu CML oxidativním štěpením Amadoriho produktů a tvorbou AGE prekurzorů z glukosy. Působením volných radikálů dochází nejen ke změně nebo poškození buněčných membrán, ale i k poškození *bílkovin* (enzymů), *DNA* (mutagenese, karcinogenese), *polysacharidů* a k lipoperoxidaci. Působením RONS dochází k poškození mnohých fyziologických procesů v lidském organismu.

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 vychytávat RONS (vychytávače - scavengers, lapače - trappers a zhášecí - quenchers) a **systémy reparační** (peptidasa, fosfolipasa), které zajišťují udržování fyziologických hladin RONS (Beneš 2008).

### 2.2.2 Antioxidanty

Jako nejlepší ochrana organismu před těmito značně reaktivními sloučeninami se jeví prevence, a to v podobě posilování přirozeného antioxidačního systému těla, prostřednictvím podávání *nízkomolekulárních endogenních antioxidantů* nebo „*zhášeců*“ *volných radikálů*. Řada látek s antioxidační aktivitou již byla dobře prozkoumána a využívá se hojně v prevenci vzniku například kardiovaskulárních onemocnění nebo rakoviny. Důležité je, že ochrana organismu vždy funguje jako systém, ve kterém antioxidanty a jejich celá uskupení vzájemně spolupracují a často funkce jednoho podmiňuje účinek jiného (Štípek a kol. 2000).

Mezi známé antioxidanty můžeme zařadit:

- *Askorbát (vitamin C)* – redukční činidlo redukující anorganické i organické radikály, vystupující také jako nutný kofaktor enzymů při syntéze kolagenu a přeměně dopaminu na noradrenalin. Ovšem kyselina askorbová vykazuje podle určitých studií i prooxidační aktivitu, kdy v kombinaci s ionty železa uvolňuje hydroxylové radikály, které se podílejí na peroxidaci lipidů (Haslam 1995).
- *Tokoferoly (vitamin E)* – skupina 8 isomerů, z nichž biologicky nejúčinnějším antioxidantem membrán je  $\alpha$ -tokoferol díky své isoprenové lipofilní struktuře.

Svoji antioxidační aktivitu uplatňuje při lipoperoxidaci lipidů, při které přeměňuje alkylperoxylové radikály na hydroperoxydy, které zneškodní glutathionperoxidasa. Tímto mechanismem zabraňuje poškození zdravých lipidů peroxylovými radikály mastných kyselin.

- *Ubichinon (koenzym Q)* – celá rodina benzochinonů liší se délkou isoprenového řetězce. U savců se nejrozšířenější koenzym Q<sub>10</sub> vyskytuje ve všech membránách, kde tlumí radikálové reakce ve spolupráci s tokoferolem.
- *Karotenoidy (β-karoten)* – hrají velmi důležitou roli v odstraňování radikálů lokalizovaných na uhlíku a alkylperoxylových radikálů vyskytujících se v lipidech.
- *Glutathion (GSH)* – tento tripeptid vyskytující se ve všech savčích buňkách je považován za nejvýznamnější redoxní pufr buňky. Převažuje jeho redukováná forma GSH, která snadno podléhá oxidaci a s další molekulou GSH vytvoří pomocí disulfidické vazby oxidovaný glutathion (GSSG). Mezi jeho další funkce patří udržovat thiolové skupiny proteinů v redukováné formě a regenerovat askorbát a tokoferol.
- *Kyselina močová* – jako konečný produkt odbourávání purinů byla dlouhou dobu považována pouze za odpadní látku. Avšak s postupem času se zjistilo, že je nejhodněji zastoupeným antioxidantem v lidské plazmě.

### 2.2.3 Látky fenolické povahy

Fenolické látky, s ohledem na jejich velké rozšíření a příjem prostřednictvím naší stravy (až 1g/den), se stávají častým předmětem zájmu mnoha výzkumů a studií.

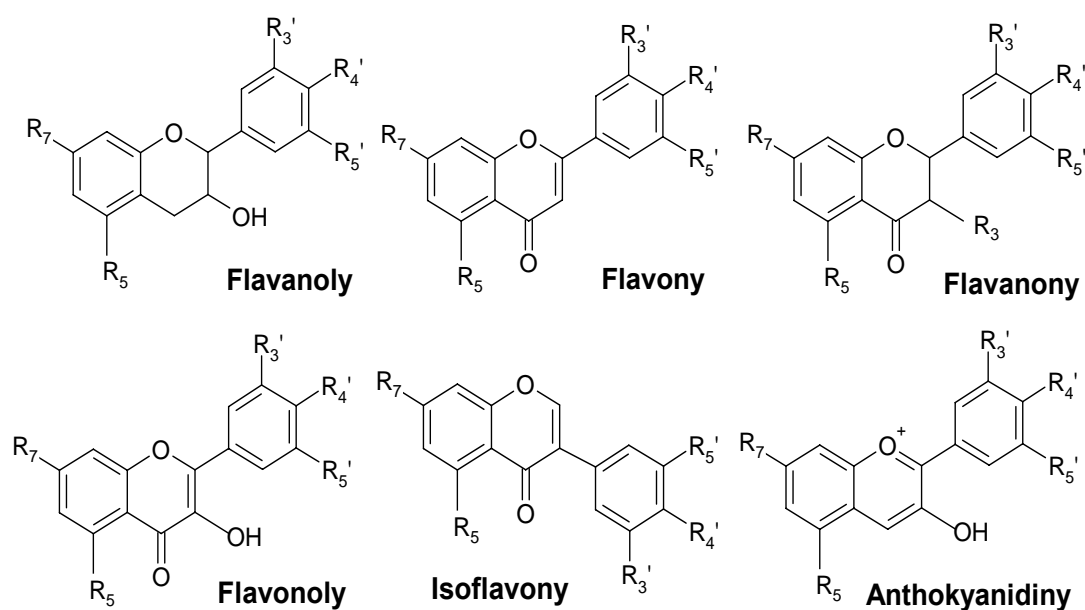
Ve studii Škottové a kol. (2004) byly studovány účinky dvou rostlinných extraktů (*Silybum marianum* a *Prunella vulgaris*) obsahujících fenolické látky na antioxidační status a lipoproteinový profil u hyperlipidemických potkanů. Potkani byli rozděleni do dvou skupin. Jedna byla krmená standardní dietou a druhá dietou s vysokým obsahem sacharosu. Dieta obsahující sacharosu vyvolala signifikantní snížení koncentrace glutathionu, akumulaci cholesterolu a triacylglycerolů v játrech a negativní změny v lipoproteinovém profilu. Podání extraktů vedlo ke zlepšení antioxidačního statutu v krvi a zabránění vývoje steatosy jater u testovaných zvířat. Autoři uvádějí, že tento výzkum naznačuje uplatnění látek fenolické povahy v prevenci onemocnění

vznikajících v důsledku dietou vyvolaného proatherogenního lipoproteinového profilu (Škottová a kol. 2004).

Mezi látky fenolické povahy (polyfenoly) patří celá řada sloučenin, které se dají rozdělit do několika skupin:

- **Flavonoidy** – flavanoly (katechiny), flavony, flavanony, flavonoly, isoflavony, anthokyanidiny, proanthokyanidiny (oligomery)
- **Fenolické kyseliny** – hydroxybenzoové a hydroxyskořicové kyseliny
- **Ostatní polyfenoly** – ligniny, stilbeny

Struktury základních tříd flavonoidů jsou zobrazeny na obrázku 10.



Obr. 10: Struktura šesti základních tříd flavonoidů.

Mezi *hlavní zdroje* těchto látek se řadí ovoce, zelenina a nápoje (červené víno, káva, čaj). Orientační obsah polyfenolů v běžně konzumovaném množství některých potravin a nápojů je uveden v práci Slaniny a Táborské (2004), která se zabývala příjmem, biologickou dostupností a metabolismem polyfenolů. Obsah polyfenolů v potravinách závisí na genetických (druh a odrůda rostliny) a vnějších faktorech.

Byly také zjištěny a popsány vztahy mezi antioxidační aktivitou a chemickou strukturou flavonoidů. Jako nezbytná podmínka antioxidační aktivity byla označena přítomnost hydroxylových skupin na kruhu B v *ortho*-poloze a také dvojná vazba mezi 2. a 3. uhlíkem, která je v konjugaci s karbonylovou skupinou v poloze 4 (Spilková a

Dušek 1996). V této práci jsou také shrnuty jednotlivé studie, které hodnotily různé vztahy struktur fenolických látek na jednotlivé enzymy.

Původní předpoklad o neresorbování polyfenolů z trávicího traktu byl překonán několika studiemi, které prokázaly vysokou míru resorpce v tenkém střevě. Důležité pro prostou difúzi těchto látek přes kartáčový lem je odštěpení polární složky z glykosidu. Metabolismus těchto látek je velmi podobný biotransformaci xenobiotik a spočívá v konjugaci s kyselinou glukuronovou, sírovou a glycinem. Hlavním faktorem ovlivňujícím biotransformaci polyfenolů je organismem přijatá dávka. Velké dávky se metabolizují v játrech a malé v buňkách střevní mukosy (Slanina a Táborská 2004).

Několik epidemiologických studií poukázalo na problém, který vyvstává v určení prospěšného množství polyfenolů přijímaného potravou. U vysokého množství polyfenolů se prokázal nepřímý vztah se zvýšeným výskytem kardiovaskulárního onemocnění, ale proti těmto zjištěním stojí spojitost mezi konzumací červeného vína (bohatého právě na polyfenoly) a sníženou prevalencí těchto onemocnění (tzv. Francouzský paradox) (Burr 1995).

V rostlinných tkáních nacházíme dva základní typy fenolových kyselin, a to deriváty *kyseliny benzoové* a *kyseliny skořicové*. Deriváty kyseliny hydroxybenzoové jsou v potravě člověka zastoupeny spíše jako složky komplexních struktur např. ve formě hydrolyzovatelných taninů (např. gallotanin v čaji) (Komrsková 2006).

Autoři Natella a kol. (1999) ve své práci porovnávali „zhášecí“ aktivitu čtyř derivátů kyseliny benzoové a jejich protějšků z řady hydroxyskořicových kyselin vůči peroxylovým radikálům na LDL jako substrátu. Ve skupině fenolových kyselin (5 - 30  $\mu\text{M}$ ) vykazovaly větší antioxidační aktivitu deriváty kyseliny hydroxyskořicové, a to v důsledku vsunutí ethylenové skupiny mezi aromatický kruh a karboxylovou skupinu.

Tento konjugovaný systém dvojných vazeb má navíc vliv i na stabilitu sloučenin. Antioxidační efekt se také zvyšoval s počtem a pozicí hydroxylových skupin vázaných na aromatické jádro (nejvýhodnější *ortho*-poloha - kyselina kávová). Tyto kyseliny se nejčastěji nacházejí v rostlinách vázané ve formě esterů, v nichž se váží karboxylem na hydroxylové skupiny organických kyselin nebo sacharidů. Jen malé množství se vyskytuje ve volné formě. V krvi dochází k vazbě metabolitů polyfenolů na plazmatické bílkoviny, a to zejména na albumin. Afinita těchto metabolitů k albuminu závisí na jejich chemické struktuře.



*Hydroxyskořicové kyseliny* jsou v rostlinách syntetizovány ve většině případů hydroxylací kyseliny skořicové, která vzniká deaminací fenylyalaninu pomocí enzymu fenylyalaninamoniaklyasy. Výjimku tvoří pouze kyselina *p*-kumarová vznikající deaminací tyrosinu (Dewick 2002).

Za hlavního zástupce hydroxyskořicových kyselin je považována **kyselina kávová** (u některého ovoce představuje 75 - 100% z obsahu hydroxyskořicových kyselin) obsahující dvě OH-skupiny vzájemně k sobě v *ortho*-poloze, která je nejvýhodnější pro antioxidační aktivitu u těchto sloučenin. *Fenylestery kyseliny kávové* byly objeveny i v přírodním propolisu, který se již staletí používá pro jeho protizánětlivé a imunomodulační účinky. U *amidů kyseliny kávové* byly prokázány inhibiční vlastnosti na peroxidaci lipidů a na základě tohoto faktu probíhaly další studie vztahů mezi strukturou a antioxidační aktivitou u hydroxybenzoových a hydroxyskořicových kyselin.

Po dehydroxylací kyseliny kávové v tlustém střevě vzniká kyselina ***m*-kumarová** a po metabolizaci katechol-O-methyltransferasou (COMT) v játrech **kyselina ferulová**, která se vyskytuje především ve vláknině, kde je esterovou vazbou vázána na hemicelulose (Slanina a Táborská 2004).

Aktivita kyseliny kávové se zvyšuje její esterifikací kyselinou chinovou za vzniku **kyseliny chlorogenové**. A naopak klesá methylací OH-skupiny, a tím následnou destabilizací jako je tomu u kyseliny **ferulové a sinapové**.

**Kyselina rozmarýnová** byla poprvé izolována z rostliny *Rosmarinus officinalis* (*Lamiaceae*) a vyskytuje se v podobě glykosidů, enolů a polymerů společně s jinými kyselinami (Spilková a Dušek 1996).

Mezi nejvýznamnější hydroxyskořicové kyseliny, které se vyskytují v přírodě, patří sloučeniny uvedené v následující tabulce.

<i>Hydroxyskořicové kyseliny</i>	<i>Substituenty</i>					<i>Chemický vzorec</i>
	<i>R<sub>1</sub></i>	<i>R<sub>2</sub></i>	<i>R<sub>3</sub></i>	<i>R<sub>4</sub></i>	<i>R<sub>5</sub></i>	
<i>kyselina o-kumarová</i>	OH	H	H	H	H	
<i>kyselina m-kumarová</i>	H	OH	H	H	H	
<i>kyselina p-kumarová</i>	H	H	OH	H	H	
<i>kyselina kávová</i>	H	OH	OH	H	H	
<i>kyselina ferulová</i>	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H	
<i>kyselina sinapová</i>	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	H	
<i>kyselina chlorogenová</i>	H	OH	OH	H	QA <sup>1</sup>	
<i>kyselina rozmarýnová</i>	H	OH	OH	H	CA <sup>2</sup>	

<sup>1</sup>QA = kyselina chinová (=1,3,4,5-Tetrahydroxycyklohexankarboxylová kyselina)

<sup>2</sup>CA = kyselina kávová (druhý zbytek je vázán přes dvojnou vazbu v postranním řetězci)

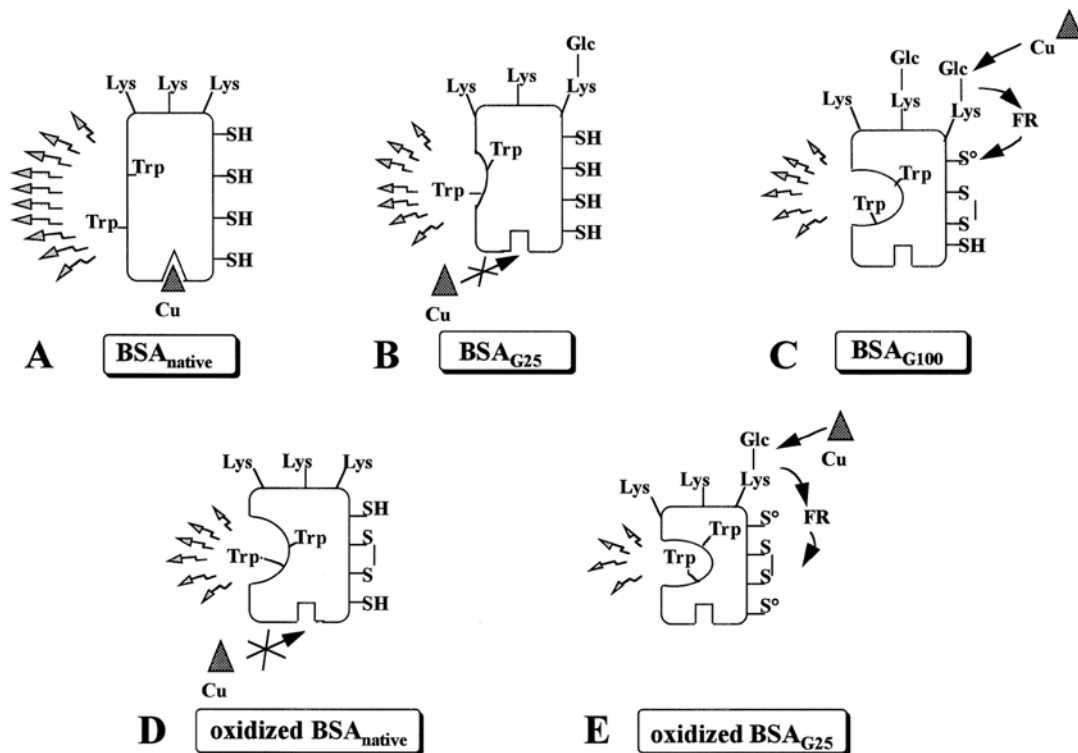
## 2.3 Bovinní sérový albumin

*Bovinní sérový albumin (BSA)* sloužil jako modelová bílkovina v mých experimentech. Tato bílkovina má pouze jeden polypeptidový řetězec složený z 583 aminokyselinových zbytků. Prostorová struktura bílkoviny je držena pohromadě 17 disulfidickými můstky. Molekula BSA obsahuje 59 zbytků lysinu, 23 argininu, 35 cysteinu a 2 tryptofanu.

U *lidského sérového albuminu (HSA - human serum albumin)*, který se řadí mezi hlavní cirkulující antioxidanty v plazmě (koncentrace v séru 35-50 g/l), bylo popsáno osm míst pro glykaci *in vivo* (Lys 36, Lys 257, Lys 305, Lys 341, Lys 375, Lys 463, Lys 549, Lys 558) a dalších čtrnáct míst pro *in vitro* glykaci. Jako hlavní z míst pro tuto *in vitro* glykaci označil Peters (1996) ve své práci Lys-525. Lidský albumin obsahuje 3 domény, které se skládají vždy ze dvou subdomén stabilizovaných vnitřními disulfidickými můstky (Coussons a kol. 1997).

Bourdon a kol. (1999) ve své práci shrnuje výsledky experimentů, které zkoumají strukturální změny v molekule BSA následkem oxidačních a glykačních podmínek. Schéma změn BSA indukovaných glykačními a oxidačními podmínkami je uvedeno na obr. 11.

Nativní molekula BSA v *základní globulární konformaci* se vyznačuje vnitřní fluorescencí dvou tryptofanových zbytků Trp<sub>213</sub> a Trp<sub>134</sub>. Antioxidační aktivita vyjádřená vazebnou kapacitou pro kovové ionty a přítomností volných thiolových skupin v redukované formě je zachována. *Slabě glykovaná molekula (weakly glycated, BSA<sub>G25</sub>)* má již změněnou konformaci, která se projeví snížením v intenzitě vnitřní fluorescence a glykací některých lysinových zbytků. U BSA<sub>G100</sub> *tzv. highly glycated BSA* je znatelně snižená naměřená fluorescence Trp a patrná modifikace konformace molekuly. Glykované lysinové zbytky mohou produkovat volné radikály a u takto glykované molekuly je znemožněna vazba iontů přechodných kovů. Indukovaná oxidace thiolových skupin může vést k tvorbě disulfidických můstků nebo opět k tvorbě volných radikálů. Pokud je molekula BSA vystavena glykačním i oxidačním podmínkám, dochází k drastické konformační změně. Volné ionty přechodných kovů, které nemohou být vázány samotným BSA, reagují s glykovanými lysinovými zbytky a indukují tvorbu volných radikálů. Thiolové skupiny u takto poškozené proteinové molekuly se vyskytují pouze v oxidované formě a molekula BSA ztrácí svoje antioxidační vlastnosti (Bourdon a kol. 1999).



Obrázek 11: *Strukturální změny BSA následkem oxidačních a glykačních podmínek.* (Bourdon a kol. 1999)

### **3. CÍL PRÁCE**

- 1) Zjistit vliv methylglyoxalu na konformaci bovinního sérového albuminu a na tvorbu glykačních produktů pomocí fluorescence a absorpčních UV-VIS spekter.
- 2) Optimalizovat podmínky elektroforetické separace glykovaného BSA při:
  - a) nativní PAGE
  - b) SDS-PAGE
- 3) Sledovat vliv 8 derivátů kyseliny skořicové na neenzymovou glykaci BSA methylglyoxalem pomocí fluorescence.
- 4) Sledovat účinek hydroxyskořicových kyselin na neenzymovou glykaci BSA methylglyoxalem pomocí absorpčních UV-VIS spekter.
- 5) Sledovat vliv 8 derivátů kyseliny skořicové na neenzymovou glykaci BSA methylglyoxalem pomocí nativní a SDS-PAGE.
- 6) Sledovat vliv 8 derivátů kyseliny skořicové na neenzymovou glykaci AST methylglyoxalem pomocí nativní PAGE, SDS-PAGE a imunoblottingu.
- 7) Porovnat závislost struktury a účinku u studovaných látek.

## 4. MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 Materiál

<b>Bovinní sérový albumin (BSA), frakce V</b>	Sigma – Aldrich
<b>Methylglyoxal, 40% vodný roztok</b>	Sigma – Aldrich
<b>Aspartátaminotransferasa (AST)</b>	Roche Diagnostics
<b>Kyseliny <i>o</i>-kumarová (97%) a sinapová (99%)</b>	Fluka
<b>Kyseliny <i>m</i>-kumarová (99%), <i>p</i>-kumarová (99%), ferulová (99%), kávová (99%), chlorogenová (95%) a rozmarýnová (97%)</b>	Sigma – Aldrich
<b>Duo-Lux (chem./fluor. substrát pro alkalickou fosfatasu)</b>	Vector Laboratories
<b>Immun-Blot PVDF membrána (0,2 µm)</b>	BioRad
<b>Molekulový marker Precision Plus (All Blue, Unstained)</b>	BioRad
<b>myší monoklonální protilátka proti AGE-MGO [3C]</b>	Abcam
<b>králičí polyklonální protilátka proti IgG konjugovaná s AP</b>	Abcam
<b>EZ Blue Gel staining Reagent</b>	Sigma-Aldrich

Chemikálie pro přípravu pufrů pro inkubace, elektroforesu a blotting byly v p.a. kvalitě.

### 4.2 Přístroje pro měření

Digitální analytické váhy CP 225 D, *Sartorius*

Inkubátor *Memmert*

Spektrofotometr Helios β, *Spectronic Unicam*

Multifunkční modulární čtečka Infinite M200, *Tecan*

Elektroforetická aparatura Mini-Protein III, *BioRad*

Chlazená centrifuga Biofuge Stratos, *Heraeus*

pH metr *inoLab* pH Level 2

Programovatelný termomixer Thermomixer Comfort, *Eppendorf*

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

## 4.3 Metodika

### 4.3.1 Příprava základních reagensí

#### 4.3.1.1 Příprava pufru

Při přípravě inkubačních směsí i během jednotlivých měření jsem používala 0,1 M fosfátový pufr o pH 7,4 s 0,05% azidem sodným. Pufr jsem připravovala smícháním 190 ml 0,2 M roztoku  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 810 ml 0,2 M roztoku  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  a 1000 ml redistilované vody obsahující 1 g azidu sodného (antimikrobiální přísada). Pomocí pH-metru jsem zkontrolovala a v případě potřeby upravila pH na hodnotu 7,4.

#### 4.3.1.2 Příprava roztoku proteinu

Inkubační směsi pro všechny měření obsahovaly BSA ve výsledné koncentraci 1 mg/ml. S ohledem na výsledné zředění směsi jsem připravovala zásobní roztok BSA o koncentraci 2 mg/ml rozpuštěním přesné navážky proteinu v odpovídajícím objemu 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,4.

Pro některé elektroforetické experimenty jsem místo BSA použila jako modelový protein AST o výsledné koncentraci 0,45 mg/ml. Suspenzi AST v nasyceném síranu amonném jsem centrifugovala při 5000 otáčkách/min po dobu 20 minut při teplotě 4°C. Supernatant jsem odpipetovala a peletu obsahující protein jsem rozpustila v odpovídajícím množství 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,4 tak, aby vznikl roztok o koncentraci 1 mg/ml.

#### 4.3.1.3 Příprava roztoku glykačního činidla

Pro přípravu inkubačních směsí jsem jako glykační činidlo používala vždy 1 mM roztok methylglyoxalu, který jsem připravila naředěním 40% zásobního roztoku methylglyoxalu odpovídajícím množstvím 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,4. Po konečném zředění inkubační směsi obsahovaly glykační činidlo v koncentraci 0,5 mM.

#### 4.3.1.4 Příprava roztoků antioxidantů

Roztoky příslušných koncentrací (s ohledem na konečné zředění), jsem získala rozpuštěním přesné navážky látky v odpovídajícím množství methanolu.

Výsledné koncentrace hydroxyskořicových kyselin v inkubačních směsích byly 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M a 100  $\mu$ M.

### 4.3.2 Příprava inkubačních směsí

Inkubační směsi pro jednotlivá stanovení se lišily pouze v celkovém objemu, časových intervalech odběru a odebíraných objemech. Výsledné koncentrace všech složek směsi byly vždy stejné:

<b>BSA</b>	1 mg/ml
<b>AST</b>	0,45 mg/ml
<b>MGO</b>	0,5 mM
<b>HCA</b>	1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M a 100 $\mu$ M

V inkubačních směsích jsem používala 8 derivátů kyseliny skořicové (**kyselina *o*-kumarová, *m*-kumarová, *p*-kumarová, sinapová, chlorogenová, rozmarýnová, kávová a ferulová**) jako látky s potenciálními antiglykačními účinky v příslušných koncentracích (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M a 100  $\mu$ M).

Stanovení pomocí UV-VIS spekter vyžadovalo proměření slepých vzorků, které měly stejné složení jako inkubační směsi, pouze s tím rozdílem, že neobsahovaly BSA. Tyto slepé vzorky jsem inkubovala spolu s inkubačními směsmi po dobu 7 dní při 37°C. Některé směsi na elektroforesu obsahovaly jako modelovou bílkovinu pro glykaci AST místo BSA.

Konkrétní informace o složení jednotlivých inkubačních směsí, podmínky inkubace i příprava roztoků jsou vždy uvedeny u jednotlivých metod.

### 4.3.3 Měření fluorescence

#### 4.3.3.1 Inkubační směsi

Inkubační směsi pro měření fluorescence jsem připravila podle uvedeného schématu a inkubovala při 37°C po dobu 7 dní. V čase 0, 1, 3 a 7 dní inkubace jsem odebrala 620  $\mu$ l z každé inkubační směsi a dala jsem tyto vzorky zamrazit na -20°C.

Inkubační směs	Objem BSA 2 mg/ml [ml]	Objem pufru 0,1 M [ml]	Objem MGO 1 mM [ml]	Objem HCA [ $\mu$ l]	Výsledný objem [ml]
<i>BSA</i>	1,25	1,25	0	0	2,5
<i>BSA + MGO</i>	1,25	0	1,25	0	2,5
<i>BSA + MGO + 1 <math>\mu</math>M HCA</i>	1,25	0	1,25	2,5	2,5
<i>BSA + MGO + 10 <math>\mu</math>M HCA</i>	1,25	0	1,25	2,5	2,5
<i>BSA + MGO + 100 <math>\mu</math>M HCA</i>	1,25	0	1,25	2,5	2,5

#### 4.3.3.2 Podmínky měření

Vliv jednotlivých kyselin na tvorbu nespecifických AGEs, pentosidinu a vnitřní fluorescence BSA jsem sledovala při odpovídajících vlnových délkách excitace a emise na přístroji TECAN Infinite M200. V den měření jsem vzorky rozmrazila, rozpipetovala jsem je po 200  $\mu$ l na průhlednou mikrotitrační destičku a změřila fluorescence podle následující tabulky.

Název	Vlnové délky excitace/emise
Nespecifické AGEs	340/420
Pentosidin	335/385
Vnitřní fluorescence	295/340



Zaznamenávala jsem všechny naměřené hodnoty. Jako základní hodnotu 100% (kontrolu) jsem si určila inkubační směs BSA + MGO a ostatní hodnoty jsem s ní porovnávala. Prostřednictvím přepočtu vůči kontrole jsem mohla hodnotit vliv jednotlivých HCA na glykaci BSA methylglyoxalem. Také jsem vypočítala % **inhibice** jednotlivých kyselin podle vzorce převzatého z práce Wu a Yen (2005).

#### **4.3.4 Sledování vlivu na absorpční spektrum BSA**

##### *4.3.4.1 Inkubační směsi*

Směsi připravené podle následující tabulky jsem inkubovala při 37°C po dobu 7 dní a v čase 0, 1, 3 a 7 dní jsem proměřila UV-VIS spektra všech vzorků. Současně s přípravou inkubačních směsí jsem připravila slepé vzorky, které měly stejné složení jako inkubační směsi, ale neobsahovaly protein.

Inkubační směs	Objem BSA 2 mg/ml [ml]	Objem pufru 0,1 M [ml]	Objem MGO 1 mM [ml]	Objem HCA [μl]	Výsledný objem [ml]
<i>BSA</i>	1	1	0	0	2
<i>BSA + MGO</i>	1	0	1	0	2
<i>BSA + MGO + 1 μM HCA</i>	1	0	1	2	2
<i>BSA + MGO + 10 μM HCA</i>	1	0	1	2	2
<i>BSA + MGO + 100 μM HCA</i>	1	0	1	2	2

##### *4.3.4.2 Podmínky měření*

UV-VIS absorpční spektra vzorků jsem proměřovala na přístroji Heliosβ v rozsahu vlnových délek 200 – 500 nm proti 0,1 M fosfátovému pufru pH 7,4. Od naměřeného spektra vzorku jsem poté odečetla spektrum odpovídajícího slepého vzorku (bez BSA) za účelem eliminace změn absorpčního spektra vlivem HCA a MGO.

### ***4.3.5 Elektroforesa a imunoblotting***

#### ***4.3.5.1 Příprava roztoků pro PAGE a polyakrylamidových gelů***

***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. Tento roztok 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 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 a doplnila v odměrné baňce do 100 ml. Roztok jsem uchovávala v lednici.

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

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

***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.

Následující roztoky používané při SDS-PAGE a nativní PAGE se liší svým složením. Nativní PAGE se provádí za nenedenaturujících podmínek, a tudíž v nepřítomnosti SDS (laurylsíranu sodného), který slouží jako denaturační činidlo.

***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 do 1000 ml jsem roztok rozlila po 100 ml do

plastikových nádobek a dala zamrazit. Před provedením elektroforesy jsem vždy 70 ml koncentrovaného elektrodového pufru smíchala s 280 ml redestilované vody.

**Zásobní vzorkový pufr:** Tento roztok vznikl po smíchání:

<b>Roztok</b>	<b>SDS-PAGE*</b>	<b>Nativní PAGE**</b>
Redestilovaná voda [ml]	1,3	4,3
0,5 M Tris-HCl pufr, pH 6,8 [ml]	1,0	1,0
Glycerol [ml]	2,0	2,0
10% SDS [ml]	3,0	-
0,5% BFB [ml]	0,6	0,6

\* SDS-PAGE: do potřebného množství zásobního vzorkového pufru jsem těsně před použitím přidala 2-merkaptoethanol v množství 50 µl/ml.

\*\* Nativní PAGE: zásobní vzorkový pufr jsem už dále neředila a používala jsem ho takto.

**Separáční a zaostřovací gel:** Gely jsem si vždy připravila den před vlastním provedením elektroforesy podle rozpisu uvedeného v následující tabulce. Při sledování vlivu hydroxyskořicových kyselin na glykaci BSA methylglyoxalem jsem používala 7,5% separáční gel a pro glykaci AST gel 10%. Zaostřovací gel byl vždy 4%.

<b>Rozpis na 1 gel</b>	<b>Separáční gel 7,5%</b>	<b>Separáční gel 10%</b>		<b>Zaostřovací gel 4%</b>	
	SDS-PAGE	SDS-PAGE	Nativní PAGE	SDS-PAGE	Nativní PAGE
Redestilovaná H <sub>2</sub> O [ml]	2,45	2	5	1,563	3,176
1,5 M Tris.HCl (pH 8,8) [ml]	1,25	1,25	2,5	-	-
0,5 M Tris.HCl (pH 6,8) [ml]	-	-	-	0,625	1,25
Roztok AA+bis AA [ml]	1,25	1,7	2,5	0,25	0,5
10% SDS [ml]	0,05	0,05	-	0,025	-
10% APS [µl]	58	58	116	30	30
TEMED [µl]	4	4	8	2,5	2,5

#### 4.3.5.2 Příprava roztoků pro barvení gelů (Silver staining)

**Fixační roztok:** Příprava spočívala v rozpuštění 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  $\text{AgNO}_3$  (na 10 ml roztoku 2 g  $\text{AgNO}_3$ ), 1 ml  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 5 ml 4% roztoku  $\text{NaOH}$  a doplnila vodou do 100 ml.

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

#### 4.3.5.3 Příprava pracovních a barvicích roztoků pro Immunobloting

**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 chladicí místnosti.

**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  $\text{HCl}$ , doplnila na objem 1000 ml redestilovanou vodou a uchovávala v lednici.

**TBST:** Navážku  $\text{NaCl}$  (8,77 g) 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 do 1000 ml redestilovanou vodou. Roztok jsem uchovávala v lednici.

**TBS:** K navážce 2,19 g  $\text{NaCl}$  rozpuštěné ve 100 ml redestilované vody jsem přidala 25 ml 0,1 M TRIS pufru (pH 8,0) a doplnila na objem 250 ml.

**AP (alkalická fosfatasa) pufr:** 6,06 g TRISu a 508 mg  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  jsem rozpustila v 300 ml destilované vody. Upravila jsem pH roztoku pomocí 4 M  $\text{HCl}$  na 9,5 a doplnila na objem 500 ml.

**Vývojka:** Roztok jsem připravila naředěním zásobního koncentráту destilovanou vodou v poměru 1:10.

**Ustalovač:** Roztok jsem připravila naředěním zásobního koncentráту destilovanou vodou v poměru 1:5.

#### 4.3.5.4 Inkubační směsi

Inkubační směsi jsem připravila podle uvedeného schématu a inkubovala při 37°C po dobu 14 dní. V 3., 7. a 14. den inkubace jsem provedla odběr vzorků o objemu 50  $\mu\text{l}$ , které jsem dala zamrazit na -20°C.

##### a) Inkubační směsi obsahující BSA

Inkubační směs	Objem BSA 2 mg/ml [ $\mu\text{l}$ ]	Objem pufru 0,1 M [ $\mu\text{l}$ ]	Objem MGO 1 mM [ $\mu\text{l}$ ]	Objem HCA [ $\mu\text{l}$ ]	Výsledný objem [ $\mu\text{l}$ ]
<i>BSA</i>	100	100	0	0	200
<i>BSA + MGO</i>	100	0	100	0	200
<i>BSA + MGO + 1 <math>\mu\text{M}</math> HCA</i>	100	0	100	2	200
<i>BSA + MGO + 10 <math>\mu\text{M}</math> HCA</i>	100	0	100	2	200
<i>BSA + MGO + 100 <math>\mu\text{M}</math> HCA</i>	100	0	100	2	200

##### b) Inkubační směsi obsahující AST

Inkubační směs	Objem AST 0,9 mg/ml [ $\mu\text{l}$ ]	Objem pufru 0,1 M [ $\mu\text{l}$ ]	Objem MGO 1 mM [ $\mu\text{l}$ ]	Objem HCA 100 mM [ $\mu\text{l}$ ]	Výsledný Objem [ $\mu\text{l}$ ]
<i>AST</i>	100	100	0	0	200
<i>AST + MGO</i>	100	0	100	0	200
<i>AST + MGO + 100 <math>\mu\text{M}</math> HCA</i>	100	0	100	2	200

#### 4.3.5.5 Podmínky měření

Pro sledování změn molekul modelových proteinů vlivem glykace a potenciálního antiglykačního účinku studovaných antioxidantů jsem používala elektroforetické techniky. Vznik vysokomolekulárních AGE produktů jsem sledovala pomocí SDS-PAGE za denaturujících podmínek a také pomocí imunoblottingu za použití specifických protilátek proti AGE produktům odvozeným od methylglyoxalu. Pro sledování změn v náboji molekul proteinů vlivem glykace jsem používala nativní PAGE za nedenaturujících podmínek.

Den před vlastním provedením elektroforesy jsem si připravila gely dané koncentrace podle rozpisu ve výše uvedené tabulce. Vzorky jsem podle potřeby naředila SDS nebo destilovanou vodou a smíchala je s odpovídajícím množstvím vzorkového pufru. Takto připravené vzorky jsem denaturovala pomocí tepla (3 minuty při 99°C) v přítomnosti 2-merkaptoethanolu. Poté jsem je dala zchladit na pět minut do ledu. Takto připravené vzorky jsem napipetovala do jamek polyakrylamidového gelu a do jedné jamky jsem aplikovala molekulový marker (SDS-PAGE). Po ukončení elektroforesy jsem gely buď barvila stříbrem (Silver staining) nebo Coomassie blue G250 nebo jsem rozdělené proteiny přenesla na PVDF membránu pomocí Western blottingu a následně jsem je detekovala pomocí chemiluminiscenčního substrátu pro alkalickou fosfatasy.

Nejprve jsem optimalizovala podmínky elektroforesy (koncentrace gelů, koncentrace a objem nanášeného vzorku). V následující tabulce uvádím základní schéma, podle kterého jsem prováděla jak nativní PAGE tak SDS-PAGE.

<b>SDS – PAGE (denaturující)</b>	<b>Nativní PAGE (nedenaturující)</b>
<i>1.) Příprava roztoků vzorků z inkubačních směsí</i>	
<b>BSA: 12 µl vzorku + 3 µl SDS + 15 µl</b> vzorkového pufru <b>AST: 24 µl vzorku + 12 µl vzork. pufru</b> povaření 3 min	<b>BSA: 20 µl vzorku + 5 µl vody + 25 µl</b> vzorkového pufru <b>AST: 40 vzorku + 20 µl vzork. pufru</b>
<i>2.) Nanesení vzorků na gel</i>	
Tloušťka gelu: 0,75 mm Pipetuji <b>10 µl (BSA) a 12 µl (AST)</b> V první jamce molekulový standard <b>5 µl</b>	Tloušťka gelu: 1,5 mm Pipetuji <b>20 µl (BSA) a 30 µl (AST)</b>

<i>3.) Vlastní elektroforeza</i>	
Vanička s gely a elektrodoým pufrem ponořená do nádoby s ledem. Konstantní napětí 100 V (po dosažení rozhraní gelů) a poté zvýšení na 200 V	Vanička s gely a elektrodoým pufrem ponořená do nádoby s ledem. Procházející proud 20 mA (po dosažení rozhraní gelů) a poté zvýšení na 30 mA
<i>4.) Barvení gelů po elektroforese</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Silver staining (barvení stříbrem):</u> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Fixační roztok - 30 min</li> <li>2. Barvicí roztok - 15 min</li> <li>3. Redestilovaná voda - 3 x 1min</li> <li>4. Vyvíjecí roztok - přibližně 10min (dle potřeby)</li> <li>5. Redestilovaná voda</li> </ol> </li> <li>- <u>EZBlue gel staining reagent (barvení Coomassie Blue G250)</u> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Redestilovaná voda - 3 x 5 min promývání (u SDS-PAGE), 1 x 5 min (nativní ELFO)</li> <li>2. Barvicí roztok - 45 až 60 min</li> <li>3. Redestilovaná voda - 2 x 30 min odbarvení a poté přes noc</li> </ol> </li> </ul>	

Některé gely jsem po elektroforese nebarvila, ale nechala jsem je cca 5 minut plavat v blottovacím pufru a po aktivaci PDVF membrány methanolem jsem sestavila blotovací sendvič:

- bílá houbička
- silný filtrační papír
- gel
- PVDF membrána
- silný filtrační papír
- bílá houbička

Všechny součásti jsem vždy nejprve namočila do blottovacího pufru a před uzavřením sendviče jsem odstranila vzduchové bublinky pomocí skleněné tyčinky. Blotting probíhal při konstantním napětí 100 V po dobu 90 min a po jeho ukončení následovalo několikanásobné promývání a inkubace s předem připravenými roztoky protilátek podle rozpisu, který uvádím v následující tabulce.

<b>Detekce (barvení membrány s AP-protilátkou)</b>	
<b>Oplach membrány po blottingu:</b> 25 ml TBS	1 min
<b>Blokování membrány:</b> 8% mléko v TBST	přes noc
<b>Oplach membrány:</b> 25 ml TBST	2 x 5 min
<b>Inkubace s primární protilátkou:</b> 25 ml TBST + 125 mg mléka + 25 µl anti-MGO	45 min
<b>Oplach membrány po inkubaci:</b> TBST	6 x 5 min
<b>Inkubace se sekundární protilátkou:</b> 25 ml TBST + 25 µl sekundární Ab-AP	45 min
<b>Oplach membrány po inkubaci:</b> 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 na fotografický film.

<b>Postup chemiluminiscenční detekce</b>	
<b>Aplikace substrátu</b> (1,5 ml) na povrch membrány	5 min
<b>Expozice:</b> kazeta PVDF membrána (ve vodotěsné folii) a fotografický film	5 min
<b>Vyvíjení:</b> Ponoření celého filmu do naředěného roztoku vývojky	Ihned po expozici
<b>Oplach</b> v destilované vodě (zástava vyvíjení)	
<b>Ustálení:</b> Ponoření do naředěného roztoku ustalovače.	cca 1 min
<b>Oplach</b> v destilované vodě (zástava vyvíjení)	

Gely a filmy jsem poté naskenovala a vyhodnocovala na přístroji GelDoc v ovládacím programu Quantity One.



## **5. VÝSLEDKY**

Výsledkovou část jsem koncipovala do tří kapitol podle metodik, kterými jsem zkoumala potenciální antiglykační schopnost hydroxyskořicových kyselin.

Dodržování stejného barevného označení jednotlivých kyselin u všech měření nebylo možné s ohledem na různé koncentrace. Pro zjednodušení a lepší orientaci bylo barevné rozlišení dodržované vždy pouze v rámci jedné metodiky.

### **5.1 Fluorescenční stanovení**

Sledovala jsem vliv hydroxyskořicových kyselin na glykaci modelové bílkoviny BSA. U každé HCA jsem zkoušela koncentrace 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ . Stanovovanými parametry byly *nespecifické AGEs*, *pentosidin* a *vnitřní (tryptofanová) fluorescence*.

Naměřené hodnoty fluorescence AGEs a pentosidinu v jednotlivých vzorcích po 7 dnech inkubace jsou uvedeny v jednotkách AU v tabulce s vypočítanými směrodatnými odchylkami. Vliv jednotlivých kyselin na jejich tvorbu byl hodnocen pomocí vypočítané procentuální inhibice směsi obsahující „BSA + MGO + HCA“ proti glykované kontrole („BSA + MGO“). Tyto výsledky jsou zdokumentovány v grafech. Vliv jednotlivých HCAs jsem hodnotila pomocí *nepárového studentova t-testu* s pravděpodobností 99%. Statisticky významná inhibice je přímo v grafu označena \*\* ( $p < 0,01$ ). Měření vnitřní fluorescence probíhalo v čase 0, 1, 3 a 7 dní inkubace a naměřené hodnoty jsou zobrazeny v grafu.

### 5.1.1 Kyselina *o*-kumarová

Bazální fluorescence BSA byla nízká a po celou dobu inkubace se významně neměnila. Methylglyoxal způsobil výrazný nárůst fluorescence AGEs i pentosidinu během inkubace. Po 7 dnech byla fluorescence AGEs čtyřicetsedmkrát vyšší ve vzorku obsahujícím BSA + MGO (kontrola) než ve směsi obsahující pouze BSA. Nárůst fluorescence pentosidinu byl v této směsi sedmnáctinásobný.

Kyselina *o*-kumarová v koncentracích 1  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$  nevykazovala žádný významný antiglykační efekt na tvorbu nespecifických AGEs ani pentosidinu. Kyselina *o*-kumarová 100  $\mu\text{M}$  snížila tvorbu pentosidinu o 20% a nespecifických AGEs o 25% proti kontrole. V obou případech byl tento inhibiční vliv statisticky významný ( $p < 0,01$ ).

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1 a na obrázcích 12 a 13.

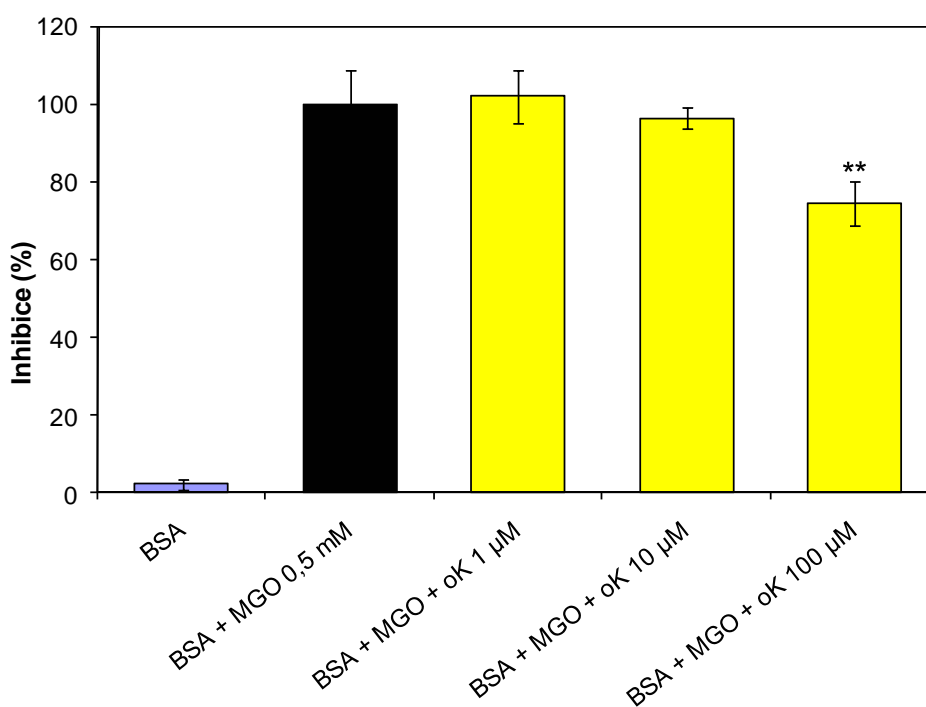
Vnitřní fluorescence je významným kritériem pro hodnocení konformačních změn v molekule proteinu. Inkubace BSA po dobu 7 dní při 37°C neměla vliv na prostorové uspořádání jeho molekuly, protože vnitřní fluorescence se během ní téměř neměnila. Zaznamenala jsem pouze mírný pokles (o 4 – 5%), který ale nebyl statisticky významný. Naproti tomu inkubace BSA s MGO vedla k rychlé a výrazné ztrátě vnitřní fluorescence bílkoviny. Již po 1 dnu inkubace poklesla o 32% a po týdnu inkubace dokonce až o 53% proti úvodním hodnotám.

Kyselina *o*-kumarová způsobila ve všech studovaných koncentracích významný pokles hodnot vnitřní fluorescence BSA. Tento pokles byl patrně vyvolán jednak působením MGO a také přímou interakcí kyseliny *o*-kumarové s molekulou BSA. Pouze 1  $\mu\text{M}$  kyselina *o*-kumarová mírně snížila tento pokles ve srovnání s inkubační směsí obsahující BSA + MGO, ale tento účinek nebyl statisticky významný.

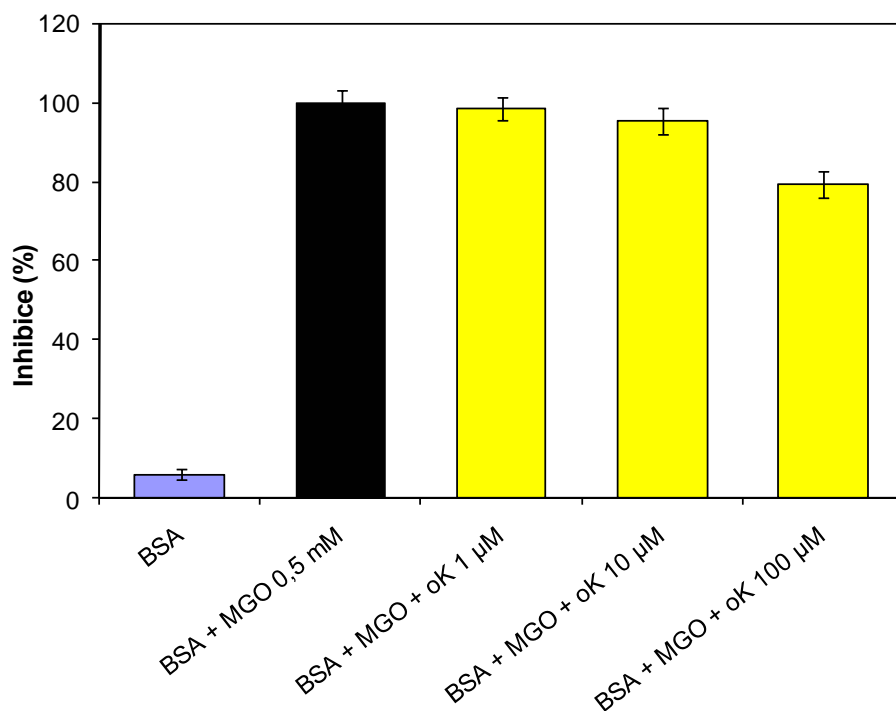
Výsledky jsou prezentovány v obrázku 14.

Tabulka 1: Vliv kyseliny *o*-kumarové (1 – 100  $\mu$ M) na vznik AGE produktů a pentosidinu během glykace BSA methylglyoxalem (0,5 mM). Koncentrace bílkoviny ve směsi byla 1 mg/ml. Vzorky byly inkubovány při 37°C po dobu 7 dní. Fluorescence byla měřena při vlnových délkách excitace/emise 340/420 nm (AGE produkty) a 335/385 nm (pentosidin).

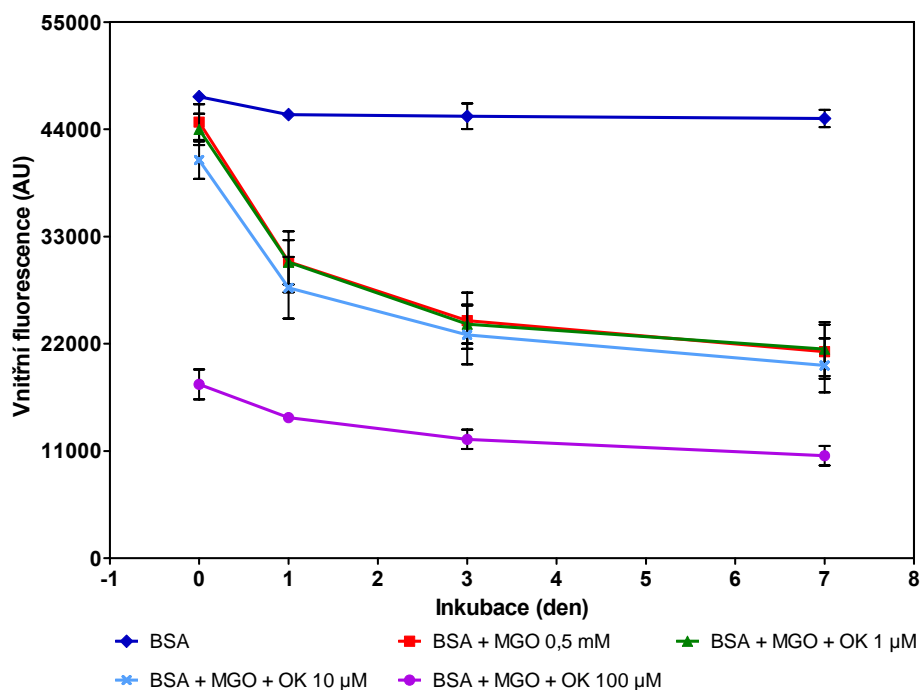
Vzorek (Inkubace: 37°C, 7 dní)	Intenzita fluorescence (AU) $\pm$ S.D.	
	<i>AGEs</i>	<i>Pentosidin</i>
<i>BSA</i>	311,50 $\pm$ 218,70	70,15 $\pm$ 16,45
<i>Kontrola BSA + MGO 0,5 mM</i>	14576,00 $\pm$ 1172,47	1164,38 $\pm$ 31,40
<i>BSA + MGO + 1 <math>\mu</math>M <i>o</i>-kumarová</i>	14819,00 $\pm$ 717,69	1145,20 $\pm$ 51,77
<i>BSA + MGO + 10 <math>\mu</math>M <i>o</i>-kumarová</i>	14027,25 $\pm$ 808,22	1111,88 $\pm$ 38,74
<i>BSA + MGO + 100 <math>\mu</math>M <i>o</i>-kumarová</i>	10817,68 $\pm$ 713,22	924,63 $\pm$ 45,01



Obr. 12: Inhibiční účinek kyseliny *o*-kumarové (1 – 100  $\mu$ M) na tvorbu AGE produktů při glykaci BSA methylglyoxalem (0,5 mM). Koncentrace bílkoviny ve směsi byla 1 mg/ml. Fluorescence měřena při vlnových délkách excitace/emise 340/420 nm.



Obr. 13: Inhibiční účinek kyseliny *o*-kumarové (1 – 100  $\mu$ M) na vznik pentosidinu při glykaci BSA methylglyoxalem (0,5 mM). Koncentrace bílkoviny ve směsi byla 1 mg/ml. Fluorescence měřena při vlnových délkách excitace/emise 335/385 nm.



Obr. 14: Vliv kyseliny *o*-kumarové (1 – 100  $\mu$ M) a MGO (0,5 mM) na vnitřní fluorescenci BSA (1 mg/ml). Vzorčky byly inkubovány při teplotě 37°C po dobu 7 dní. Fluorescence měřena při vlnových délkách excitace/emise 295/340 nm.

### 5.1.2 Kyselina *m*-kumarová

Kyselina *m*-kumarová ve všech studovaných koncentracích (1, 10 a 100  $\mu\text{M}$ ) vykazovala slabý antiglykační účinek na tvorbu nesespecifických AGEs a pentosidinu. Tento efekt ovšem nebyl ve většině případů ze statistického hlediska významný. Jedině kyselina *m*-kumarová 100  $\mu\text{M}$  snížila vznik pentosidinu o 8% vzhledem ke glykované kontrole (BSA + MGO), což se ukázalo jako statisticky významná inhibice ( $p < 0,01$ ).

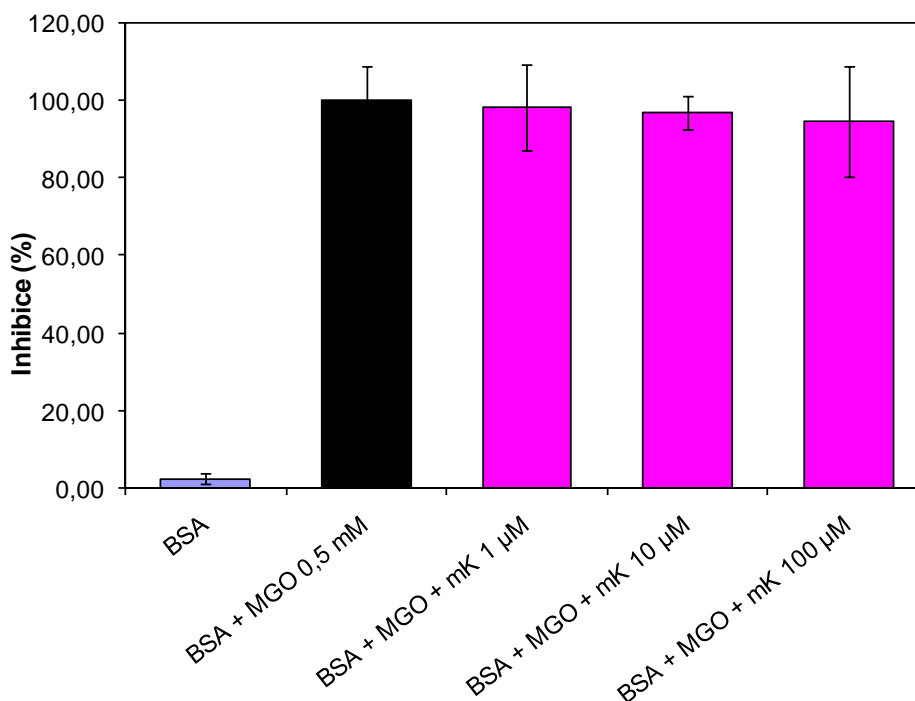
Výsledky jsou zdokumentovány v tabulce 2 a na obrázcích 15 a 16.

Vnitřní fluorescence BSA vlivem MGO a kyseliny *m*-kumarové významně klesala již od 1. dne inkubace. Se zvyšující se koncentrací kyseliny se tento pokles zvětšoval. Mírné zlepšení jsem zaznamenala jen u 1  $\mu\text{M}$  koncentrace ve 3. a 7. dni inkubace při srovnání naměřených hodnot s glykovanou kontrolou

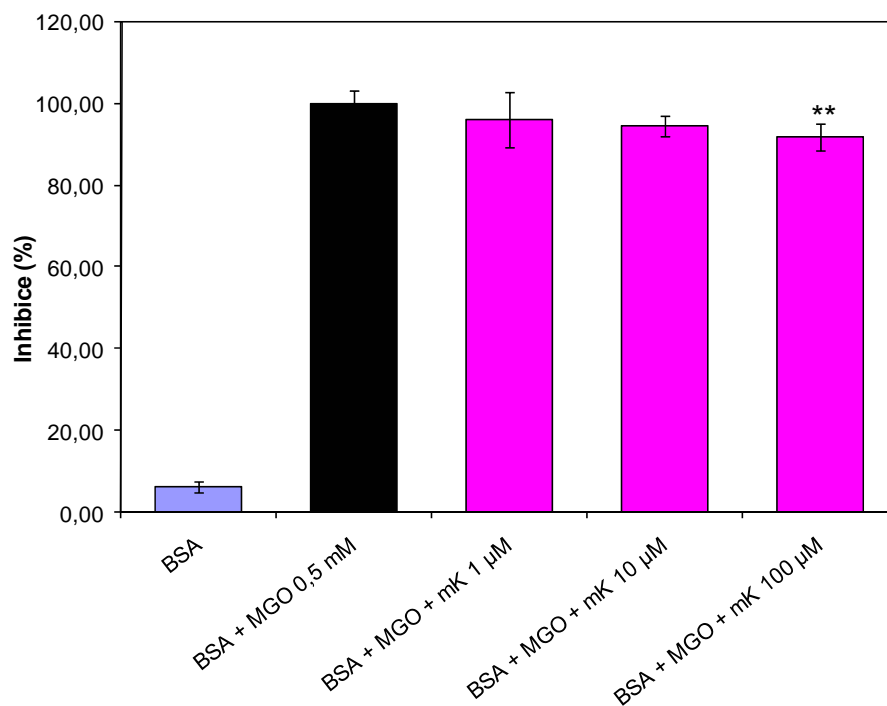
Výsledky jsou uvedeny v obrázku 17.

Tabulka 2: Vliv kyseliny *m*-kumarové (1 – 100  $\mu$ M) na vznik AGE produktů a pentosidinu během glykace BSA methylglyoxalem (0,5 mM). Koncentrace bílkoviny ve směsi byla 1 mg/ml. Vzorky byly inkubovány při 37°C po dobu 7 dní. Fluorescence byla měřena při vlnových délkách excitace/emise 340/420 nm (AGE produkty) a 335/385 nm (pentosidin).

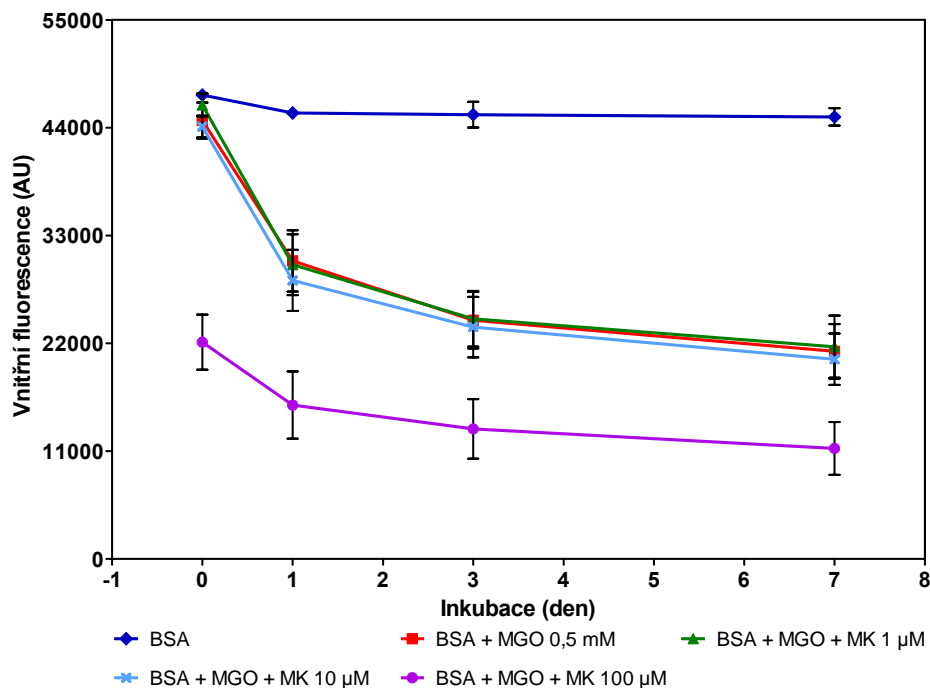
Vzorek (Inkubace: 37°C, 7 dní)	Intenzita fluorescence (AU) $\pm$ S.D.	
	AGEs	Pentosidin
<b>BSA</b>	311,50 $\pm$ 218,70	70,15 $\pm$ 16,45
<b>Kontrola BSA + MGO</b>	14576,00 $\pm$ 1172,47	1164,38 $\pm$ 31,40
<b>BSA + MGO + 1 <math>\mu</math>M <i>m</i>-kumarová</b>	14265,75 $\pm$ 1190,11	1117,83 $\pm$ 97,22
<b>BSA + MGO + 10 <math>\mu</math>M <i>m</i>-kumarová</b>	14092,50 $\pm$ 745,10	1100,50 $\pm$ 44,84
<b>BSA + MGO + 100 <math>\mu</math>M <i>m</i>-kumarová</b>	13681,03 $\pm$ 1031,67	1067,40 $\pm$ 13,75



Obr. 15: Inhibiční účinek kyseliny *m*-kumarové (1 – 100  $\mu$ M) na tvorbu AGE produktů při glykaci BSA methylglyoxalem (0,5 mM). Koncentrace bílkoviny ve směsi byla 1 mg/ml. Fluorescence měřena při vlnových délkách excitace/emise 340/420 nm.



Obr. 16: Inhibiční účinek kyseliny *m*-kumarové (1 – 100  $\mu$ M) na vznik pentosidinu při glykaci BSA methylglyoxalem (0,5 mM). Koncentrace bílkoviny ve směsi byla 1 mg/ml. Fluorescence měřena při vlnových délkách excitace/emise 335/385 nm.



Obr. 17: Vliv kyseliny *m*-kumarové (1 – 100  $\mu$ M) a MGO (0,5 mM) na vnitřní fluorescenci BSA (1 mg/ml). Vzorčky byly inkubovány při teplotě 37°C po dobu 7 dní. Fluorescence měřena při vlnových délkách excitace/emise 295/340 nm.

### 5.1.3 Kyselina *p*-kumarová

Kyselina *p*-kumarová v koncentracích 1  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$  nevykazovala téměř žádný pozitivní účinek na tvorbu pentosidinu a vznik nespecifických AGEs. V koncentraci 100  $\mu\text{M}$  vykazovala statisticky významný inhibiční vliv na glykaci BSA methylglyoxalem, který činil přibližně 15% inhibice tvorby pentosidinu a 12% tvorby nespecifických AGEs oproti glykované kontrole (BSA + MGO).

Výsledky jsou prezentovány v tabulce 3 a obrázcích 18 a 19.

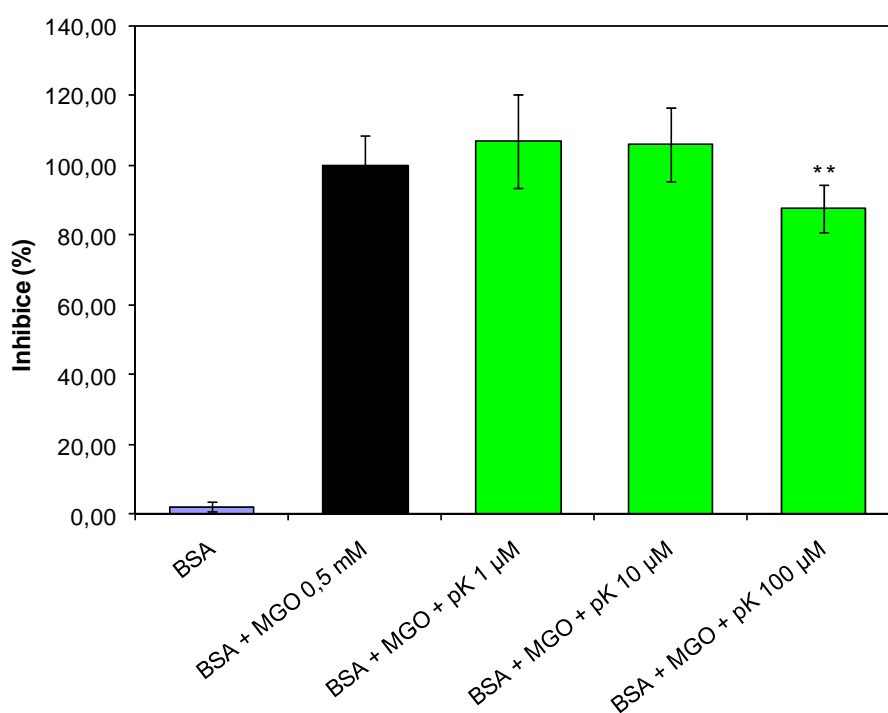
Vnitřní fluorescence BSA vlivem MGO a kyseliny *p*-kumarové významně klesala již od 1. dne inkubace. Se zvyšující se koncentrací kyseliny se tento pokles zvětšoval. Mírné zlepšení bylo patrné jen u 1  $\mu\text{M}$  koncentrace ve 3. a 7. dni inkubace při srovnání naměřených hodnot s glykovanou kontrolou.

Výsledky jsou uvedeny v obrázku 20.

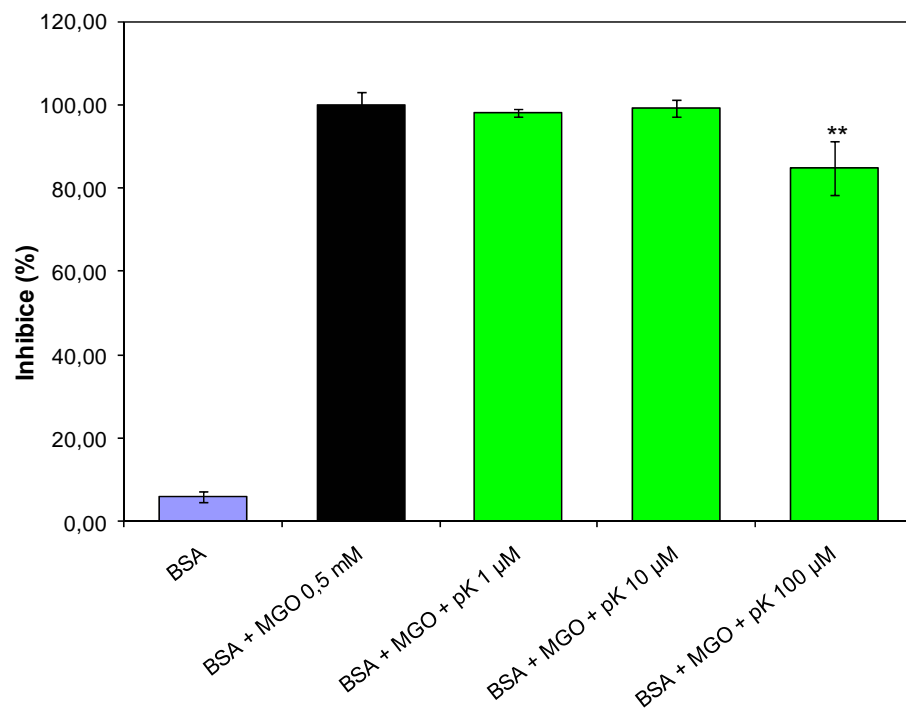


Tabulka 3: Vliv kyseliny *p*-kumarové (1 – 100  $\mu$ M) na vznik AGE produktů a pentosidinu během glykace BSA methylglyoxalem (0,5 mM). Koncentrace bílkoviny ve směsi byla 1 mg/ml. Vzorky byly inkubovány při 37°C po dobu 7 dní. Fluorescence byla měřena při vlnových délkách excitace/emise 340/420 nm (AGE produkty) a 335/385 nm (pentosidin).

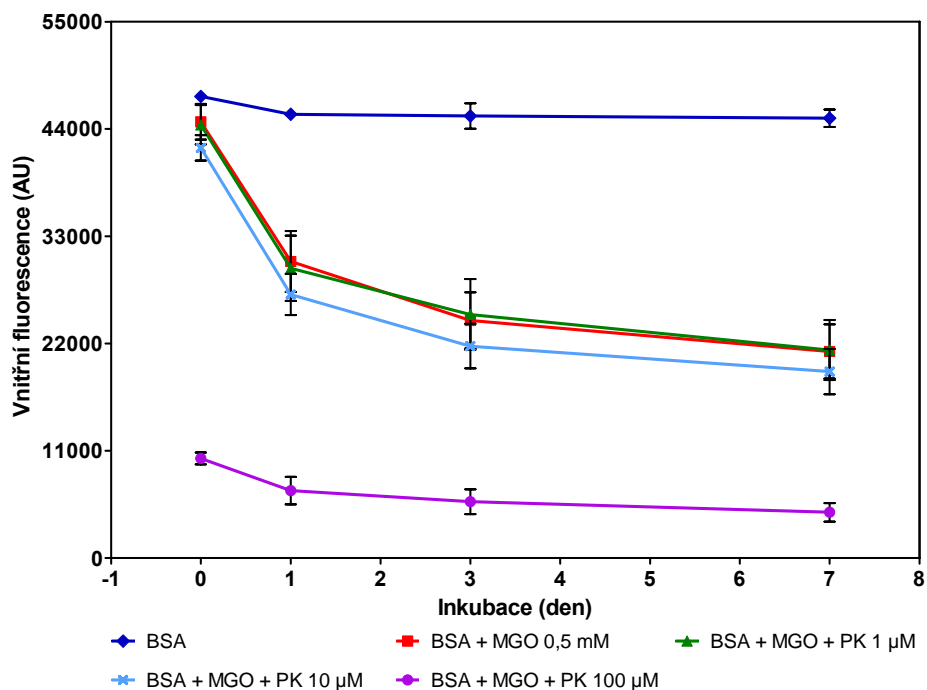
Vzorek (Inkubace: 37°C, 7 dní)	Intenzita fluorescence (AU) $\pm$ S.D.	
	AGEs	Pentosidin
<b>BSA</b>	311,50 $\pm$ 218,70	70,15 $\pm$ 16,45
<b>Kontrola BSA + MGO</b>	14576,00 $\pm$ 1172,47	1164,38 $\pm$ 31,40
<b>BSA + MGO + 1 <math>\mu</math>M <i>p</i>-kumarová</b>	15515,00 $\pm$ 807,17	1143,08 $\pm$ 25,13
<b>BSA + MGO + 10 <math>\mu</math>M <i>p</i>-kumarová</b>	15365,00 $\pm$ 369,08	1154,98 $\pm$ 17,54
<b>BSA + MGO + 100 <math>\mu</math>M <i>p</i>-kumarová</b>	12803,63 $\pm$ 1646,23	987,18 $\pm$ 65,40



Obr. 18: Inhibiční účinek kyseliny *p*-kumarové (1 – 100  $\mu$ M) na tvorbu AGE produktů při glykaci BSA methylglyoxalem (0,5 mM). Koncentrace bílkoviny ve směsi byla 1 mg/ml. Fluorescence měřena při vlnových délkách excitace/emise 340/420 nm.



Obr. 19: Inhibiční účinek kyseliny *p*-kumarové (1 – 100 µM) na vznik pentosidinu při glykaci BSA methylglyoxalem (0,5 mM). Koncentrace bílkoviny ve směsi byla 1 mg/ml. Fluorescence měřena při vlnových délkách excitace/emise 335/385 nm.



Obr. 20: Vliv kyseliny *p*-kumarové (1 – 100 µM) a MGO (0,5 mM) na vnitřní fluorescenci BSA (1 mg/ml). Vzorky byly inkubovány při teplotě 37°C po dobu 7 dní. Fluorescence měřena při vlnových délkách excitace/emise 295/340 nm.

#### ***5.1.4 Kyselina sinapová***

Kyselina sinapová neprojevila ani v jedné studované koncentraci pozitivní protektivní účinek proti vzniku pentosidinu a nescifických AGEs. Naproti tomu v koncentraci 100  $\mu\text{M}$  způsobila zvýšení tvorby pentosidinu o 9% ve srovnání s kontrolou (BSA + MGO), ale tento efekt nebyl statisticky významný.

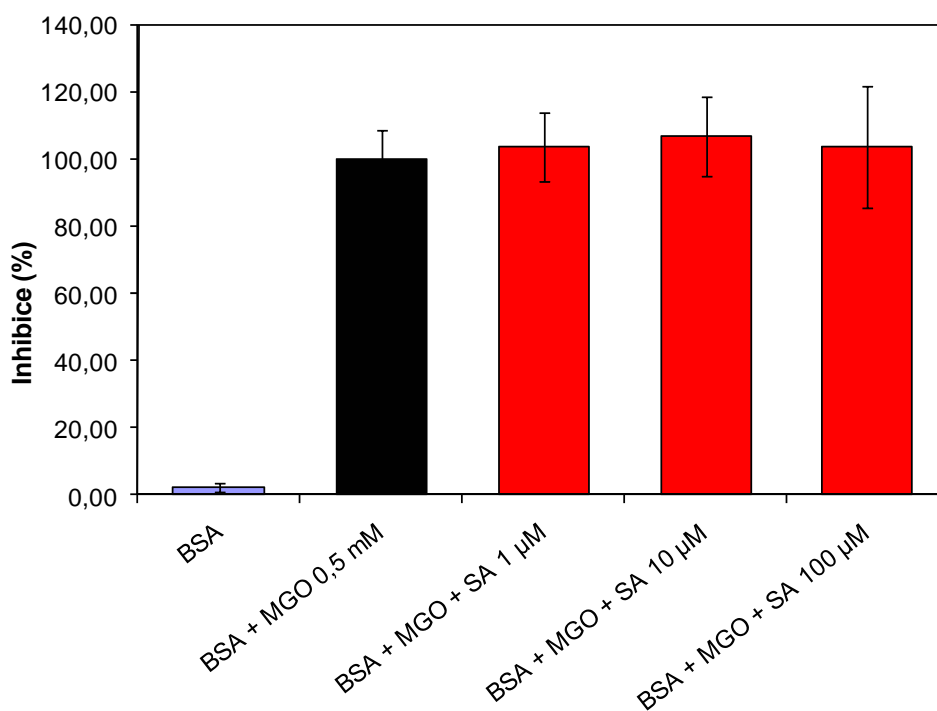
Výsledky jsou zdokumentovány v tabulce 4 a obrázcích 21 a 22.

Vnitřní fluorescence BSA vlivem MGO a kyseliny sinapové významně klesala již od 1. dne inkubace. Se zvyšující se koncentrací kyseliny se tento pokles zvětšoval. Mírné zlepšení bylo patrné jen u 1  $\mu\text{M}$  koncentrace ve všech měřených intervalech při srovnání naměřených hodnot s glykovanou kontrolou.

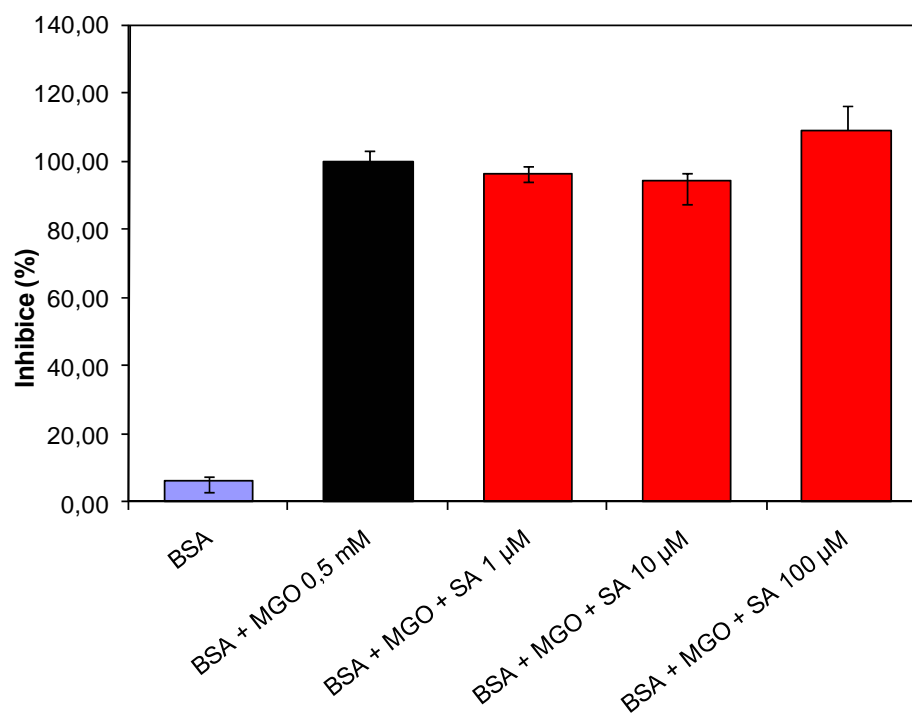
Výsledky jsou uvedeny v obrázku 23.

Tabulka 4: Vliv kyseliny sinapové (1 – 100  $\mu\text{M}$ ) na vznik AGE produktů a pentosidinu během glykace BSA methylglyoxalem (0,5 mM). Koncentrace bílkoviny ve směsi byla 1 mg/ml. Vzorky byly inkubovány při 37°C po dobu 7 dní. Fluorescence byla měřena při vlnových délkách excitace/emise 340/420 nm (AGE produkty) a 335/385 nm (pentosidin).

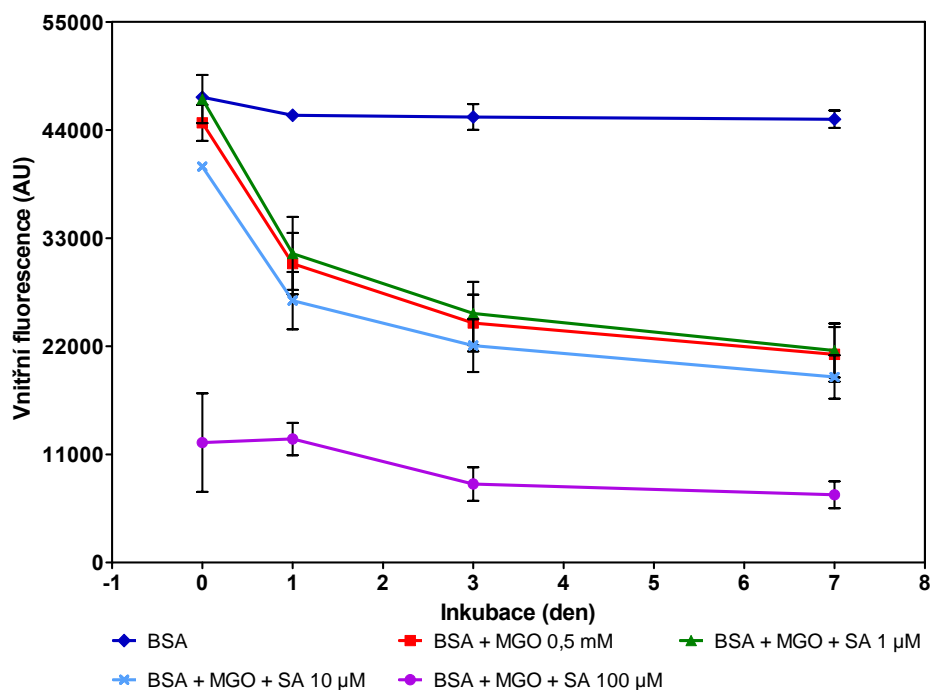
Vzorek (Inkubace: 37°C, 7 dní)	Intenzita fluorescence (AU) $\pm$ S.D.	
	AGEs	Pentosidin
<b>BSA</b>	311,50 $\pm$ 218,70	70,15 $\pm$ 16,45
<b>Kontrola BSA + MGO</b>	14576,00 $\pm$ 1172,47	1164,38 $\pm$ 31,40
<b>BSA + MGO + 1 <math>\mu\text{M}</math> sinapová</b>	15028,25 $\pm$ 528,42	1123,23 $\pm$ 36,05
<b>BSA + MGO + 10 <math>\mu\text{M}</math> sinapová</b>	15447,75 $\pm$ 492,89	1098,10 $\pm$ 52,33
<b>BSA + MGO + 100 <math>\mu\text{M}</math> sinapová</b>	14972,00 $\pm$ 1519,90	1271,18 $\pm$ 99,18



Obr. 21: Inhibiční účinek kyseliny sinapové (1 – 100  $\mu\text{M}$ ) na tvorbu AGE produktů při glykaci BSA methylglyoxalem (0,5 mM). Koncentrace bílkoviny ve směsi byla 1 mg/ml. Fluorescence měřena při vlnových délkách excitace/emise 340/420 nm.



Obr. 22: Inhibiční účinek kyseliny sinapové (1 – 100  $\mu\text{M}$ ) na vznik pentosidinu při glykaci BSA methylglyoxalem (0,5 mM). Koncentrace bílkoviny ve směsi byla 1 mg/ml. Fluorescence měřena při vlnových délkách excitace/emise 335/385 nm.



Obr. 23: Vliv kyseliny sinapové (1 – 100  $\mu\text{M}$ ) a MGO (0,5 mM) na vnitřní fluorescenci BSA (1 mg/ml). Vzorky byly inkubovány při teplotě 37°C po dobu 7 dní. Fluorescence měřena při vlnových délkách excitace/emise 295/340 nm.

### ***5.1.5 Kyselina chlorogenová***

Kyselina chlorogenová prohlubovala glykaci BSA methylglyoxalem ve všech testovaných koncentracích. Způsobila statisticky významný ( $p < 0,01$ ) nárůst vzniku nescifických AGEs o 29% a 53% v 10  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  koncentraci. Zvýšila také vznik pentosidinu a to o 13% v případě 10 a 100  $\mu\text{M}$  koncentrace, který ale nebyl statisticky významný.

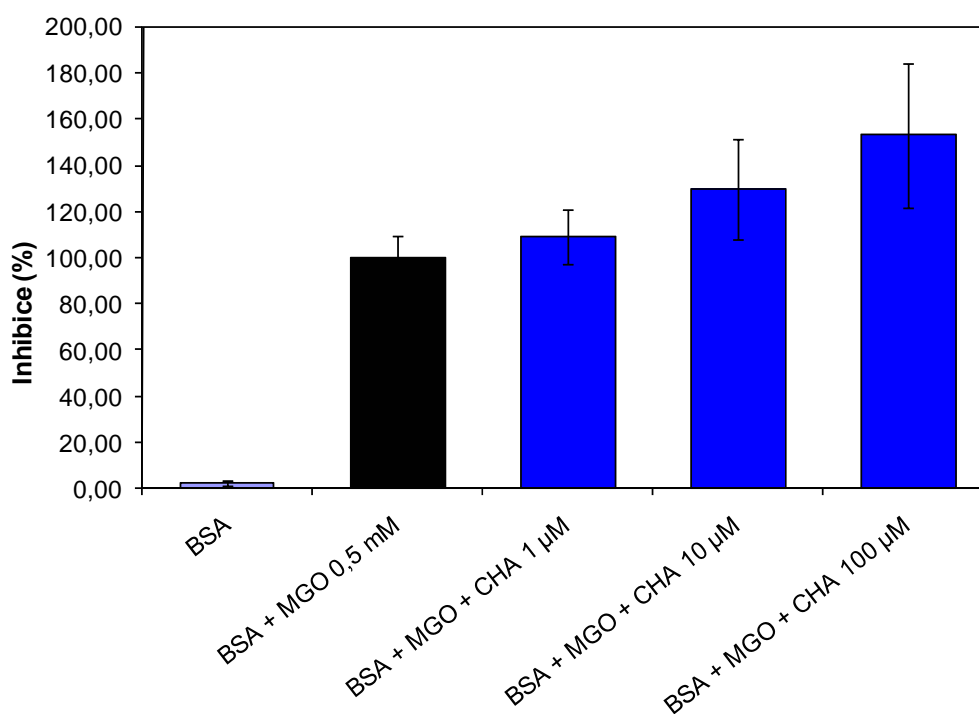
Výsledky jsou prezentovány v tabulce 5 a obrázcích 24 a 25.

Také ve vnitřní fluorescenci jsem zaznamenala pokles způsobený přítomností MGO a kyseliny chlorogenové. Se zvyšující se koncentrací kyseliny se tento pokles zvětšoval. Mírné zlepšení bylo patrné jen u 1  $\mu\text{M}$  koncentrace v čase 0, 3 a 7 dní inkubace při srovnání naměřených hodnot s glykovanou kontrolou.

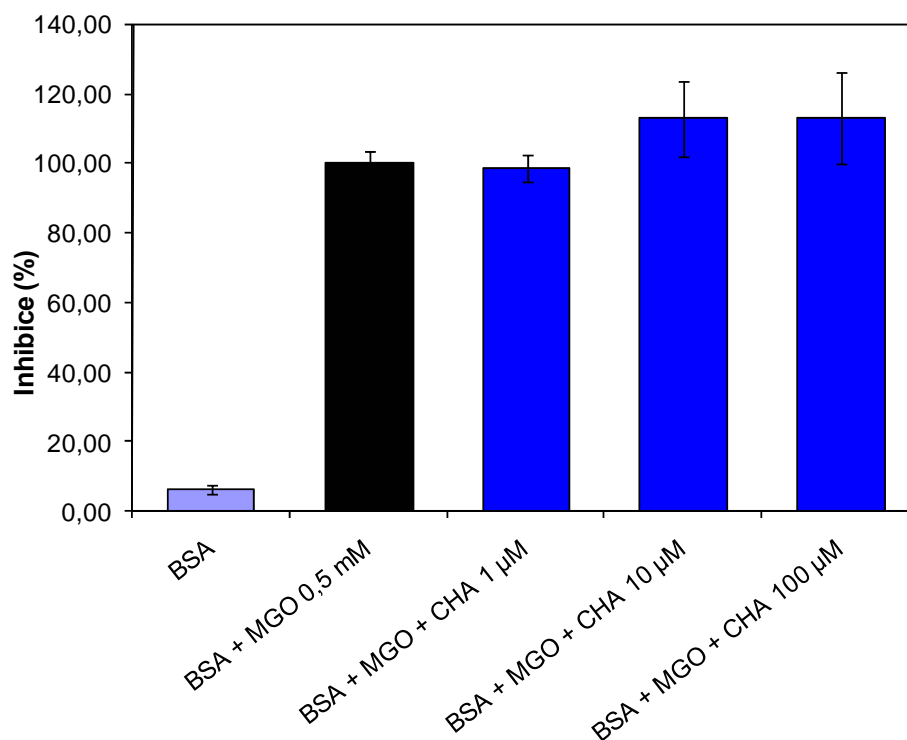
Výsledky jsou uvedeny v obrázku 26.

Tabulka 5: Vliv kyseliny chlorogenové (1 – 100  $\mu\text{M}$ ) na vznik AGE produktů a pentosidinu během glykace BSA methylglyoxalem (0,5 mM). Koncentrace bílkoviny ve směsi byla 1 mg/ml. Vzorky byly inkubovány při 37°C po dobu 7 dní. Fluorescence byla měřena při vlnových délkách excitace/emise 340/420 nm (AGE produkty) a 335/385 nm (pentosidin).

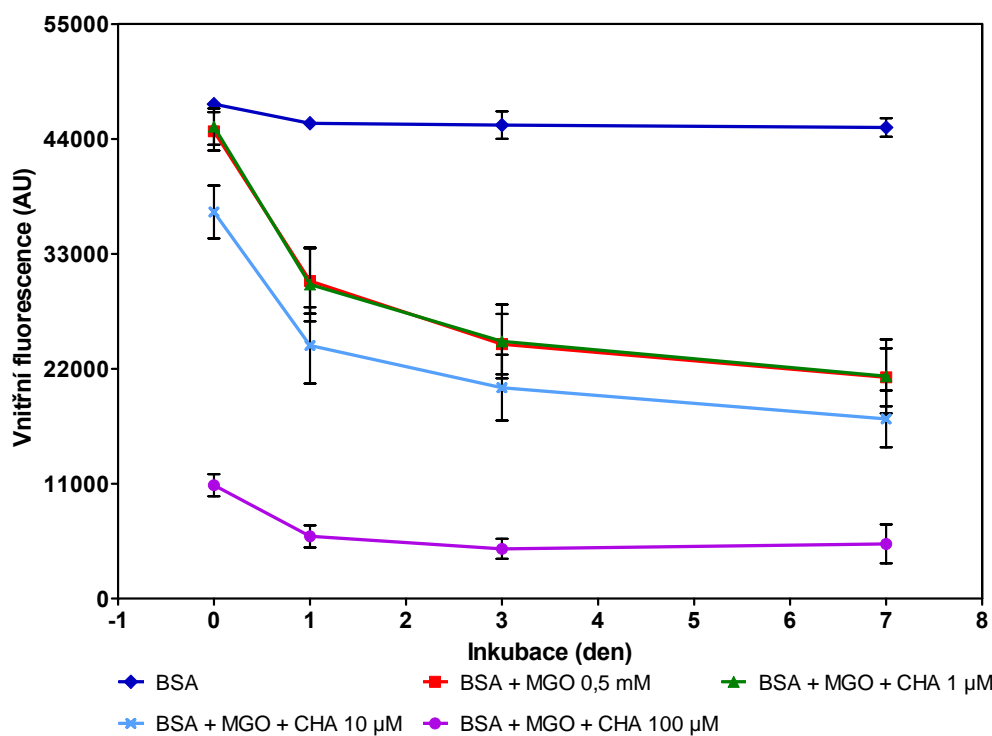
Vzorek (Inkubace: 37°C, 7 dní)	Intenzita fluorescence (AU) $\pm$ S.D.	
	AGEs	Pentosidin
<b>BSA</b>	311,50 $\pm$ 218,70	70,15 $\pm$ 16,45
<b>Kontrola BSA + MGO</b>	14576,00 $\pm$ 1172,47	1164,38 $\pm$ 31,40
<b>BSA + MGO + 1 <math>\mu\text{M}</math> chlorogenová</b>	15777,00 $\pm$ 467,46	1146,75 $\pm$ 60,40
<b>BSA + MGO + 10 <math>\mu\text{M}</math> chlorogenová</b>	18646,43 $\pm$ 1713,26	1313,75 $\pm$ 148,70
<b>BSA + MGO + 100 <math>\mu\text{M}</math> chlorogenová</b>	22026,83 $\pm$ 2879,34	1317,20 $\pm$ 178,06



Obr. 24: Inhibiční účinek kyseliny chlorogenové (1 – 100  $\mu\text{M}$ ) na tvorbu AGE produktů při glykaci BSA methylglyoxalem (0,5 mM). Koncentrace bílkoviny ve směsi byla 1 mg/ml. Fluorescence měřena při vlnových délkách excitace/emise 340/420 nm.



Obr. 25: Inhibiční účinek kyseliny chlorogenové (1 – 100 µM) na vznik pentosidinu při glykaci BSA methylglyoxalem (0,5 mM). Koncentrace bílkoviny ve směsi byla 1 mg/ml. Fluorescence měřena při vlnových délkách excitace/emise 335/385 nm.



Obr. 26: Vliv kyseliny chlorogenové (1 – 100 µM) a MGO (0,5 mM) na vnitřní fluorescenci BSA (1 mg/ml). Vzorky byly inkubovány při teplotě 37°C po dobu 7 dní. Fluorescence měřena při vlnových délkách excitace/emise 295/340 nm.



### ***5.1.6 Kyselina rozmarýnová***

Kyselina rozmarýnová 10  $\mu\text{M}$  vykazovala významný proglykační efekt. Zvýšila vznik nespecifických AGEs o 62% a pentosidinu o 42%. Naproti tomu 100  $\mu\text{M}$  kyselina rozmarýnová dokázala snížit množství vznikajících AGEs o 22% a pentosidinu dokonce o 43%. Všechny popsané účinky (pozitivní i negativní) byly statisticky významné ( $p < 0,01$ ).

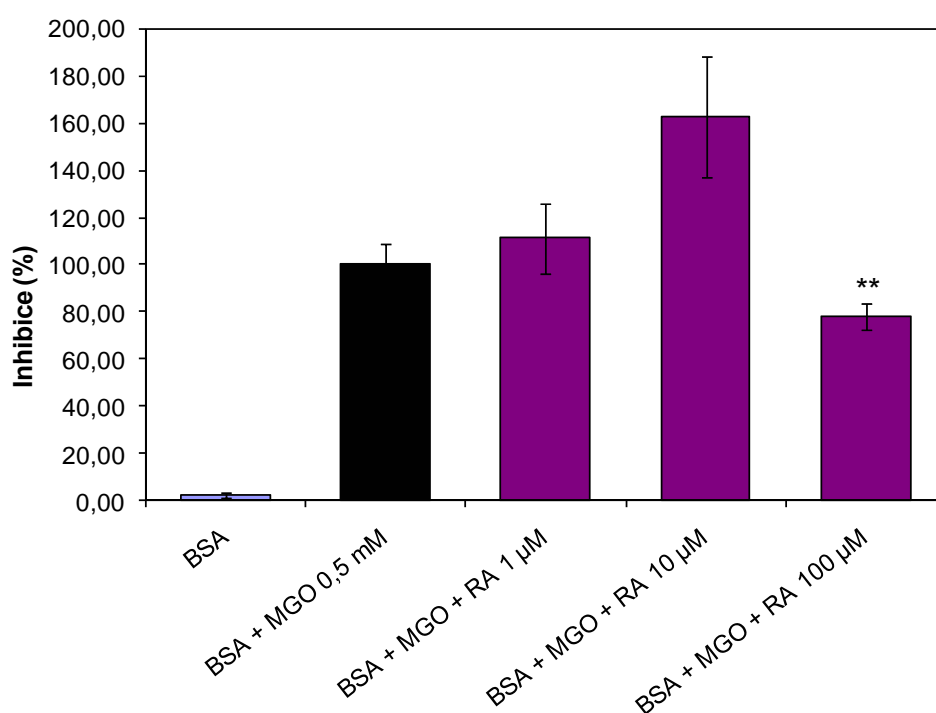
Výsledky jsou uvedeny v tabulce 6 a obrázcích 27 a 28.

Kyselina rozmarýnová 100  $\mu\text{M}$  spolu s MGO způsobila největší pokles vnitřní fluorescence BSA ze všech sledovaných hydroxyskořicových kyselin. Již na začátku inkubace činila intenzita fluorescence tryptofanových zbytků v inkubační směsi obsahující „BSA + MGO + RA“ jen 12% intenzity samotného BSA a v průběhu inkubace ještě dále klesala. Naproti tomu 1  $\mu\text{M}$  RA vykazovala mírný ochranný účinek.

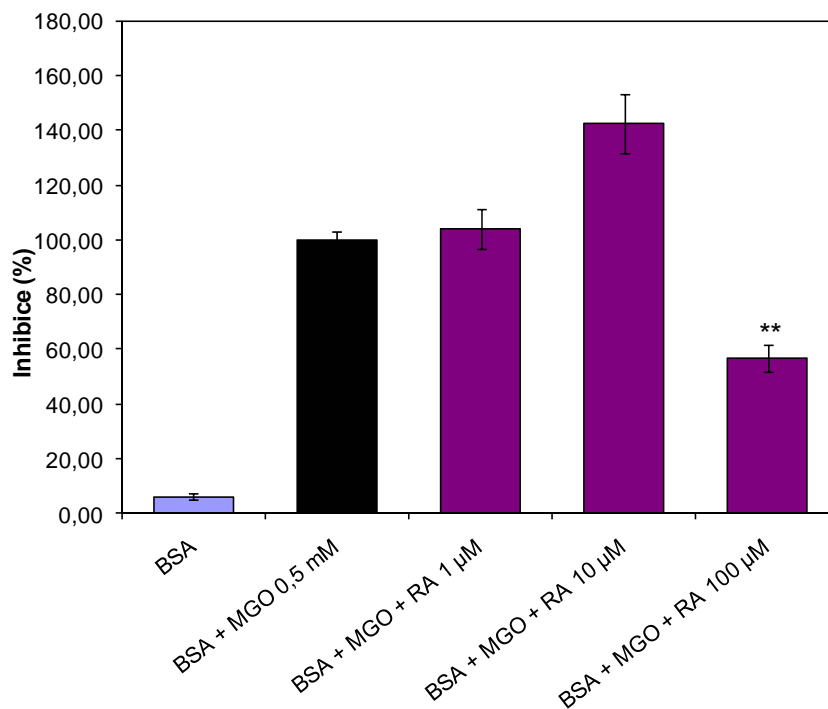
Výsledky jsou zobrazeny v obrázku 29.

Tabulka 6: Vliv kyseliny rozmarýnové (1 – 100  $\mu\text{M}$ ) na vznik AGE produktů a pentosidinu během glykace BSA methylglyoxalem (0,5 mM). Koncentrace bílkoviny ve směsi byla 1 mg/ml. Vzorky byly inkubovány při 37°C po dobu 7 dní. Fluorescence byla měřena při vlnových délkách excitace/emise 340/420 nm (AGE produkty) a 335/385 nm (pentosidin).

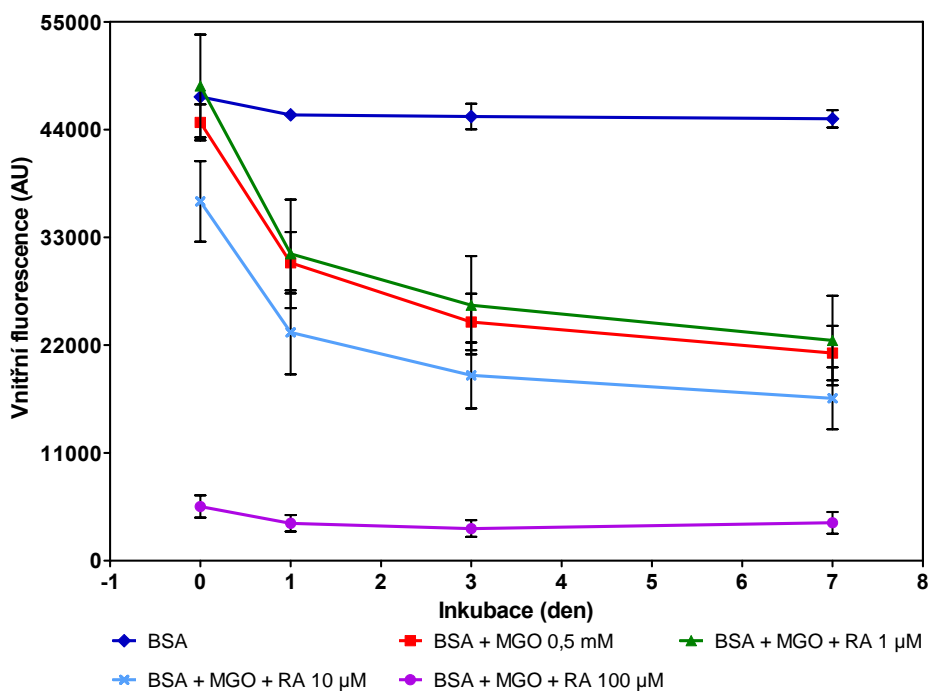
Vzorek (Inkubace: 37°C, 7 dní)	Intenzita fluorescence (AU) $\pm$ S.D.	
	AGEs	Pentosidin
<b>BSA</b>	311,50 $\pm$ 218,70	70,15 $\pm$ 16,45
<b>Kontrola BSA + MGO</b>	14576,00 $\pm$ 1172,47	1164,38 $\pm$ 31,40
<b>BSA + MGO + 1 <math>\mu\text{M}</math> rozmarýnová</b>	16115,00 $\pm$ 1844,97	1211,30 $\pm$ 101,12
<b>BSA + MGO + 10 <math>\mu\text{M}</math> rozmarýnová</b>	23463,30 $\pm$ 2117,87	1659,08 $\pm$ 153,37
<b>BSA + MGO + 100 <math>\mu\text{M}</math> rozmarýnová</b>	11329,78 $\pm$ 489,68	659,28 $\pm$ 44,10



Obr. 27: Inhibiční účinek kyseliny rozmarýnové (1 – 100  $\mu\text{M}$ ) na tvorbu AGE produktů při glykaci BSA methylglyoxalem (0,5 mM). Koncentrace bílkoviny ve směsi byla 1 mg/ml. Fluorescence měřena při vlnových délkách excitace/emise 340/420 nm.



Obr. 28: Inhibiční účinek kyseliny rozmarýnové (1 – 100 µM) na vznik pentosidinu při glykaci BSA methylglyoxalem (0,5 mM). Koncentrace bílkoviny ve směsi byla 1 mg/ml. Fluorescence měřena při vlnových délkách excitace/emise 335/385 nm.



Obr. 29: Vliv kyseliny rozmarýnové (1 – 100 µM) a MGO (0,5 mM) na vnitřní fluorescenci BSA (1 mg/ml). Vzorky byly inkubovány při teplotě 37°C po dobu 7 dní. Fluorescence měřena při vlnových délkách excitace/emise 295/340 nm.

### ***5.1.7 Kyselina kávová***

Kyselina kávová ve všech studovaných koncentracích vykazovala proglykační efekt. Způsobila nárůst vzniku nescifických AGEs o 15 až 88% v závislosti na koncentraci kyseliny kávové. V případě tvorby pentosidinu jsem ovšem pozorovala mírný, ale významný antiglykační účinek této látky v koncentraci 100  $\mu\text{M}$ . Došlo ke snížení vzniku pentosidinu o 11% proti kontrole.

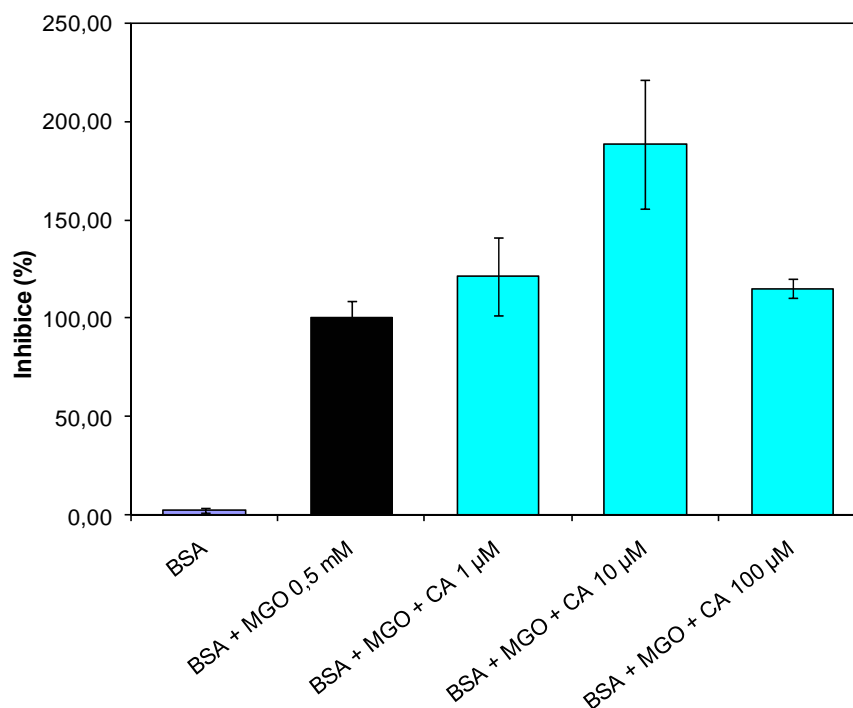
Výsledky jsou prezentovány v tabulce 7 a obrázcích 30 a 31.

Kyselina kávová ve všech třech zkoumaných koncentracích způsobila snížení vnitřní fluorescence BSA. Pouze v 1  $\mu\text{M}$  vykazovala slabý pozitivní vliv na vývoj vnitřní fluorescence, který byl patrný již od začátku inkubace.

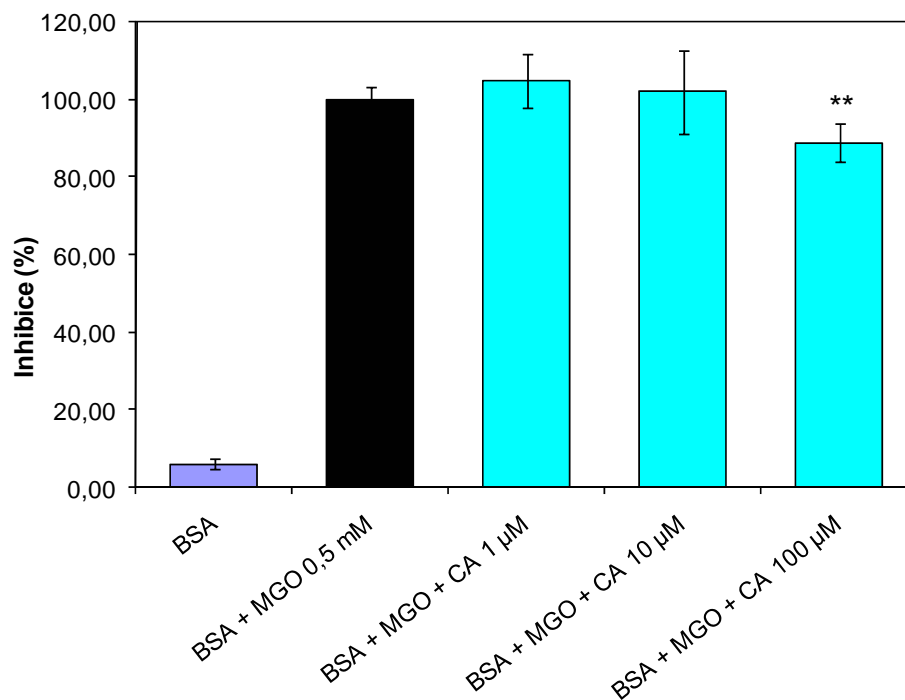
Výsledky jsou zdokumentovány v obrázku 32.

Tabulka 7: Vliv kyseliny kávové (1 – 100  $\mu\text{M}$ ) na vznik AGE produktů a pentosidinu během glykace BSA methylglyoxalem (0,5 mM). Koncentrace bílkoviny ve směsi byla 1 mg/ml. Vzorke byly inkubovány při 37°C po dobu 7 dní. Fluorescence byla měřena při vlnových délkách excitace/emise 340/420 nm (AGE produkty) a 335/385 nm (pentosidin).

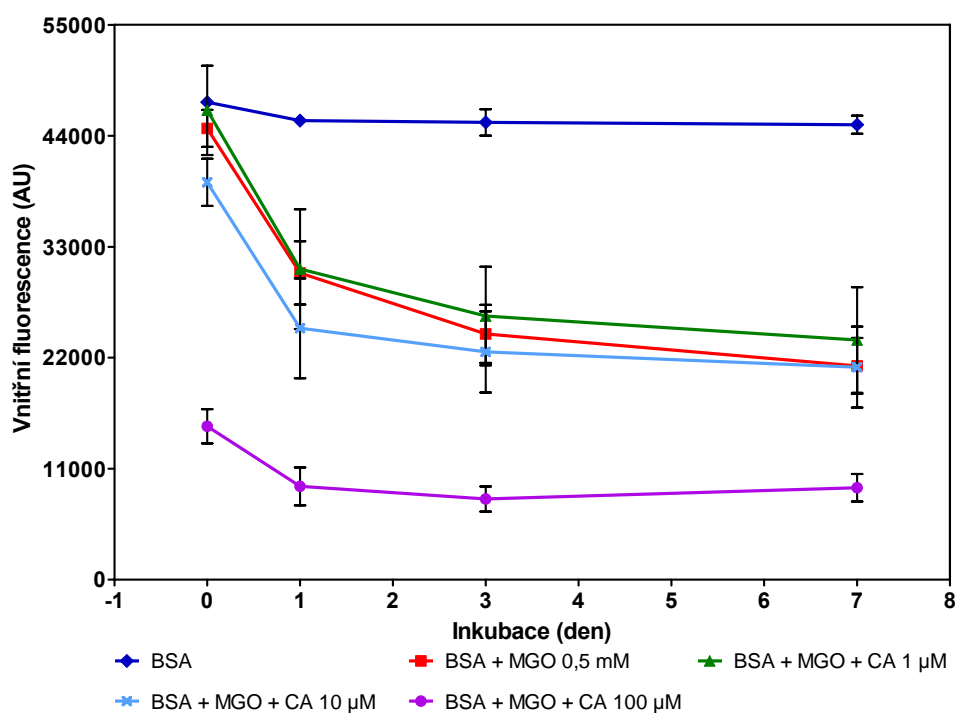
Vzorek (Inkubace: 37°C, 7 dní)	Intenzita fluorescence (AU) $\pm$ S.D.	
	340/420	335/385
BSA	311,50 $\pm$ 218,70	70,15 $\pm$ 16,45
Kontrola BSA + MGO	14576,00 $\pm$ 1172,47	1164,38 $\pm$ 31,40
BSA + MGO + 1 $\mu\text{M}$ kávová	17504,75 $\pm$ 1638,70	1224,00 $\pm$ 128,98
BSA + MGO + 10 $\mu\text{M}$ kávová	27111,75 $\pm$ 2705,81	1167,69 $\pm$ 90,16
BSA + MGO + 100 $\mu\text{M}$ kávová	16750,60 $\pm$ 1313,40	1054,80 $\pm$ 9,76



Obr. 30: Inhibiční účinek kyseliny kávové (1 – 100  $\mu\text{M}$ ) na tvorbu AGE produktů při glykaci BSA methylglyoxalem (0,5 mM). Koncentrace bílkoviny ve směsi byla 1 mg/ml. Fluorescence měřena při vlnových délkách excitace/emise 340/420 nm.



Obr. 31: Inhibiční účinek kyseliny kávové (1 – 100  $\mu\text{M}$ ) na vznik pentosidinu při glykaci BSA methylglyoxalem (0,5 mM). Koncentrace bílkoviny ve směsi byla 1 mg/ml. Fluorescence měřena při vlnových délkách excitace/emise 335/385 nm.



Obr. 32: Vliv kyseliny kávové (1 – 100  $\mu\text{M}$ ) a MGO (0,5 mM) na vnitřní fluorescenci BSA (1 mg/ml). Vzorky byly inkubovány při teplotě 37°C po dobu 7 dní. Fluorescence měřena při vlnových délkách excitace/emise 295/340 nm.

### ***5.1.8 Kyselina ferulová***

Zejména 10  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  koncentrace kyseliny ferulové prokázaly statisticky významný antiglykační efekt na tvorbu nesespecifických AGEs a pentosidinu. Tato kyselina snížila vznik AGEs o 33% (100  $\mu\text{M}$ ) a pentosidinu o 8% (10  $\mu\text{M}$ ) a 25% (100  $\mu\text{M}$ ) proti kontrole.

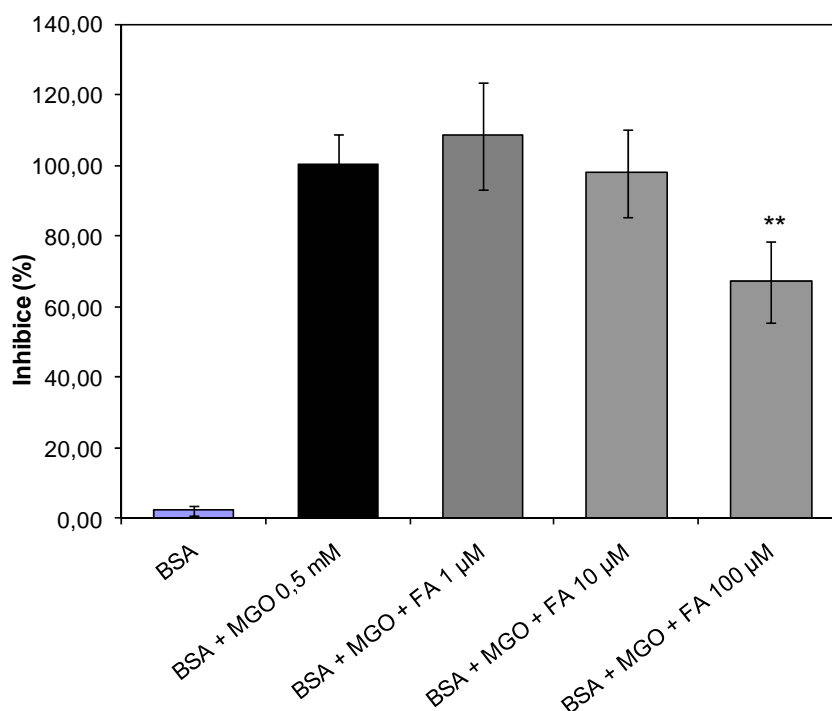
Výsledky jsou dokumentovány v tabulce 8 a obrázcích 33 a 34.

Kyselina ferulová ve všech třech zkoumaných koncentracích způsobila snížení vnitřní fluorescence BSA. Pouze v 1  $\mu\text{M}$  vykazovala slabý pozitivní vliv na vývoj vnitřní fluorescence, který byl patrný již od začátku inkubace.

Výsledky jsou uvedeny v obrázku 35.

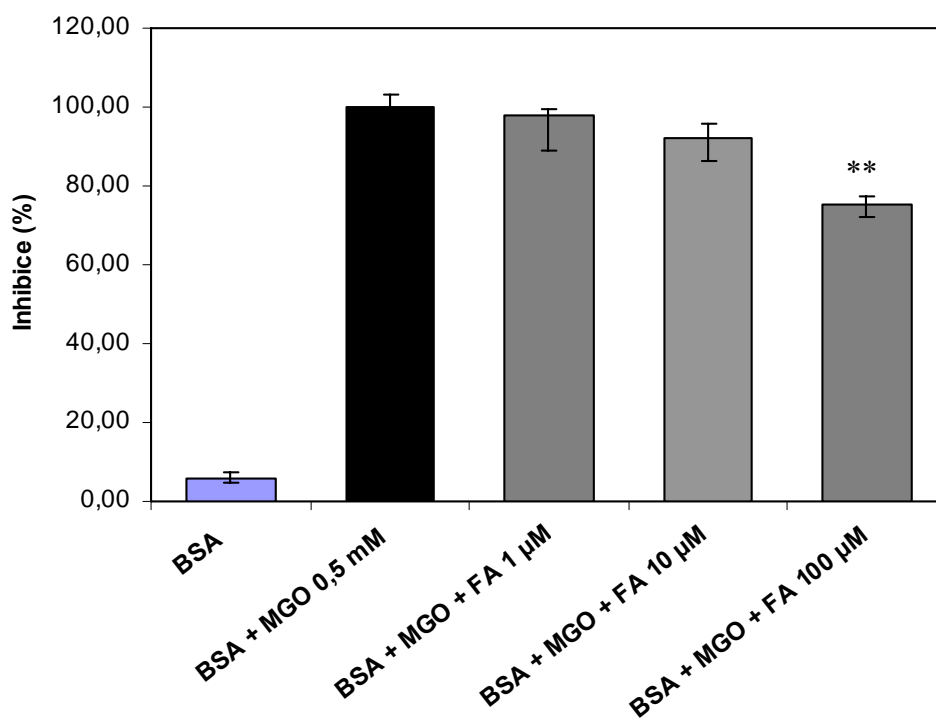
Tabulka 8: Vliv kyseliny ferulové (1 – 100  $\mu\text{M}$ ) na vznik AGE produktů a pentosidinu během glykace BSA methylglyoxalem (0,5 mM). Koncentrace bílkoviny ve směsi byla 1 mg/ml. Vzorky byly inkubovány při 37°C po dobu 7 dní. Fluorescence byla měřena při vlnových délkách excitace/emise 340/420 nm (AGE produkty) a 335/385 nm (pentosidin).

Vzorek (Inkubace: 37°C, 7 dní)	Intenzita fluorescence (AU) $\pm$ S.D.	
	<i>AGEs</i>	<i>Pentosidin</i>
<i>BSA</i>	311,50 $\pm$ 218,70	70,15 $\pm$ 16,45
<i>Kontrola BSA + MGO</i>	14576,00 $\pm$ 1172,47	1164,38 $\pm$ 31,40
<i>BSA + MGO + 1 <math>\mu\text{M}</math> ferulová</i>	15687,25 $\pm$ 1170,94	1157,45 $\pm$ 8,63
<i>BSA + MGO + 10 <math>\mu\text{M}</math> ferulová</i>	14143,25 $\pm$ 676,19	1093,10 $\pm$ 15,77
<i>BSA + MGO + 100 <math>\mu\text{M}</math> ferulová</i>	9648,75 $\pm$ 970,87	891,60 $\pm$ 4,88

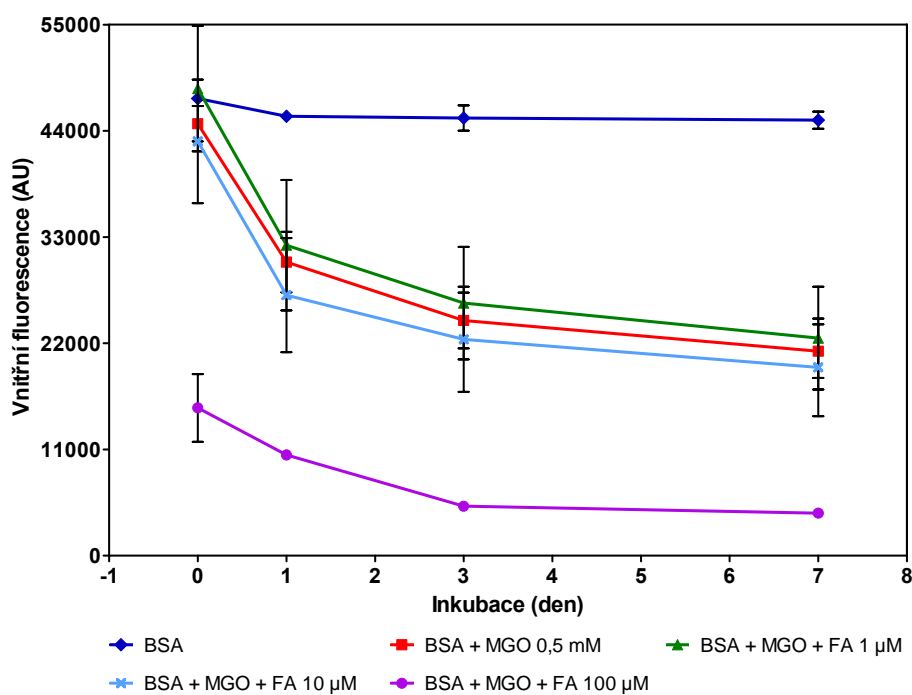


Obr. 33: Inhibiční účinek kyseliny ferulové (1 – 100  $\mu\text{M}$ ) na tvorbu AGE produktů při glykaci BSA methylglyoxalem (0,5 mM). Koncentrace bílkoviny ve směsi byla 1 mg/ml. Fluorescence měřena při vlnových délkách excitace/emise 340/420 nm.





Obr. 34: Inhibiční účinek kyseliny ferulové (1 – 100  $\mu\text{M}$ ) na vznik pentosidinu při glykaci BSA methylglyoxalem (0,5 mM). Koncentrace bílkoviny ve směsi byla 1 mg/ml. Fluorescence měřena při vlnových délkách excitace/emise 335/385 nm.



Obr. 35: Vliv kyseliny ferulové (1 – 100  $\mu\text{M}$ ) a MGO (0,5 mM) na vnitřní fluorescenci BSA (1 mg/ml). Vzorky byly inkubovány při teplotě 37°C po dobu 7 dní. Fluorescence měřena při vlnových délkách excitace/emise 295/340 nm.

## 5.2 UV-VIS spektrofotometrie

Nejprve jsem sledovala stabilitu modelové bílkoviny BSA v průběhu inkubace a vznik glykačních produktů v UV-VIS spektrech BSA modifikované glykačním činidlem. Dále jsem zkoumala možný antiglykační účinek jednotlivých hydroxyskořicových kyselin pomocí absorpčních spekter daných inkubačních směsí obsahujících BSA, MGO a HCA. Koncové produkty pokročilé glykace absorbují světlo především v oblasti nad 300 nm.

Změny související s glykací BSA a antiglykačním účinkem hydroxyskořicových kyselin jsem sledovala v intervalech 0, 1, 3 a 7 dní inkubace. Kvůli velkému množství naměřených dat prezentuji ve výsledkové části podrobnější výsledky jen u *kyseliny o-kumarové*, a to z důvodu zjednodušení a lepší orientace čtenáře. U dalších hydroxyskořicových kyselin uvádím pouze absorpční spektra ze 7. dne inkubace, kdy byl již dostatečně patrný vznik glykačních produktů, a proto se také lépe vyhodnocoval účinek HCAs na glykaci BSA methylglyoxalem. V jednotlivých grafech prezentuji jak spektrum čisté bílkoviny, BSA modifikovaného methylglyoxalem, tak také spektra inkubačních směsí obsahujících BSA, methylglyoxal a studovanou kyselinu ve všech použitých koncentracích (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ ). Stabilitu molekuly BSA během inkubace a vznik glykačních produktů vlivem MGO v čase dokumentují obr. 36 a 37.

Z uvedených grafů je patrné, že při inkubaci BSA s MGO a HCAs docházelo k jejich vzájemné interakci za vzniku glykačních produktů absorbujících především v UV oblasti spektra. Souhrnně lze říci, že v oblasti 200 až 300 nm lze pozorovat změny v proteinové části molekuly a od 300 nm se jedná o změny související s tvorbou produktů pozdní glykace.

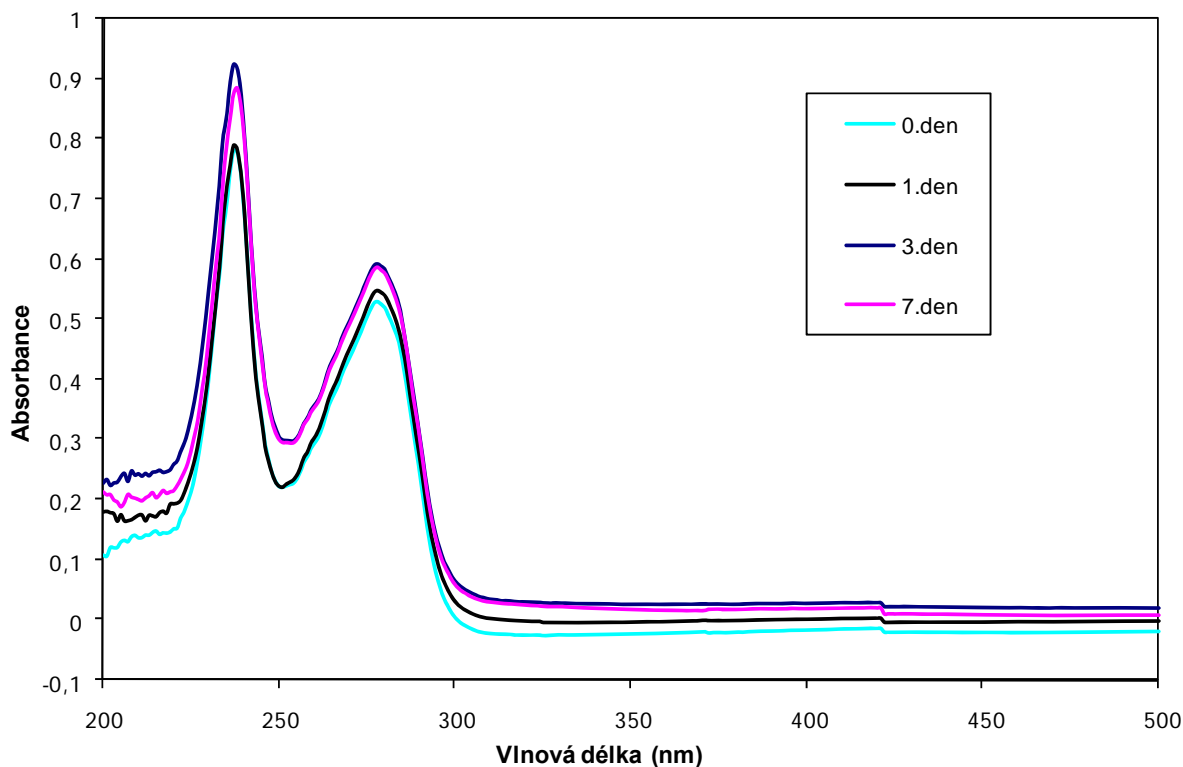
Při hodnocení získaných dat jsem se soustředila pouze na oblast spektra, ve které docházelo ke vzniku glykačních produktů (tj. nad 300 nm). Odečítala jsem hodnotu absorbance jednotlivých vzorků při 314 nm a vypočítala jsem vznik AGEs v procentech (tab. 9). Vliv hydroxyskořicových kyselin na prostorové uspořádání molekuly BSA hodnotila postgraduální studentka Lucie Trnková (Trnková a kol. 2008).

### ***5.2.1 Stabilita BSA a vznik glykačních produktů vlivem MGO***

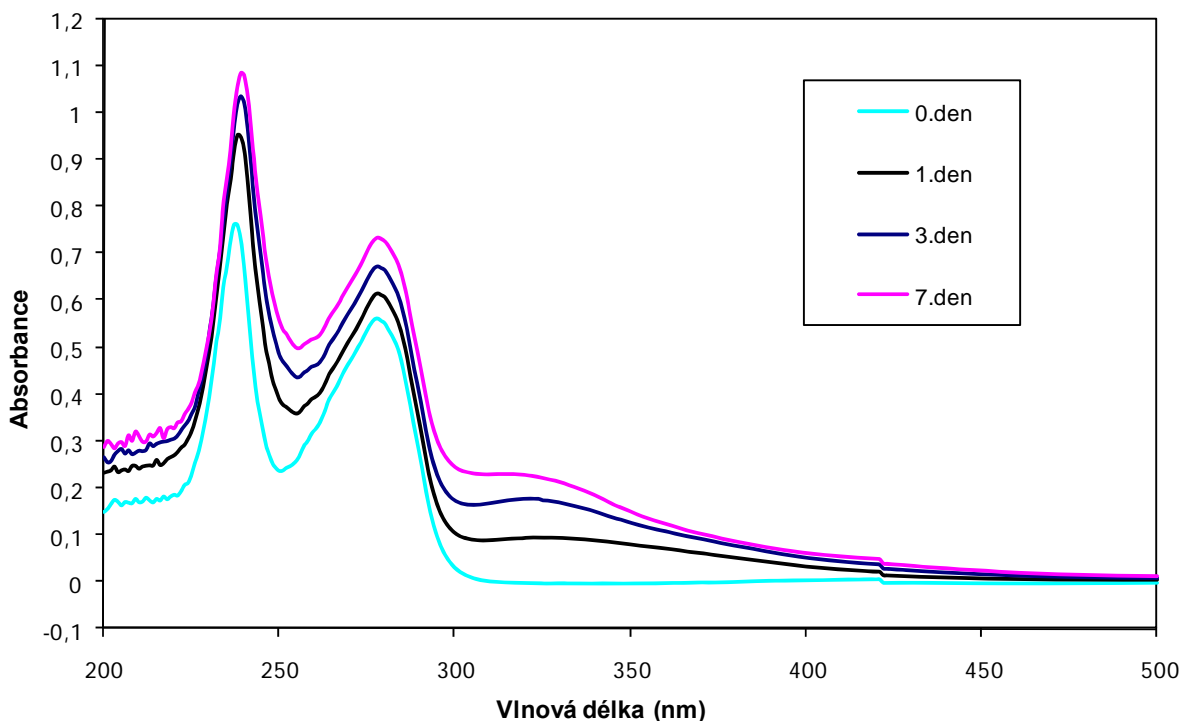
Molekula BSA byla po celou dobu inkubace stabilní a její absorpční spektrum nevykazovalo výrazné změny (Obr. 36). Absorpce BSA v UV oblasti je způsobena především aminokyselinami tryptofanem a tyrosinem a v menší míře i fenylalaninem a cysteinem. Uvedené aminokyseliny vykazují dvě absorpční maxima, a to při vlnových délkách 230-240 nm a 270-280 nm, přičemž první je charakteristické pro fenylalanin a cystein a druhé pro tryptofan a tyrosin. V oblasti kolem 205 nm dochází k absorpci peptidových vazeb. Molekula BSA neobsahuje žádný koenzym, a proto nejsou v jejím absorpčním spektru patrné píky v oblasti nad 300 nm.

V absorpčním spektru inkubační směsi obsahující BSA a MGO je patrná modifikace bílkoviny související s její glykací. Tato modifikace se projevila přírůstkem absorbance v rozmezí vlnových délek 300 - 400 nm. Absorpční pík s maximem při vlnové délce 314 nm tedy pravděpodobně odpovídá AGEs vzniklým při glykaci BSA methylglyoxalem (obr. 37). S délkou inkubace docházelo k nárůstu absorbance i v proteinové části absorpčního spektra. Absorpční maxima odpovídající aromatickým aminokyselinám se měnila v závislosti na délce působení glykačního činidla.

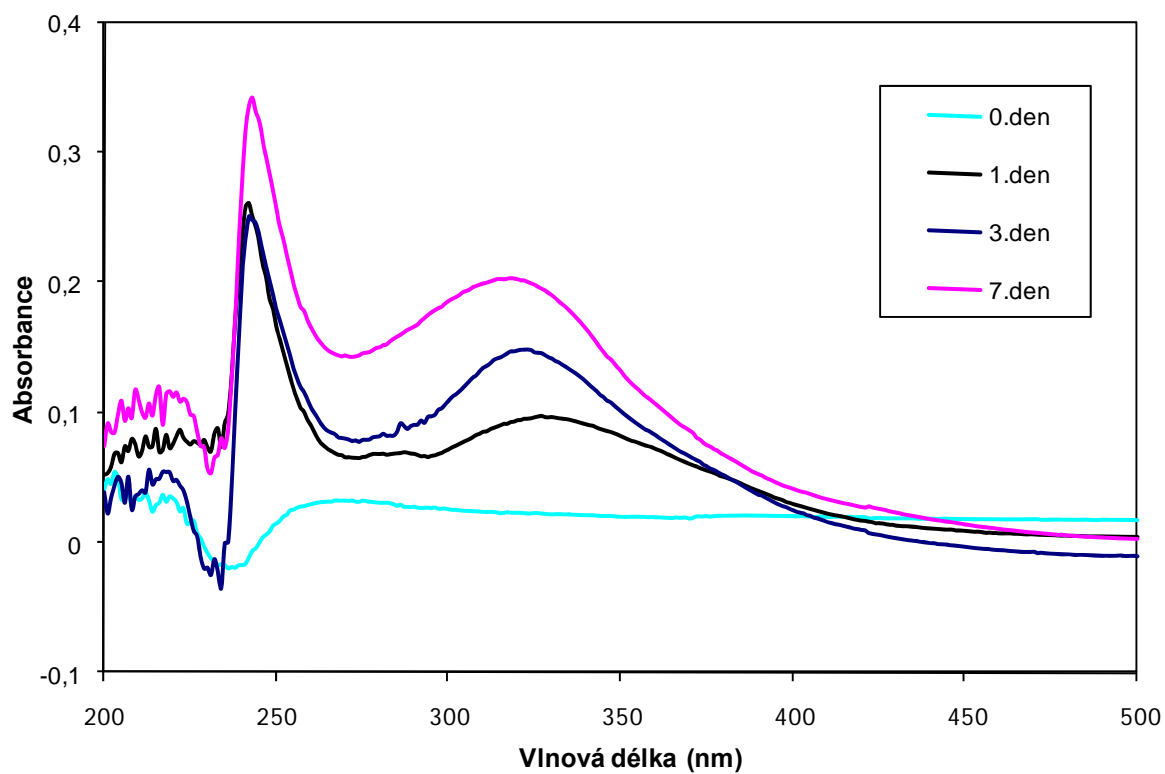
Na obr. 38 je rozdílové spektrum, které dokumentuje vznik glykačních produktů v čase. Toto rozdílové spektrum jsem získala odečtením spektra čisté bílkoviny od spektra BSA glykovaného methylglyoxalem. V absorpčním spektru je patrný postupný nárůst absorbance způsobený tvorbou produktů pozdní glykace v čase. Maximum tohoto píku leží v oblasti mezi 310 – 315 nm.



Obr. 36: Absorpční spektrum BSA (1 mg/ml) v průběhu sedmidenní inkubace při 37°C. Měřeno na přístroji Heliosβ v rozmezí vlnových délek 200 - 500 nm při 37°C.



Obr. 37: Absorpční spektrum BSA (1 mg/ml) modifikovaného methylglyoxalem (0,5 mM) v průběhu sedmidenní inkubace při 37°C. Měřeno na přístroji Heliosβ v rozmezí vlnových délek 200 - 500 nm při 37°C.



Obr. 38: Vznik glykačních produktů – rozdílové spektrum. BSA (1 mg/ml) bylo inkubováno s MGO (0,5 mM) v 0,1 M fosfátovém pufru (pH 7,4) při 37°C po dobu 7 dní. Spektrum bylo měřeno v rozmezí vlnových délek 200 – 500 nm při 37°C.

### 5.2.2 Kyselina *o*-kumarová

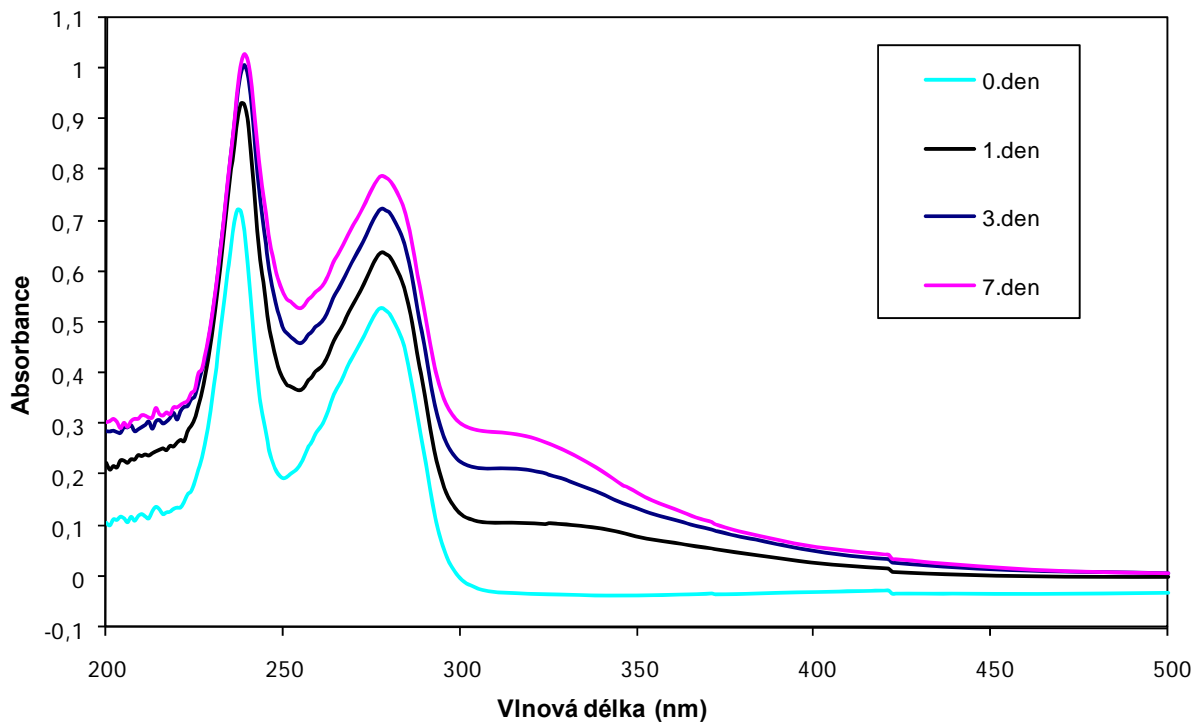
Kyselinu *o*-kumarovou uvádím jako příklad vývoje vzniku glykačních produktů v čase. Všechny kyseliny jsem připravila ve třech koncentracích (1, 10 a 100  $\mu\text{M}$ ) a inkubovala jsem je spolu s BSA a methylglyoxalem po dobu 7 dní. Absorpční spektra všech inkubačních směsí jsem zaznamenávala v čase 0, 1, 3 a 7 dní inkubace. Z důvodu velkého množství naměřených dat uvádím časovou závislost vzniku AGEs pouze u této kyseliny a to u všech tří studovaných koncentrací. U dalších kyselin uvádím pouze souhrnné grafy, kde jsou inkubační směsi obsahující čisté BSA, BSA s methylglyoxalem a BSA s methylglyoxalem a příslušnou kyselinou sedmý den inkubace.

Na obrázcích 39, 41 a 43. uvádím průběh absorpčních spekter všech tří koncentrací kyseliny *o*-kumarové v čase 0, 1, 3 a 7 dní inkubace. Rozdílová absorpční spektra znázorňující vznik AGEs jsou zdokumentována v obrázcích 40, 42 a 44.

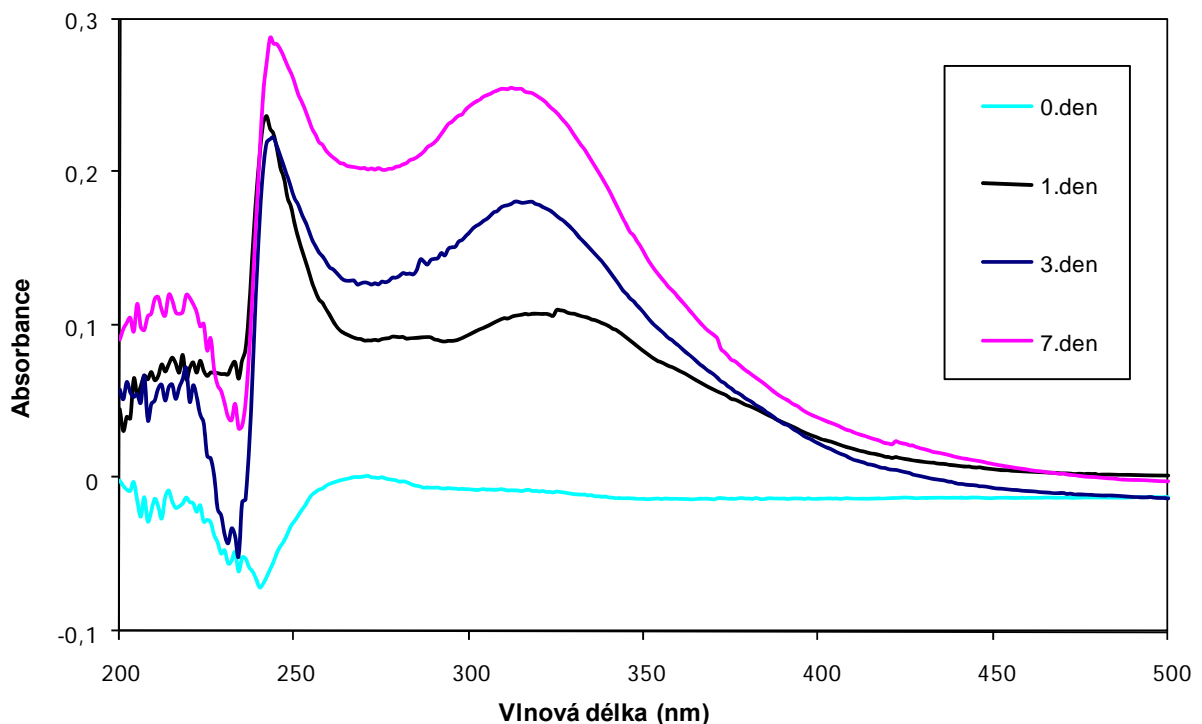
U žádné ze sledovaných koncentrací kyseliny *o*-kumarové jsem nezjistila pozitivní vliv na glykaci BSA methylglyoxalem. Jak je patrné z obr. 46, kyselina *o*-kumarová vznik pozdních produktů glykace dokonce zvyšovala a to v závislosti na své koncentraci. K největšímu nárůstu AGEs došlo v inkubační směsi se 100  $\mu\text{M}$  kyselinou *o*-kumarovou.

Souhrnný graf vlivu kyseliny *o*-kumarové (1 – 100  $\mu\text{M}$ ) na glykaci BSA methylglyoxalem sedmý den inkubace je zdokumentován na obrázcích 45 a 46.

*Kyselina o-kumarová 1  $\mu$ M*

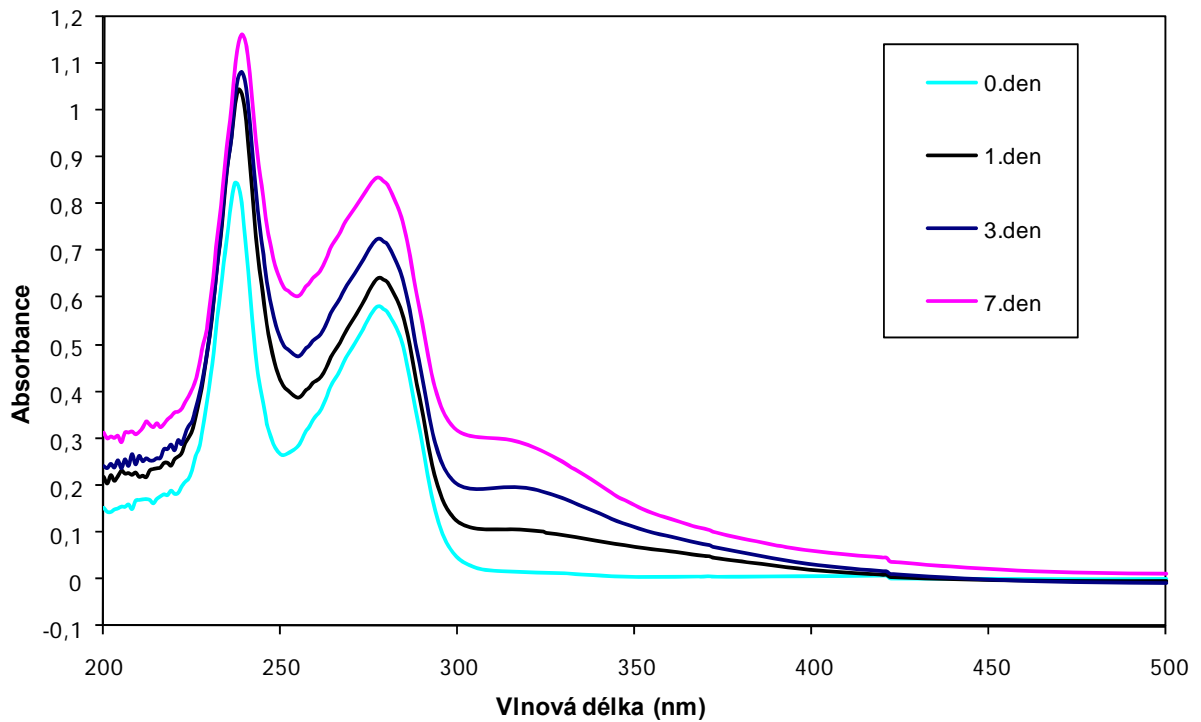


Obr. 39: Vliv kyseliny *o*-kumarové (1  $\mu$ M) na glykaci BSA (1 mg/ml) MGO (0,5 mM). Měřeno na spektrofotometru Helios $\beta$  (200 – 500 nm) při 37°C.

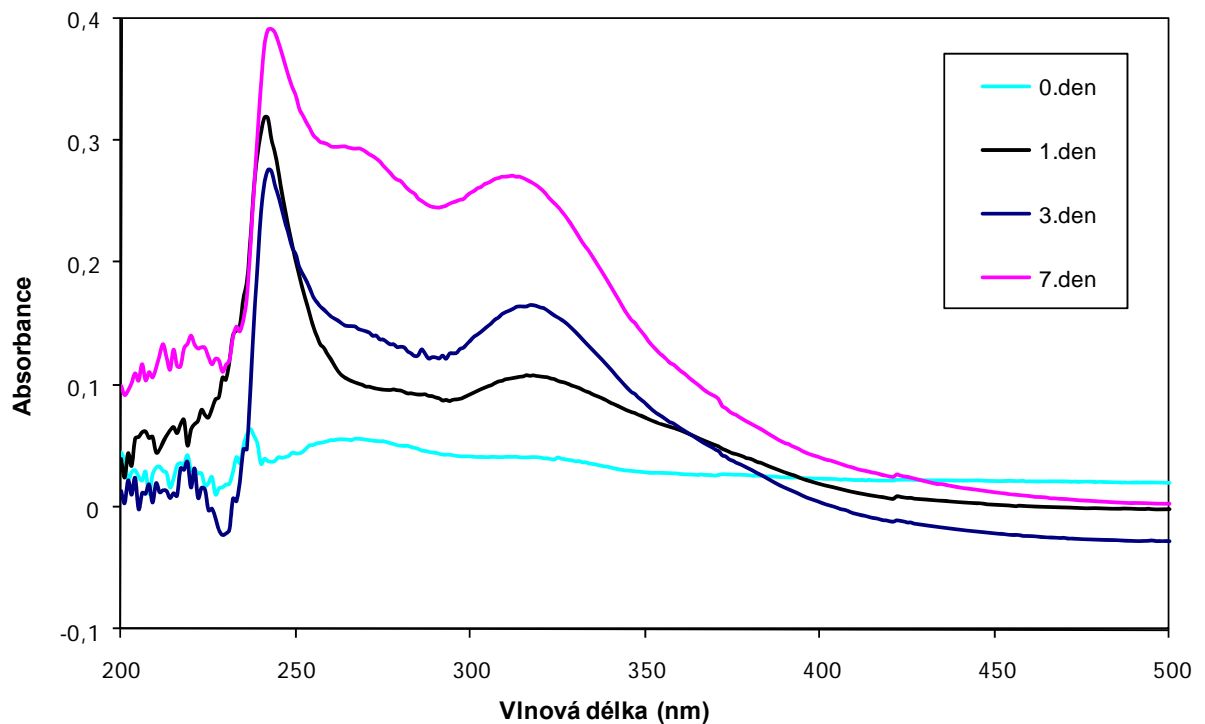


Obr. 40: Vliv kyseliny *o*-kumarové na vznik AGEs. BSA (1 mg/ml) bylo inkubováno s methylglyoxalem (0,5 mM) a kyselinou *o*-kumarovou (1  $\mu$ M) při 37°C po dobu 7 dní. Měřeno na spektrofotometru Helios $\beta$  v rozsahu vlnových délek 200 – 500 nm při 37°C.

*Kyselina o-kumarová 10 μM*



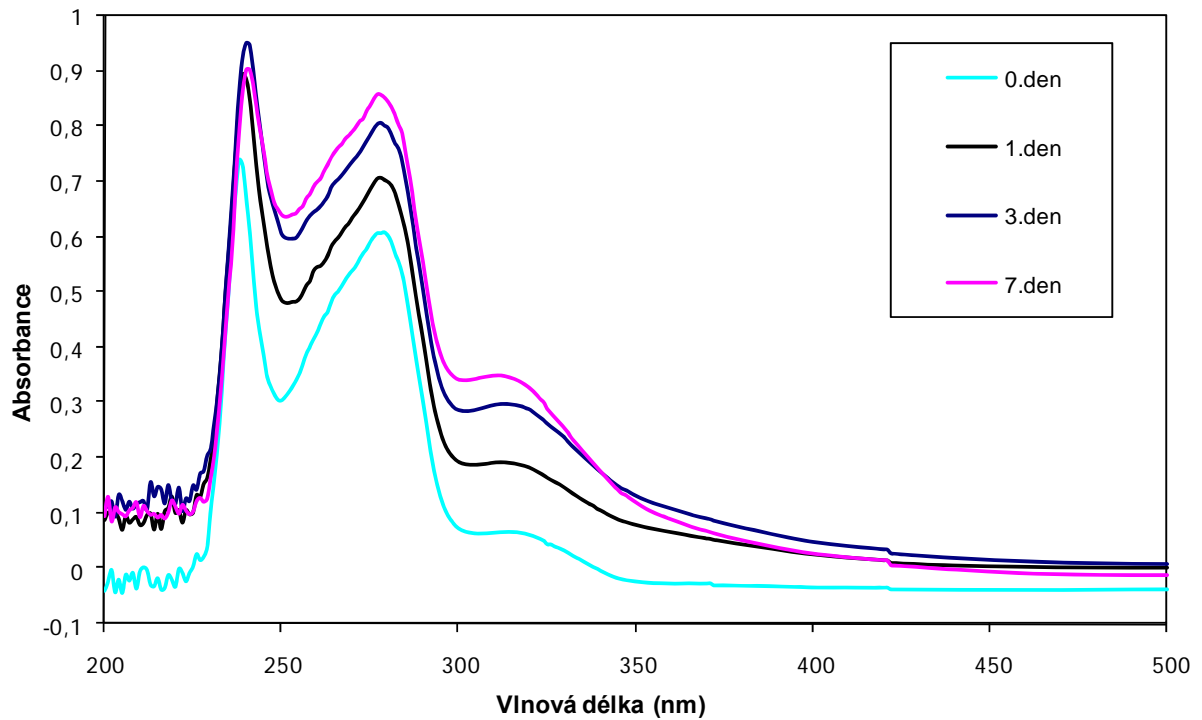
Obr. 41: Vliv kyseliny *o*-kumarové (10 μM) na glykaci BSA (1 mg/ml) MGO (0,5 mM). Měřeno na spektrofotometru Heliosβ (200 – 500 nm) při 37°C.



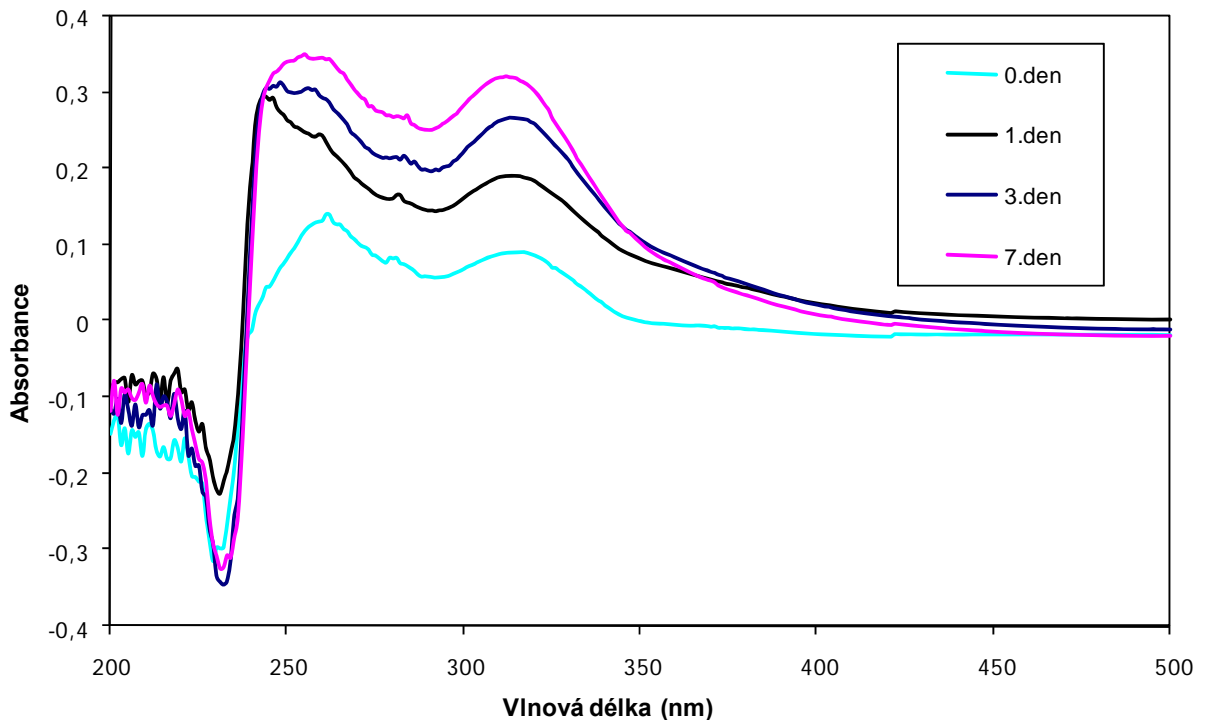
Obr. 42: Vliv kyseliny *o*-kumarové na vznik AGEs. BSA (1 mg/ml) bylo inkubováno s methylglyoxalem (0,5 mM) a kyselinou *o*-kumarovou (10 μM) při 37°C po dobu 7 dní. Měřeno na spektrofotometru Heliosβ v rozsahu vlnových délek 200 – 500 nm při 37°C.



*Kyselina o-kumarová 100  $\mu$ M*

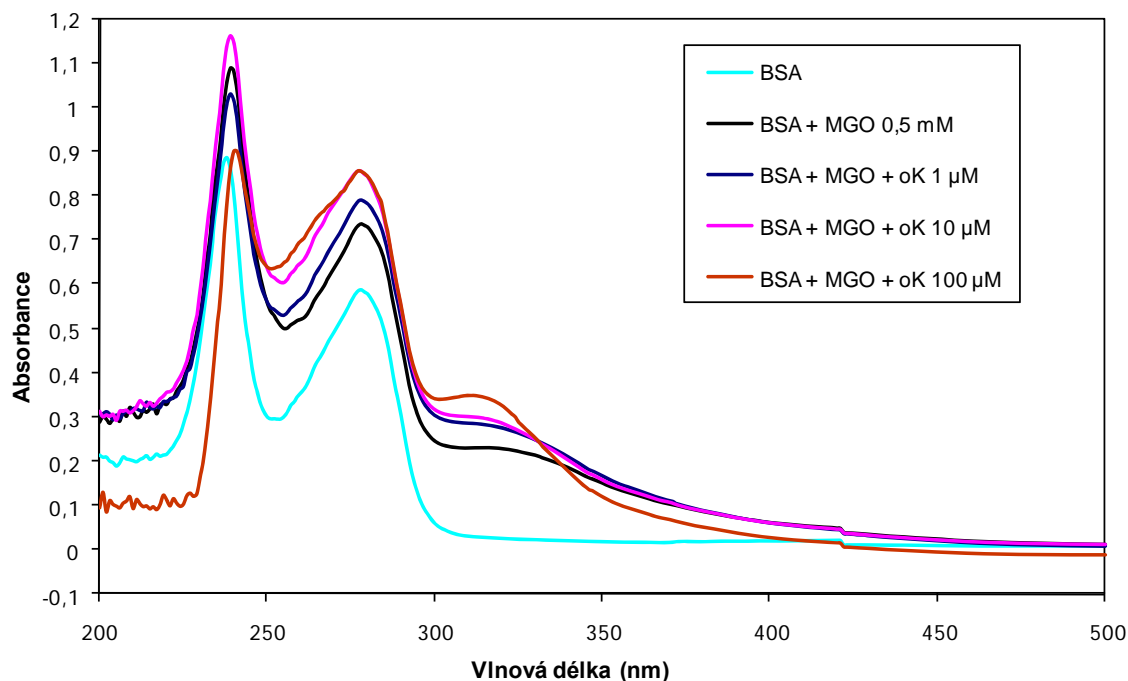


Obr. 43: Vliv kyseliny *o*-kumarové (100  $\mu$ M) na glykaci BSA (1 mg/ml) MGO (0,5 mM). Měřeno na spektrofotometru Helios $\beta$  (200-500 nm) při 37°C.

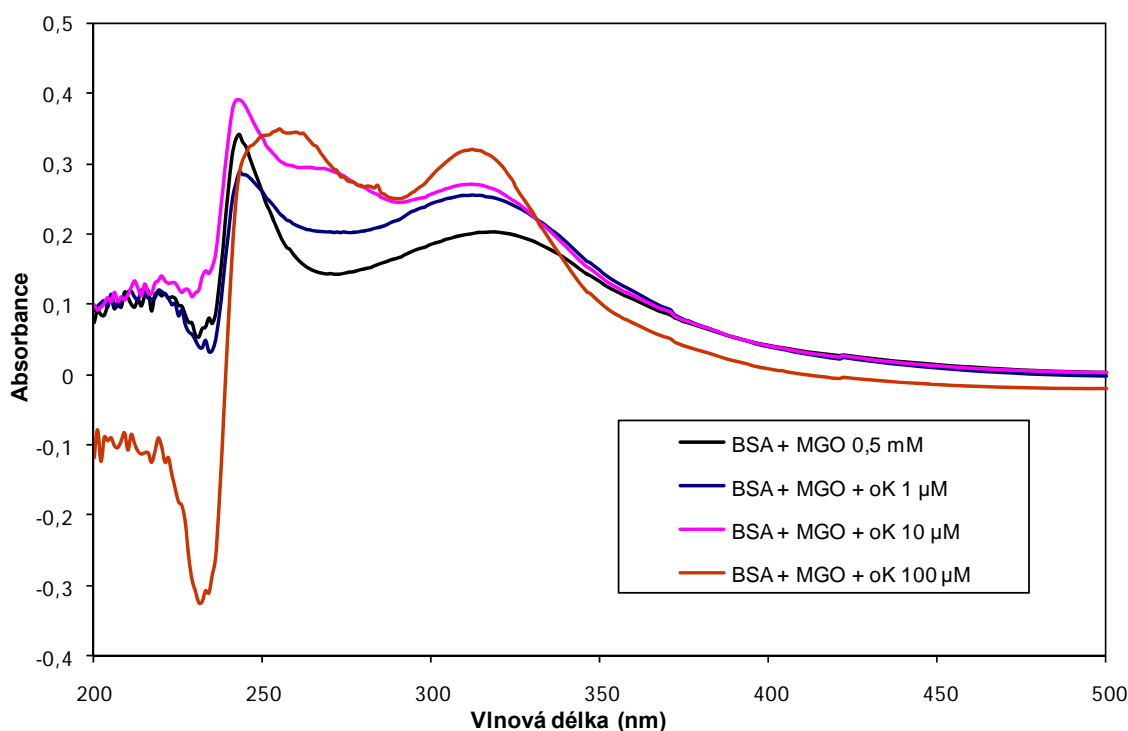


Obr. 44: Vliv kyseliny *o*-kumarové na vznik AGEs. BSA (1 mg/ml) bylo inkubováno s methylglyoxalem (0,5 mM) a kyselinou *o*-kumarovou (100  $\mu$ M) při 37°C po dobu 7 dní. Měřeno na spektrofotometru Helios $\beta$  v rozsahu vlnových délek 200 – 500 nm při 37°C.

### Kyselina *o*-kumarová - souhrnné grafy



Obr. 45: Souhrnný graf vlivu kyseliny *o*-kumarové (1 - 100 μM) na glykaci BSA (1 mg/ml) methylglyoxalem (0,5 mM) po sedmi dnech inkubace při 37°C. Absorbance byla měřena na přístroji Heliosβ v rozmezí vlnových délek 200 - 500 nm při 37°C.

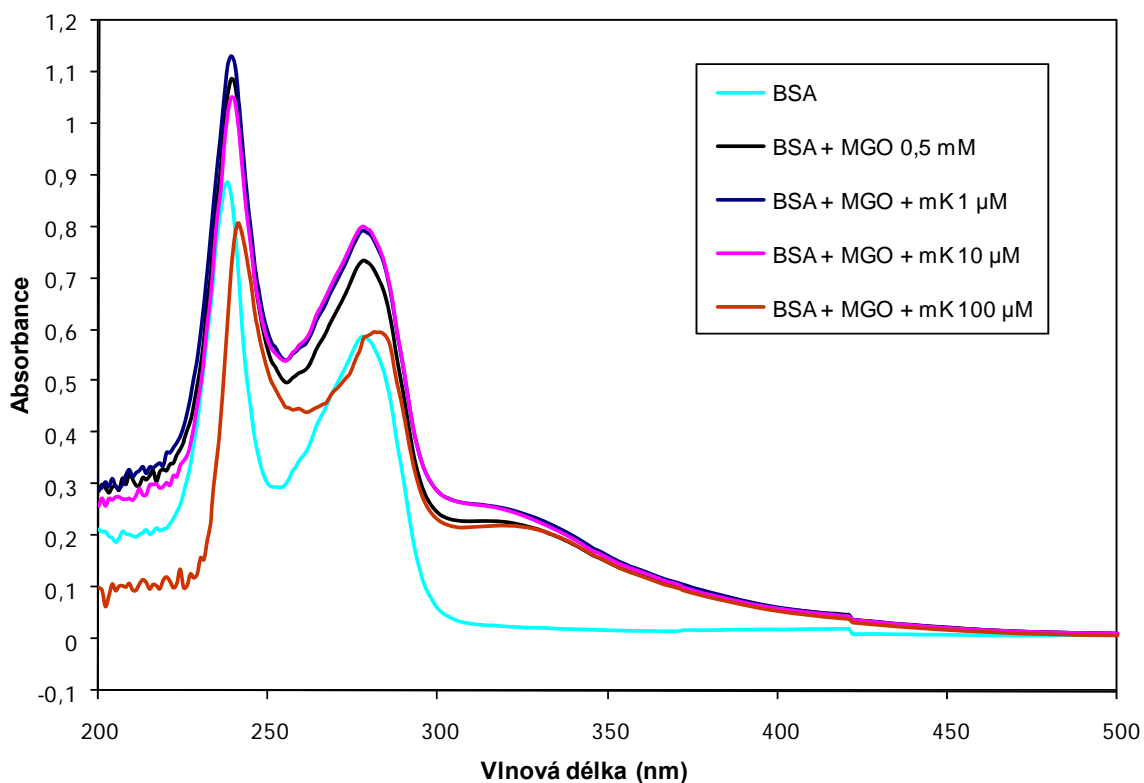


Obr. 46: Souhrnný graf vlivu kyseliny *o*-kumarové (1 - 100 μM) na vznik AGEs během inkubace BSA (1 mg/ml) s MGO (0,5 mM) po dobu 7 dní při 37°C. Absorbance byla měřena na přístroji Heliosβ v rozmezí vlnových délek 200 - 500 nm při 37°C.

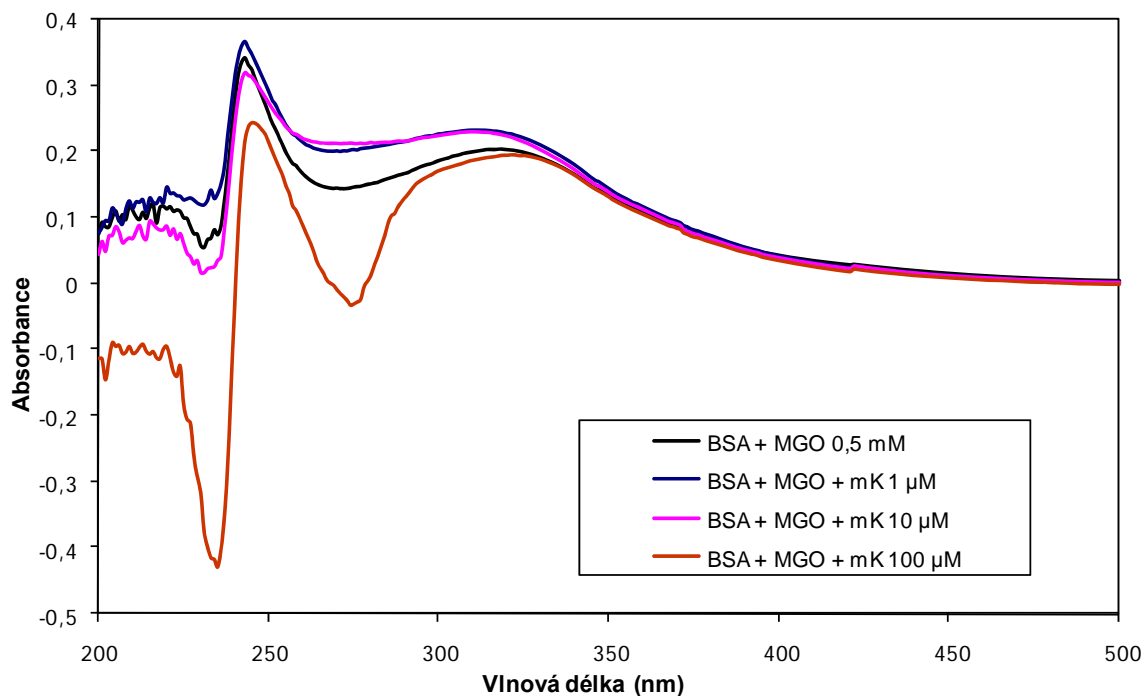
### ***5.2.3 Kyselina m-kumarová***

Na obr. 47 je patrné zvýšení absorbance jak v oblasti aromatických aminokyselin, tak v oblasti glykačních produktů.

Kyselina *m*-kumarová 1 a 10  $\mu\text{M}$  nevykazovala žádný antiglykační účinek. Naopak u ní došlo ke zvýšení tvorby glykačních produktů v sedmém dni inkubace. U 100  $\mu\text{M}$  koncentrace jsem pozorovala sedmý den inkubace určité pozitivní působení na průběh glykace BSA methylglyoxalem (obr. 48).



Obr. 47: Vliv kyseliny *m*-kumarové (1 - 100  $\mu$ M) na glykaci BSA (1 mg/ml) methylglyoxalem (0,5 mM) po sedmidenní inkubaci při 37°C. Absorbance byla měřena na přístroji Helios $\beta$  v rozmezí vlnových délek 200 - 500 nm při 37°C.

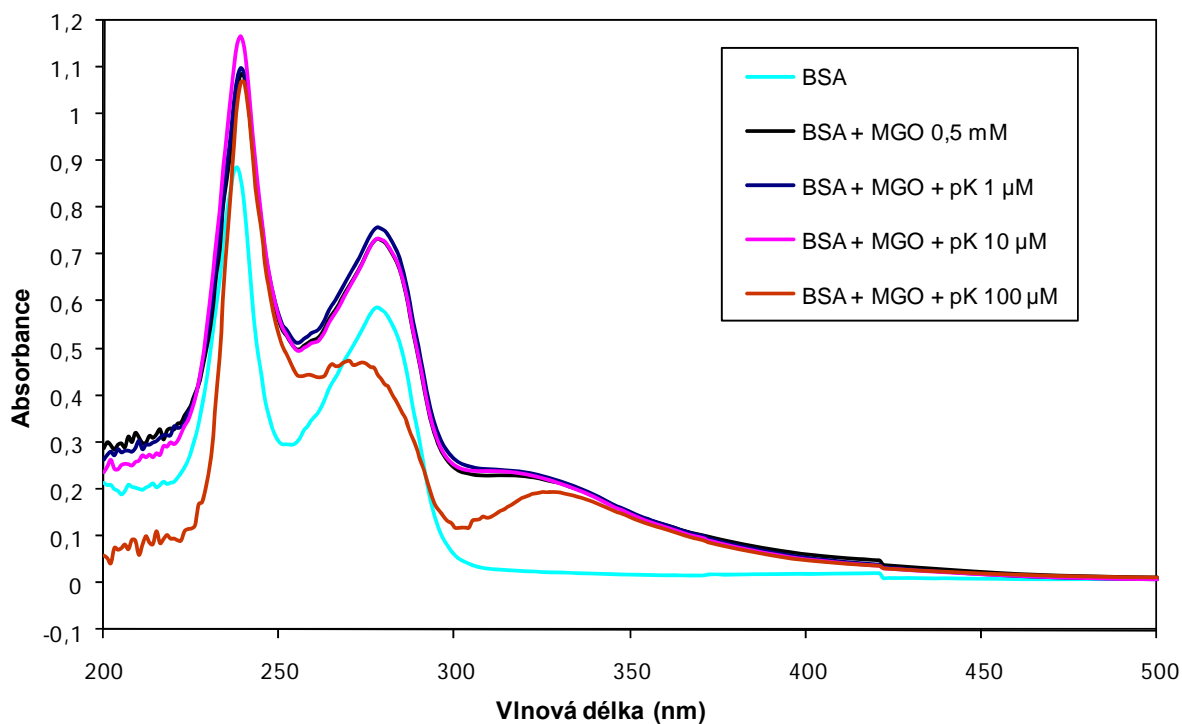


Obr. 48: Vliv kyseliny *m*-kumarové (1 - 100  $\mu$ M) na vznik AGEs. BSA (1 mg/ml) bylo inkubováno s methylglyoxalem (0,5 mM) po dobu 7 dní při 37°C. Absorbance byla měřena na přístroji Helios $\beta$  v rozmezí vlnových délek 200 - 500 nm při 37°C.

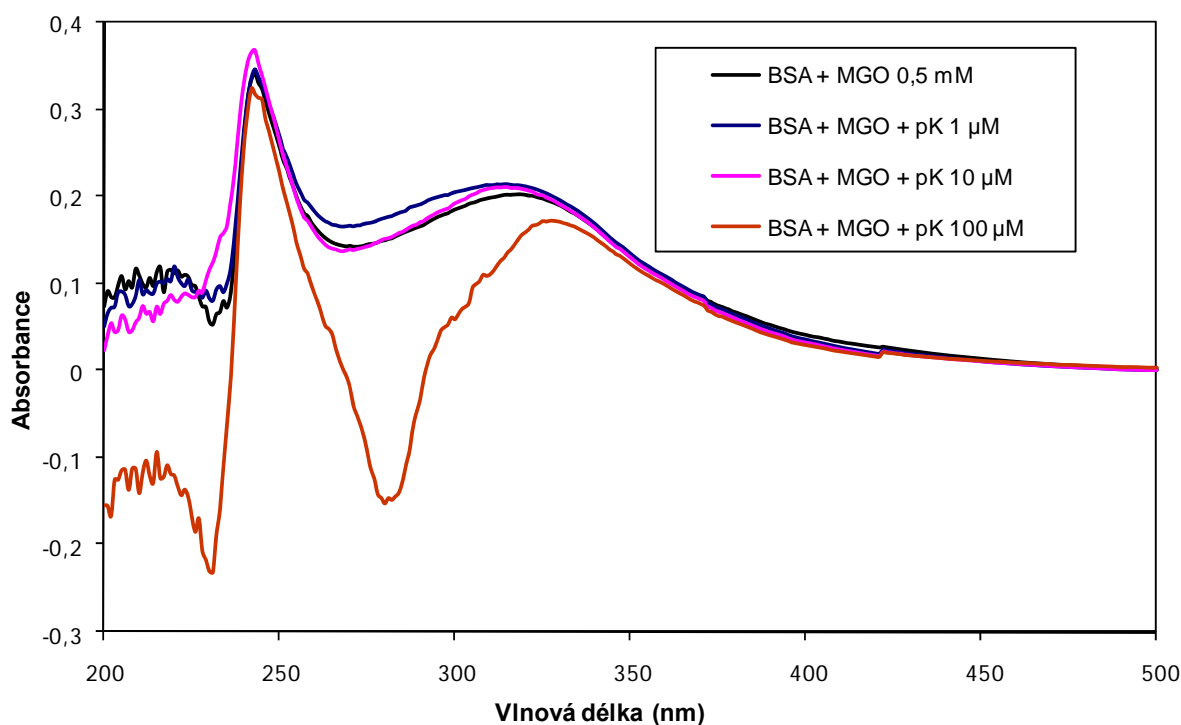
### ***5.2.4 Kyselina p-kumarová***

Kyselina *p*-kumarová 100  $\mu\text{M}$  výrazně snížila hodnotu absorbance v oblasti aromatických aminokyselin, a to až pod úroveň čistého BSA, jak je patrné z obrázku 49. K tomuto snížení došlo patrně díky změnám v prostorovém uspořádání molekuly BSA po interakci s danou kyselinou.

Tato kyselina v koncentraci 1 a 10  $\mu\text{M}$  neměla antiglykační ani proglykační účinek. Hodnoty absorbance v oblasti kolem 314 nm se nelišily od hodnot kontrolního vzorku (BSA + MGO). Naproti tomu v koncentraci 100  $\mu\text{M}$  výrazně inhibovala vznik AGE produktů. Toto snížení absorbance bylo ovšem patrné pouze v okolí absorpčního maxima AGEs ( $\lambda = 314 \text{ nm}$ ) a následně absorbance vzrostla opět na hodnotu srovnatelnou s kontrolou (obr. 50).



Obr. 49: Vliv kyseliny *p*-kumarové (1 - 100  $\mu$ M) na glykaci BSA (1 mg/ml) methylglyoxalem (0,5 mM) po sedmidenní inkubaci při 37°C. Absorbance byla měřena na přístroji Helios $\beta$  v rozmezí vlnových délek 200 - 500 nm při 37°C.

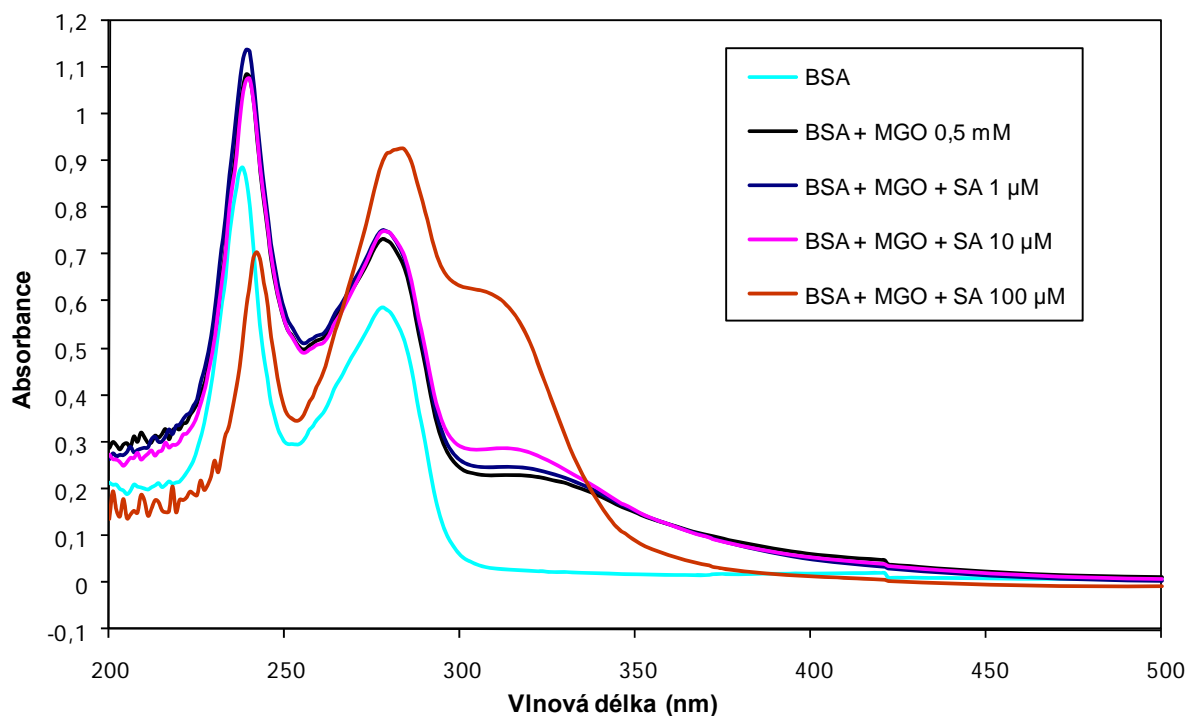


Obr. 50: Vliv kyseliny *p*-kumarové (1 - 100  $\mu$ M) na vznik AGEs. BSA (1 mg/ml) bylo inkubováno s methylglyoxalem (0,5 mM) po dobu 7 dní při 37°C. Absorbance byla měřena na přístroji Helios $\beta$  v rozmezí vlnových délek 200 - 500 nm při 37°C.

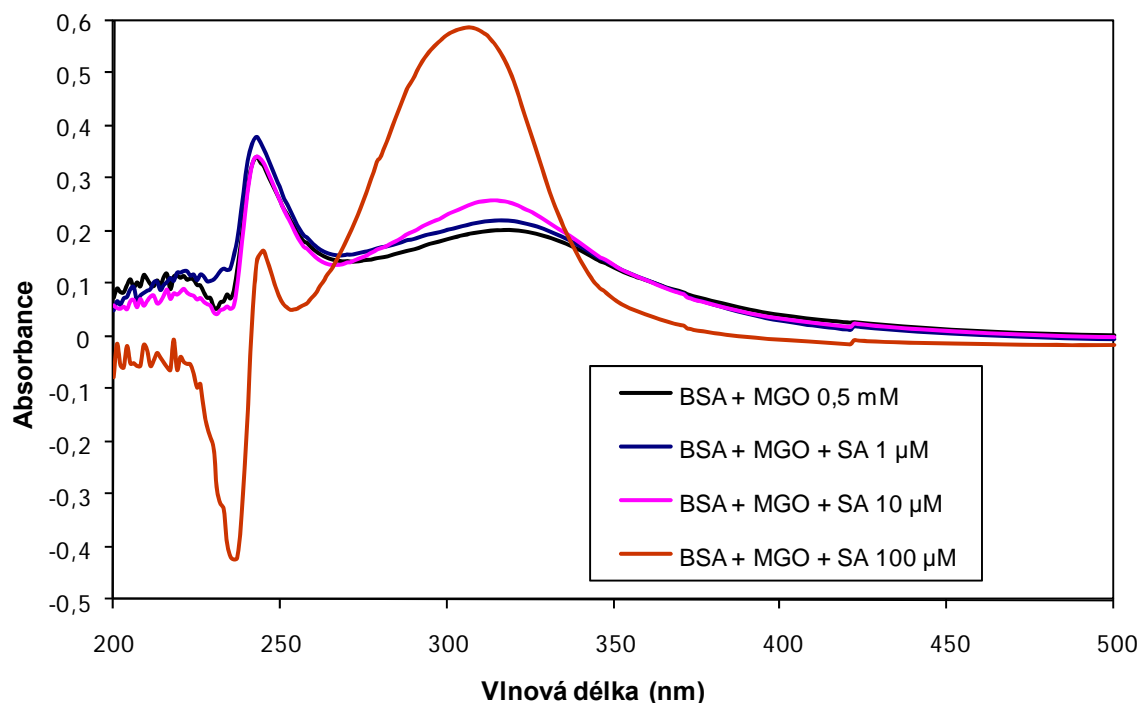
### ***5.2.5 Kyselina sinapová***

Významnější ovlivnění absorpce v proteinové části spektra způsobila pouze 100  $\mu\text{M}$  kyselina sinapová, jejíž efekt ovšem nebyl stejný u obou absorpčních maxim. Zatímco u prvního maxima absorpční výrazně snížila, u druhého maxima charakteristického pro tryptofan ji výrazně zvýšila. Navíc došlo k posunu maxim k vyšším vlnovým délkám (obr. 51).

Všechny koncentrace kyseliny sinapové prokázaly proglykační efekt, který se nejvíce projevil u 100  $\mu\text{M}$  koncentrace, kde došlo k největšímu zvýšení koncentrace AGEs ze všech studovaných kyselin (obr. 52).



Obr. 51: Vliv kyseliny sinapové (1 - 100  $\mu\text{M}$ ) na glykaci BSA (1 mg/ml) methylglyoxalem (0,5 mM) po sedmidenní inkubaci při 37°C. Absorbance byla měřena na přístroji Helios $\beta$  v rozmezí vlnových délek 200 - 500 nm při 37°C.



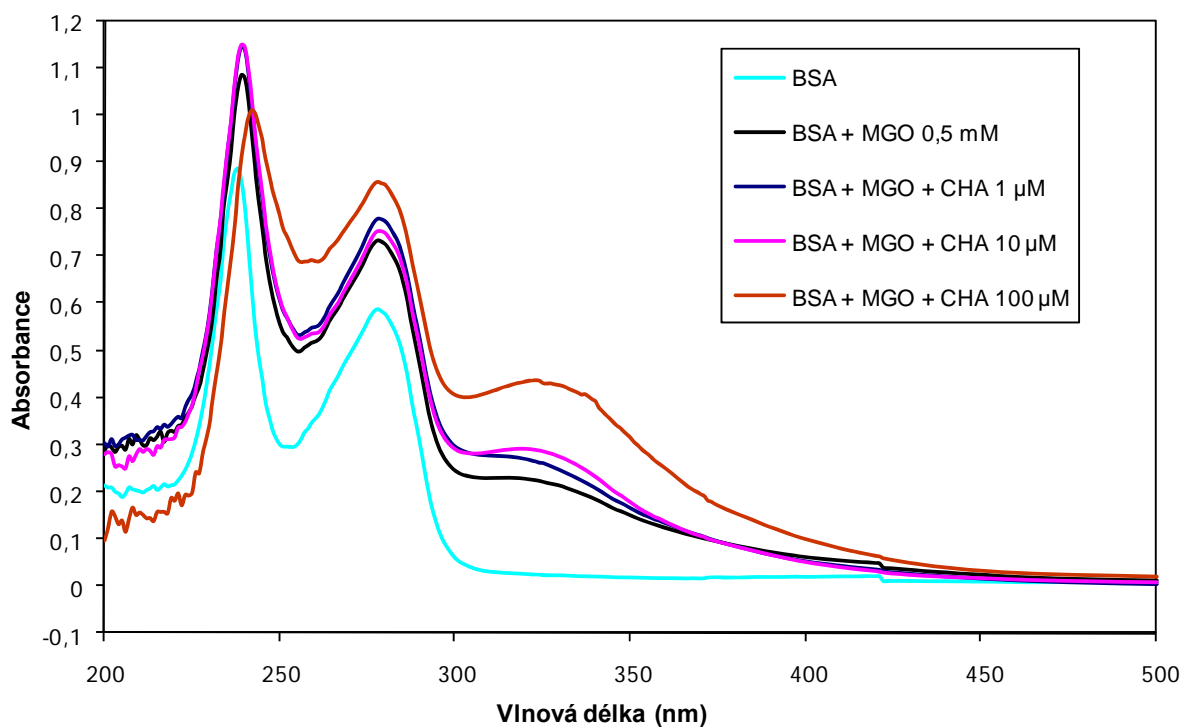
Obr. 52: Vliv kyseliny sinapové (1 - 100  $\mu\text{M}$ ) na vznik AGEs. BSA (1 mg/ml) bylo inkubováno s methylglyoxalem (0,5 mM) po dobu 7 dní při 37°C. Absorbance byla měřena na přístroji Helios $\beta$  v rozmezí vlnových délek 200 - 500 nm při 37°C.



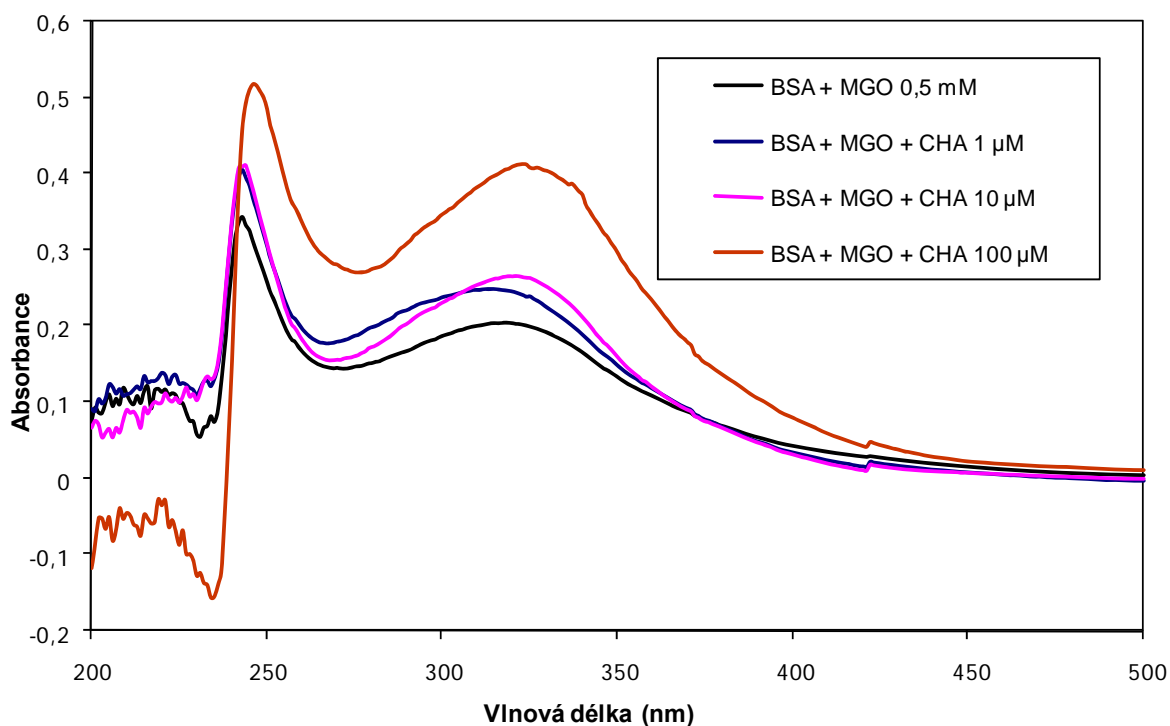
### ***5.2.6 Kyselina chlorogenová***

V proteinové části absorpčního spektra došlo jen k malým změnám oproti glykovanému BSA. Pouze kyselina chlorogenová 100  $\mu\text{M}$  způsobila mírný nárůst absorbance v oblasti kolem 280 nm (obr. 53).

Kyselina chlorogenová ve všech studovaných koncentracích vykazovala při měření absorbance proglykační efekt. Ten byl závislý na koncentraci (obr. 54).



Obr. 53: Vliv kyseliny chlorogenové (1 - 100  $\mu\text{M}$ ) na glykaci BSA (1 mg/ml) methylglyoxalem (0,5 mM) po sedmidenní inkubaci při 37°C. Absorbance byla měřena na přístroji Helios $\beta$  v rozmezí vlnových délek 200 - 500 nm 37°C.

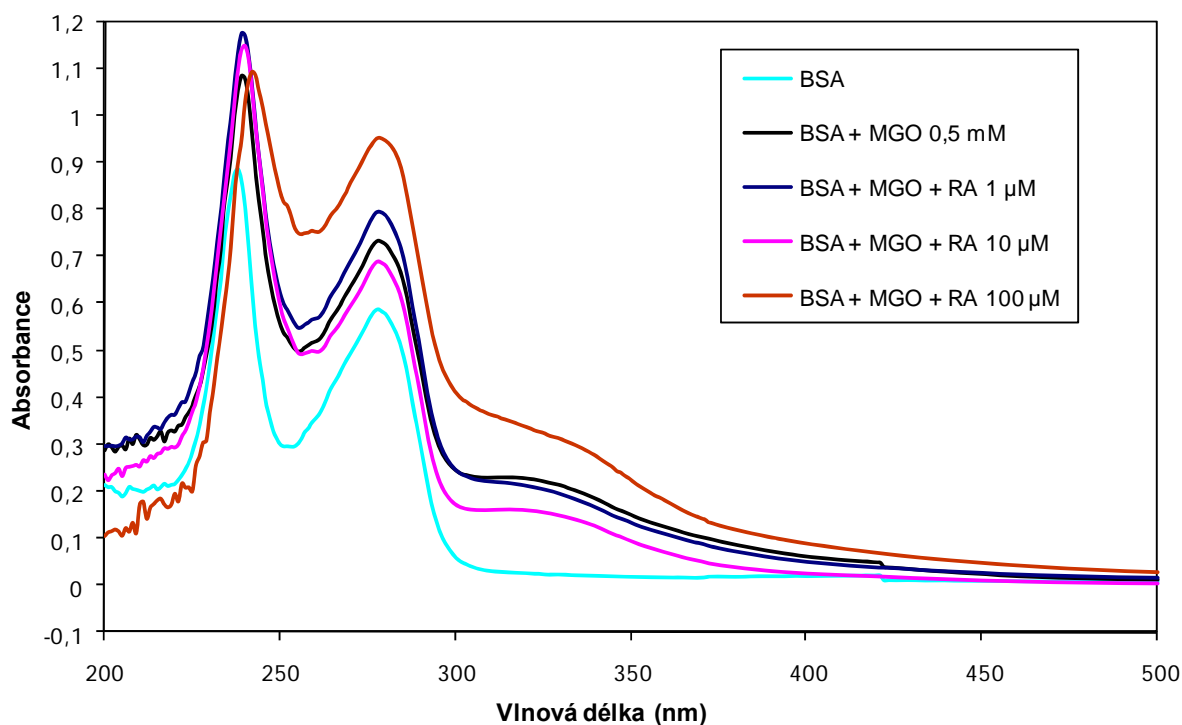


Obr. 54: Vliv kyseliny chlorogenové (1 - 100  $\mu\text{M}$ ) na vznik AGEs. BSA (1 mg/ml) bylo inkubováno s methylglyoxalem (0,5 mM) po dobu 7 dní při 37°C. Absorbance byla měřena na přístroji Helios $\beta$  v rozmezí vlnových délek 200 - 500 nm při 37°C.

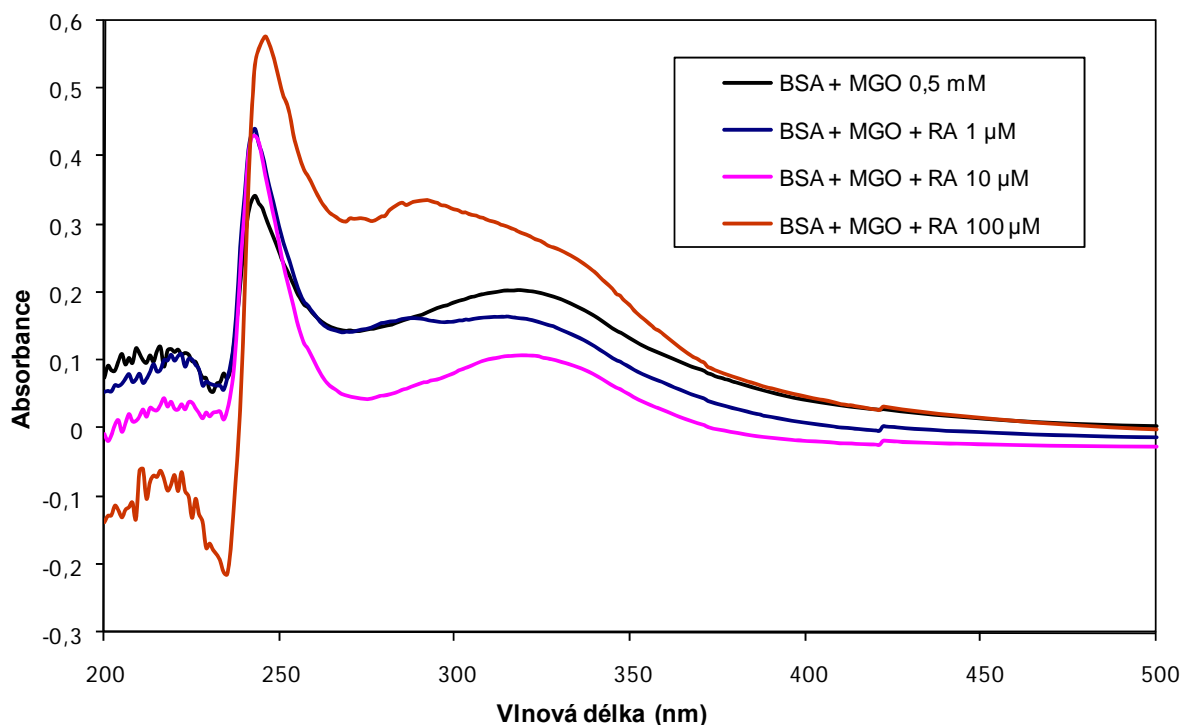
### ***5.2.7 Kyselina rozmarýnová***

Kyselina rozmarýnová 10  $\mu\text{M}$  vyvolala pokles absorbance v oblasti kolem 280 nm. Naproti tomu 1 a 100  $\mu\text{M}$  koncentrace způsobily nárůst absorbance v proteinové části absorpčního spektra (obr. 55).

Účinek kyseliny rozmarýnové na vznik AGE produktů se lišil v závislosti na její koncentraci. Kyselina rozmarýnová 1  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$  glykaci inhibovala a 100  $\mu\text{M}$  naopak prokázala silný proglykační efekt (obr. 56).



Obr. 55: Vliv kyseliny rozmarýnové (1 - 100  $\mu\text{M}$ ) na glykaci BSA (1 mg/ml) methylglyoxalem (0,5 mM) po sedmidenní inkubaci při 37°C. Absorbance byla měřena na přístroji Helios $\beta$  v rozmezí vlnových délek 200 - 500 nm při 37°C.

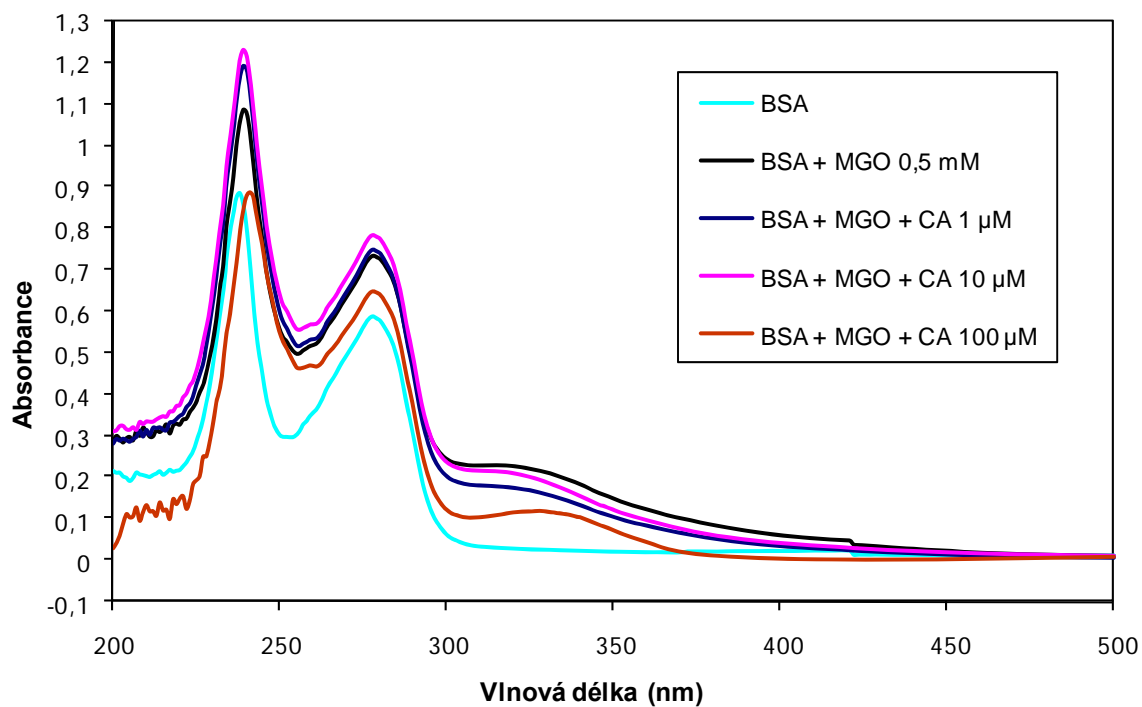


Obr. 56: Vliv kyseliny rozmarýnové (1 - 100  $\mu\text{M}$ ) na vznik AGEs. BSA (1 mg/ml) bylo inkubováno s methylglyoxalem (0,5 mM) po dobu 7 dní při 37°C. Absorbance byla měřena na přístroji Helios $\beta$  v rozmezí vlnových délek 200 - 500 nm při 37°C.

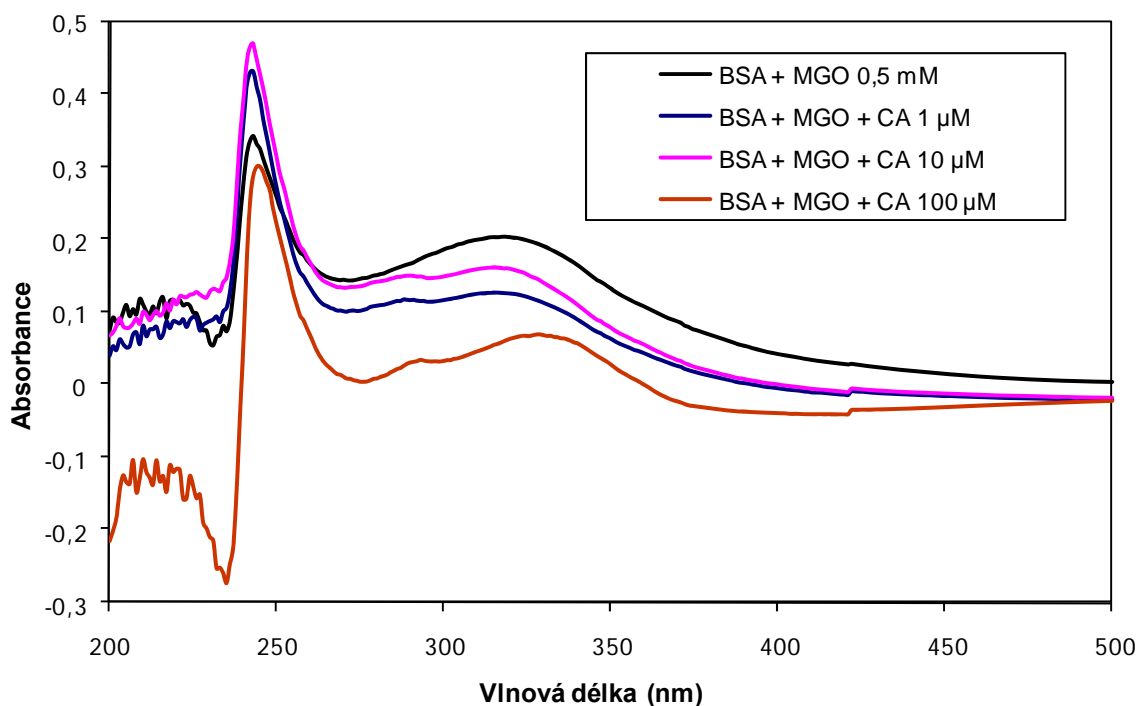
### ***5.2.8 Kyselina kávová***

Kyselina kávová 1 a 10  $\mu\text{M}$  způsobila mírný nárůst absorbance obou maxim v proteinové části spektra. Naopak 100  $\mu\text{M}$  koncentrace této kyseliny vyvolala její pokles (obr. 57).

Všechny studované koncentrace kyseliny kávové vykazovaly antiglykační efekt, který byl nejméně patrný u 10  $\mu\text{M}$ , a naopak nejvíce se projevil u 100  $\mu\text{M}$  koncentrace (obr. 58).



Obr. 57: Vliv kyseliny kávové (1 - 100  $\mu\text{M}$ ) na glykaci BSA (1 mg/ml) methylglyoxalem (0,5 mM) po sedmidenní inkubaci při 37°C. Absorbance byla měřena na přístroji Helios $\beta$  v rozmezí vlnových délek 200 - 500 nm při 37°C.

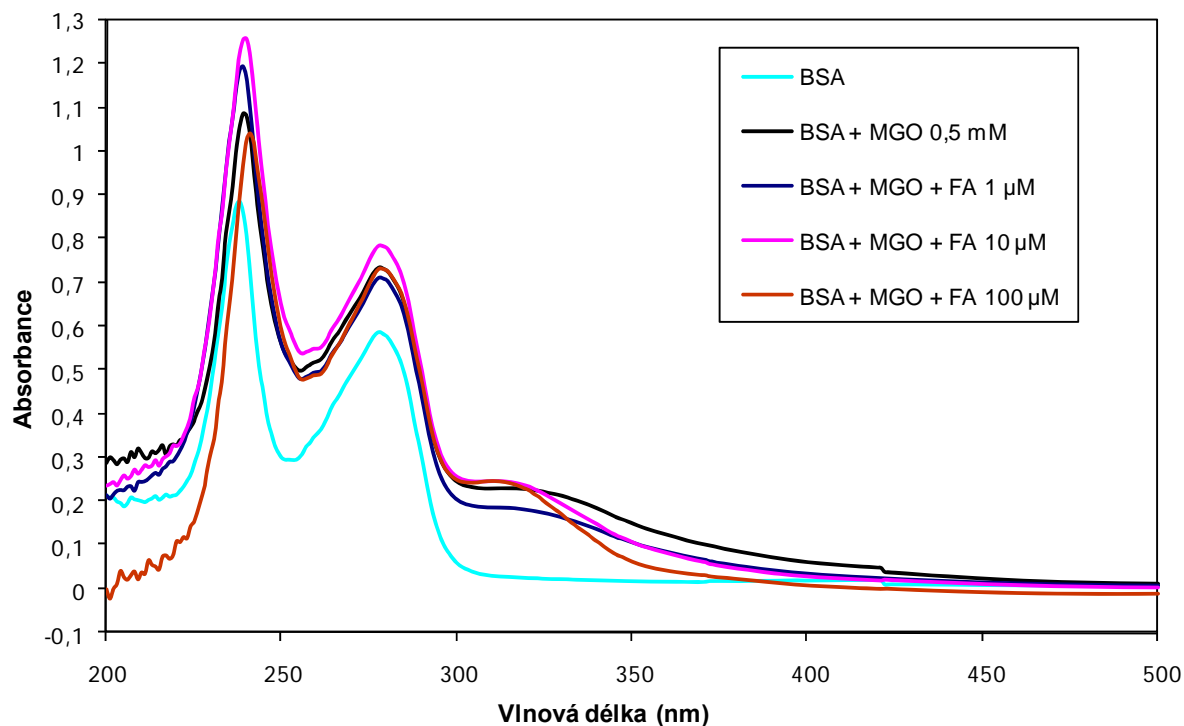


Obr. 58: Vliv kyseliny kávové (1 - 100  $\mu\text{M}$ ) na vznik AGEs. BSA (1 mg/ml) bylo inkubováno s methylglyoxalem (0,5 mM) po dobu 7 dní při 37°C. Absorbance byla měřena na přístroji Helios $\beta$  v rozmezí vlnových délek 200 - 500 nm při 37°C.

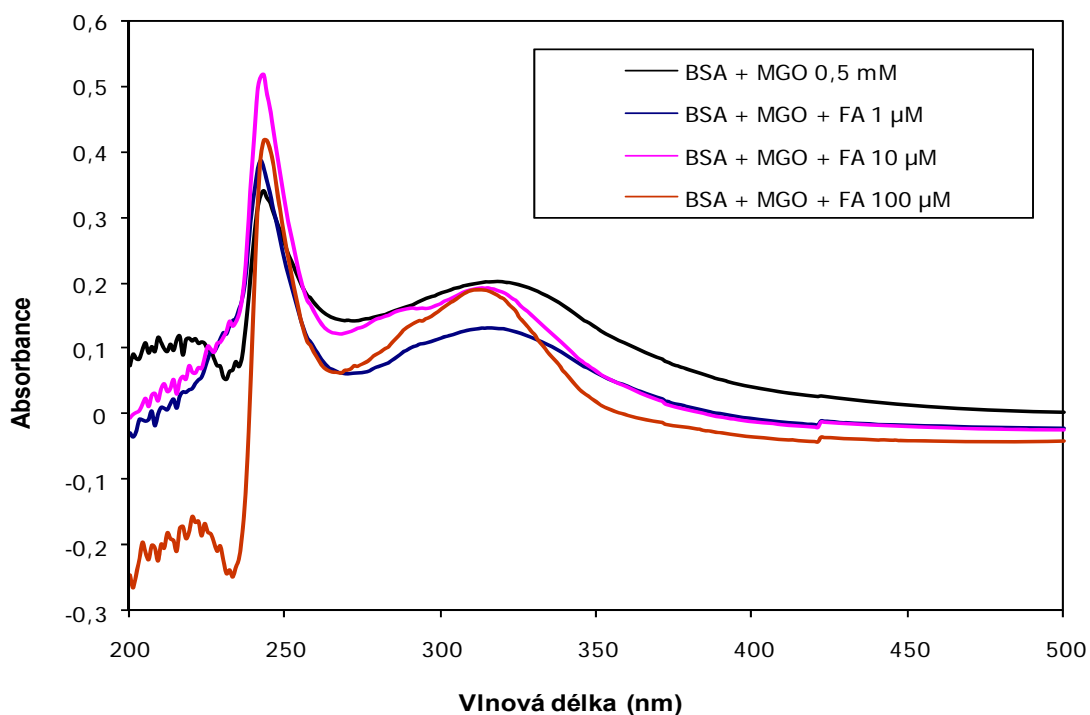
### ***5.2.9 Kyselina ferulová***

Kyselina ferulová ve všech studovaných koncentracích způsobila jen malý nárůst absorbance v oblasti aromatických aminokyselin ve srovnání s kontrolou BSA + MGO (obr. 59).

V oblasti AGEs jsem zaznamenala jen nepatrné zvýšení absorbance u 10 a 100  $\mu\text{M}$  kyseliny ferulové, zatímco 1  $\mu\text{M}$  koncentrace této kyseliny vykazovala poměrně silný antiglykační účinek (obr. 60).



Obr. 59: Vliv kyseliny ferulové (1 - 100  $\mu\text{M}$ ) na glykaci BSA (1 mg/ml) methylglyoxalem (0,5 mM) po sedmidenní inkubaci při 37°C. Absorbance byla měřena na přístroji Helios $\beta$  v rozmezí vlnových délek 200 - 500 nm při 37°C.



Obr. 60: Vliv kyseliny ferulové (1 - 100  $\mu\text{M}$ ) na vznik AGEs. BSA (1 mg/ml) bylo inkubováno s methylglyoxalem (0,5 mM) po dobu 7 dní při 37°C. Absorbance byla měřena na přístroji Helios $\beta$  v rozmezí vlnových délek 200 - 500 nm při 37°C.



Tabulka 9: Účinek studovaných hydroxyskořicových kyselin na vznik glykačních produktů.

Vzorek <sup>1</sup>	Absorbance <sup>2</sup>	Tvorba AGEs (% kontroly)	Vznik AGEs <sup>3</sup> (%)
<b>Kontrola BSA + MGO</b>	0,231	100,0	
<b>BSA + MGO + 1 μM oK</b>	0,283	122,5	22,5
<b>BSA + MGO + 10 μM oK</b>	0,299	129,4	29,4
<b>BSA + MGO + 100 μM oK</b>	0,374	162,9	162,9
<b>BSA + MGO + 1 μM mK</b>	0,260	112,6	12,6
<b>BSA + MGO + 10 μM mK</b>	0,258	111,7	11,7
<b>BSA + MGO + 100 μM mK</b>	0,219	94,8	<b>- 5,2</b>
<b>BSA + MGO + 1 μM pK</b>	0,243	105,2	5,2
<b>BSA + MGO + 10 μM pK</b>	0,239	103,5	3,5
<b>BSA + MGO + 100 μM pK</b>	0,157	68,0	<b>- 32,0</b>
<b>BSA + MGO + 1 μM SA</b>	0,248	107,4	7,4
<b>BSA + MGO + 10 μM SA</b>	0,288	124,7	24,7
<b>BSA + MGO + 100 μM SA</b>	0,586	253,7	153,7
<b>BSA + MGO + 1 μM CHA</b>	0,277	119,9	19,9
<b>BSA + MGO + 10 μM CHA</b>	0,288	124,7	24,7
<b>BSA + MGO + 100 μM CHA</b>	0,423	183,1	83,1
<b>BSA + MGO + 1 μM RA</b>	0,218	94,4	<b>-5,6</b>
<b>BSA + MGO + 10 μM RA</b>	0,160	69,3	<b>-30,7</b>
<b>BSA + MGO + 100 μM RA</b>	0,353	152,8	52,8
<b>BSA + MGO + 1 μM CA</b>	0,180	77,9	<b>-22,1</b>
<b>BSA + MGO + 10 μM CA</b>	0,215	93,1	<b>-6,9</b>
<b>BSA + MGO + 100 μM CA</b>	0,107	46,3	<b>-53,7</b>
<b>BSA + MGO + 1 μM FA</b>	0,185	80,1	<b>-19,9</b>
<b>BSA + MGO + 10 μM FA</b>	0,246	106,5	6,5
<b>BSA + MGO + 100 μM FA</b>	0,243	105,2	5,2

<sup>1</sup>Inkubační směsi obsahovaly BSA (1 mg/ml), methylglyoxal (0,5 mM) a hydroxyskořicovou kyselinu v odpovídající koncentraci.

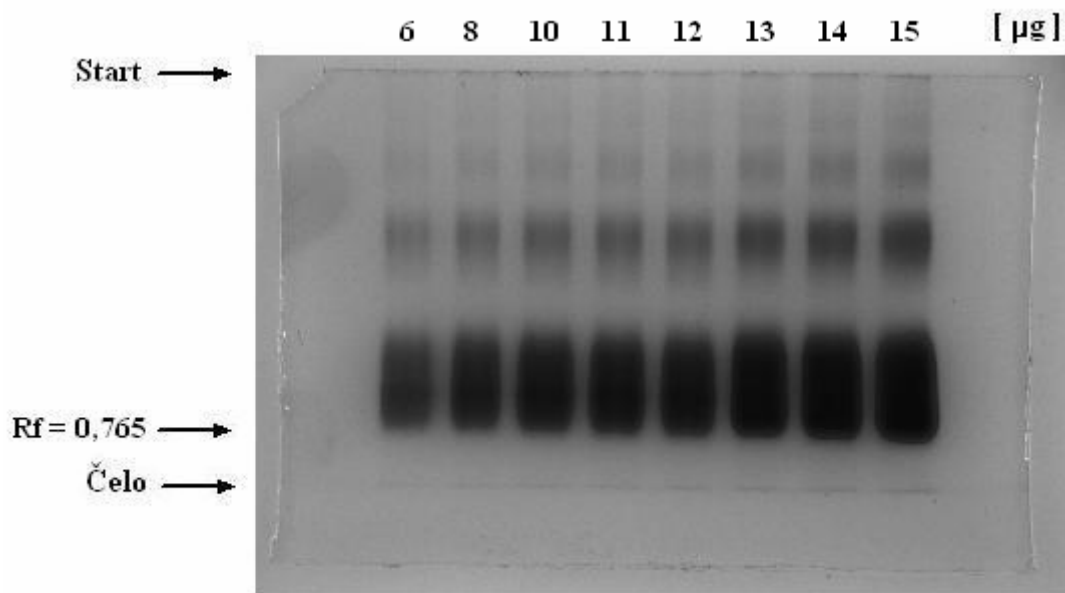
<sup>2</sup>Absorbance vzorků byla měřena po 7 dnech inkubace při 37°C v oblasti 200 – 500 nm. Pro posouzení vzniku AGEs jsem zvolila vlnovou délku 314 nm.

<sup>3</sup>Kladné hodnoty značí, že studovaná kyselina měla proglykační účinek. Pokud je hodnota záporná, pak daná kyselina vykazovala antiglykační účinek.

## 5.3 Elektroforesa a Imunoblotting

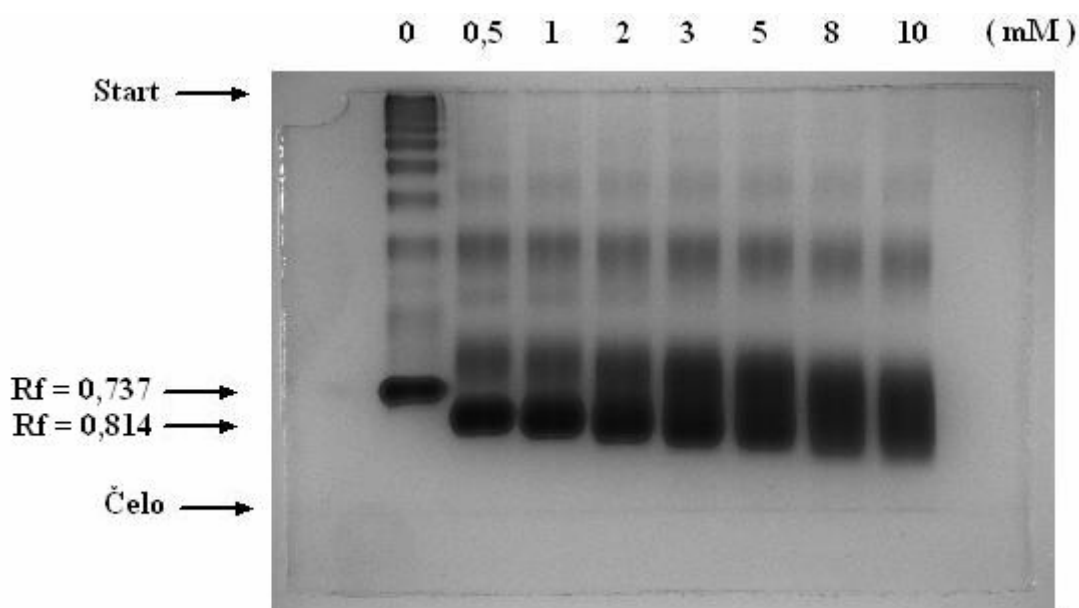
V úvodu elektroforetických experimentů jsem musela optimalizovat podmínky (tj. hustotu gelu, nanášené množství bílkoviny a koncentraci glykačního činidla). Používala jsem nativní PAGE a SDS-PAGE za denaturujících podmínek. U nativní PAGE jsem hodnotila elektroforetickou mobilitu ( $R_f$ ) jednotlivých vzorků, neboť při glykaci bílkovina ztrácí kladný náboj a stává se záporněji nabitou a tím se zvyšuje její elektroforetická mobilita. Pomocí SDS-PAGE a následně i imunoblottingu jsem sledovala vznik vysokomolekulárních komplexů, které vznikly sřetením molekul bílkovin pomocí glykačních produktů.

Experimenty jsem zahájila optimalizací podmínek nativní PAGE. Nejprve jsem zjišťovala nejvhodnější množství nanášeného BSA (obr. 61). Po obarvení Coomassie Blue nebyly na gelu patrné jasně ohraničené bandy, ale větší skvrny. Se zvyšujícím se množstvím nanášené bílkoviny jsem pozorovala vzrůstající intenzitu i velikost jednotlivých proužků. Nicméně hodnota  $R_f$  nebyla ovlivněna a pohybovala se u všech vzorků v rozmezí  $0,765 \pm 0,002$ . Pro další experimenty jsem zvolila nanášené množství bílkoviny **8  $\mu\text{g}$ /jamku**.



Obr. 61: Zjištění vhodného množství nanášené bílkoviny. BSA bylo inkubováno s methylglyoxalem (0,5 mM) 3 dny při 37°C a následně podrobena nativní PAGE. Nanášené množství BSA bylo 6 - 15  $\mu\text{g}$  na jamku. Podmínky: 4% zaostřovací a 7,5% rozdělovací gel, barvení Coomassie Blue G250.

Dále jsem se zaměřila na zvolení vhodné koncentrace glykačního činidla (MGO). BSA jsem inkubovala 3 dny při 37°C s methylglyoxalem v koncentraci 0 – 10 mM. Po obarvení Coomassie Blue G250 byl patrný vliv zvyšující se koncentrace glykačního činidla na molekulu BSA (obr. 62). Modifikace bílkoviny způsobená nárůstem glykačních produktů v závislosti na zvyšující se koncentraci MGO se projevila rostoucími hodnotami Rf u jednotlivých vzorků. Tyto hodnoty stoupaly v důsledku modifikace kladně nabitých lysinových zbytků methylglyoxalem. Pro další pokusy jsem používala 0,5 mM MGO.



Obr. 62: Určení optimální koncentrace methylglyoxalu pro další experimenty. BSA bylo inkubováno s MGO (0 – 10 mM) po dobu 3 dnů při 37°C a následně podrobena nativní PAGE. Podmínky: 4% zaostřovací a 7,5% rozdělovací gel, nanášené množství bílkoviny 8 µg/jamku, barvení Coomassie Blue G250.

V následující tabulce uvádím hodnoty Rf u prvních čtyř inkubačních směsí, které bylo možné bez obtíží detekovat. Další hodnoty nebylo možné vyhodnotit číselně, ale z obr. 62 je patrný jednak postupný nárůst vzdálenosti bandů od startu a také jejich velikosti.

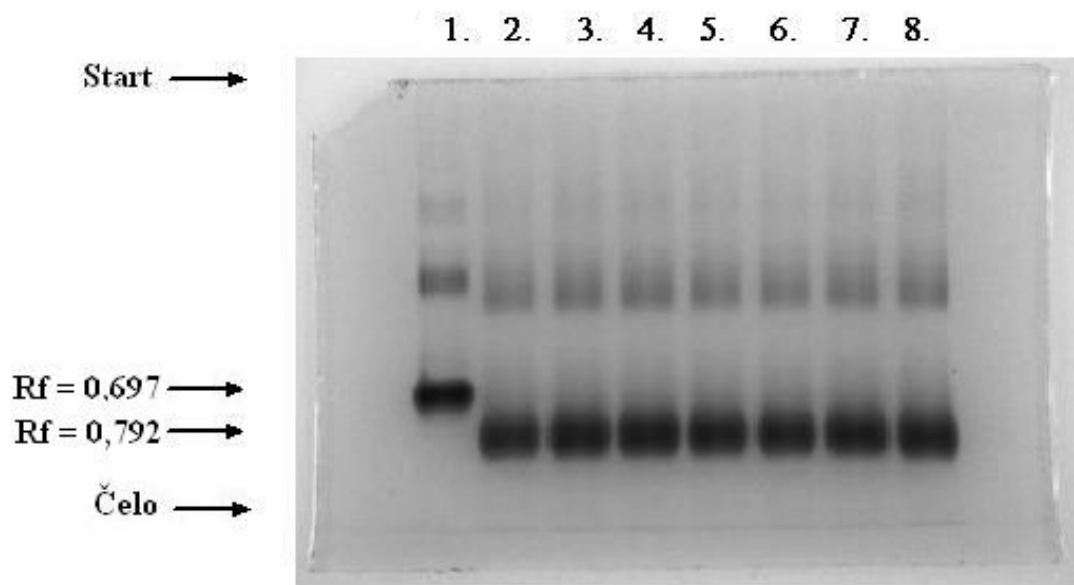
Jamka	Koncentrace MGO (mM)	Rf
1	0	0,737
2	0,5	0,814
3	1,0	0,820
4	2,0	0,829

Nakonec jsem se zaměřila na zkoumání možného antiglykačního vlivu hydroxyskořicových kyselin na molekulu BSA po čtrnáctidenní inkubaci s glykačním činidlem (MGO 0,5 mM). Účinek působení hydroxyskořicových kyselin na glykaci molekuly BSA methylglyoxalem jsem hodnotila vyčíslením hodnoty Rf jednotlivých inkubačních směsí (tab. 10).

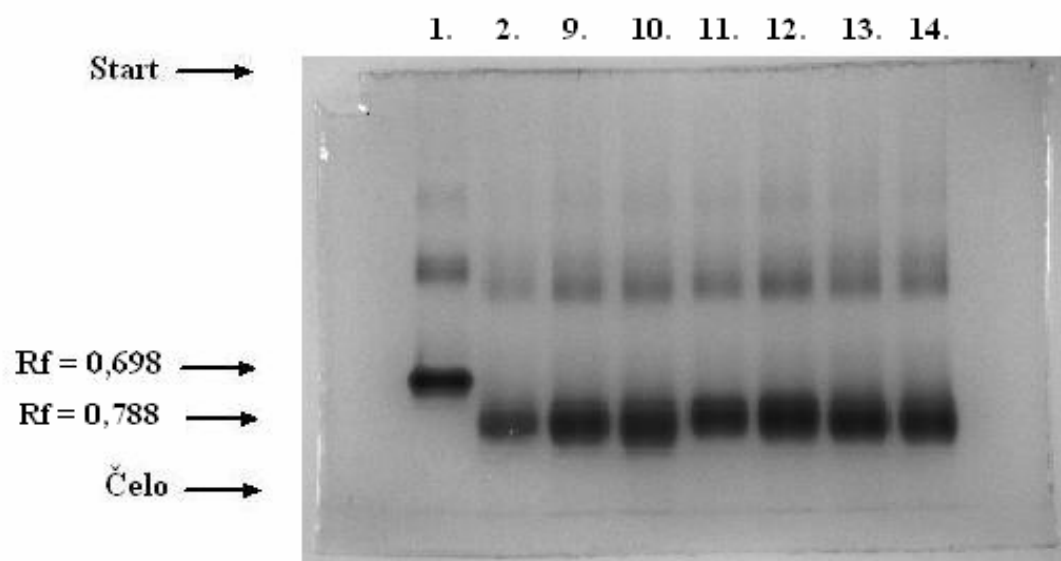
Z obrázků 63 a 64 je patrné ovlivnění molekuly BSA glykačním činidlem a nárůst hodnoty Rf u inkubační směsi v jamce č. 2. Modifikace bílkoviny působením glykačního činidla je patrná i u dalších vzorků, které obsahují hydroxyskořicové kyseliny. V žádné z inkubačních směsí nebyl patrný jejich antiglykační účinek. Některé kyseliny naopak tvorbu glykačních produktů podporovaly a hodnoty Rf byly vyšší než u glykované kontroly.

Tab. 10: Složení inkubačních směsí a hodnoty Rf jednotlivých vzorků po nativní PAGE.

<b>Jamka</b>	<b>Inkubační směs</b>	<b>Rf</b> gel 1/gel 2
1	BSA	0,697/0,698
2	BSA + MGO 0,5 mM	0,792/0,788
3	BSA + MGO 0,5 mM + 10 $\mu$ M <i>o</i> -kumarová	0,789
4	BSA + MGO 0,5 mM + 100 $\mu$ M <i>o</i> -kumarová	0,789
5	BSA + MGO 0,5 mM + 100 $\mu$ M <i>m</i> -kumarová	0,790
6	BSA + MGO 0,5 mM + 100 $\mu$ M <i>p</i> -kumarová	0,794
7	BSA + MGO 0,5 mM + 10 $\mu$ M sinapová	0,799
8	BSA + MGO 0,5 mM + 100 $\mu$ M sinapová	0,807
9	BSA + MGO 0,5 mM + 100 $\mu$ M chlorogenová	0,798
10	BSA + MGO 0,5 mM + 100 $\mu$ M rozmarýnová	0,802
11	BSA + MGO 0,5 mM + 10 $\mu$ M kávová	0,788
12	BSA + MGO 0,5 mM + 100 $\mu$ M kávová	0,793
13	BSA + MGO 0,5 mM + 10 $\mu$ M ferulová	0,803
14	BSA + MGO 0,5 mM + 100 $\mu$ M ferulová	0,807



Obr. 63: Vliv hydroxyskořicových kyselin na molekulový náboj glykovaného BSA sledovaný pomocí nativní PAGE (gel 1). BSA bylo inkubováno s methylglyoxalem (0,5 mM) a HCAs při 37°C po dobu 14 dní. Podmínky: 4% zaostřovací a 7,5% rozdělovací gel, nanášené množství bílkoviny 8 µg/jamku, barvení Coomassie Blue G250.

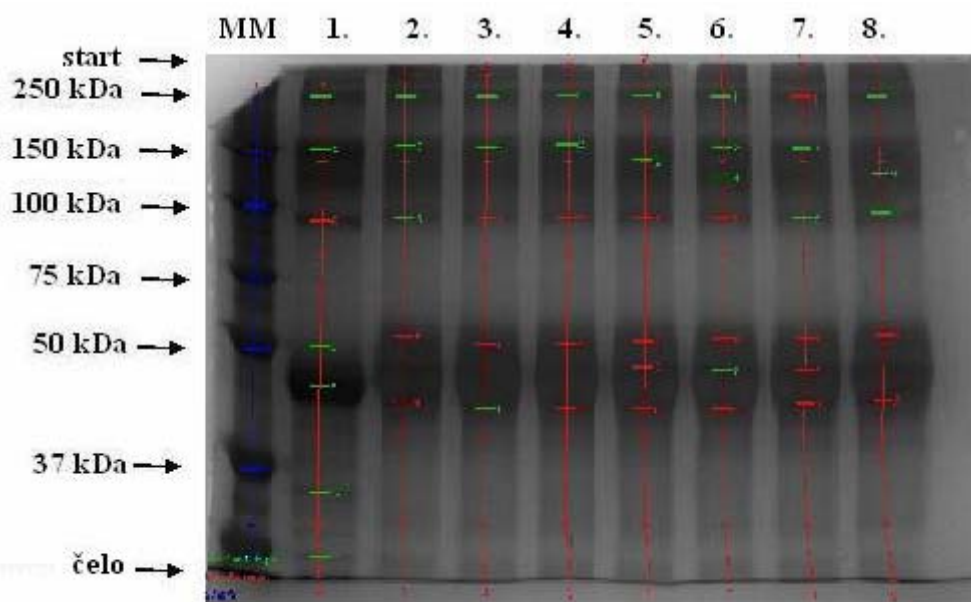


Obr. 64: Vliv hydroxyskořicových kyselin na molekulový náboj glykovaného BSA sledovaný pomocí nativní PAGE (gel 2). BSA bylo inkubováno s methylglyoxalem (0,5 mM) a HCAs při 37°C po dobu 14 dní. Podmínky: 4% zaostřovací a 7,5% rozdělovací gel, nanášené množství bílkoviny 8 µg/jamku, barvení Coomassie Blue G250.

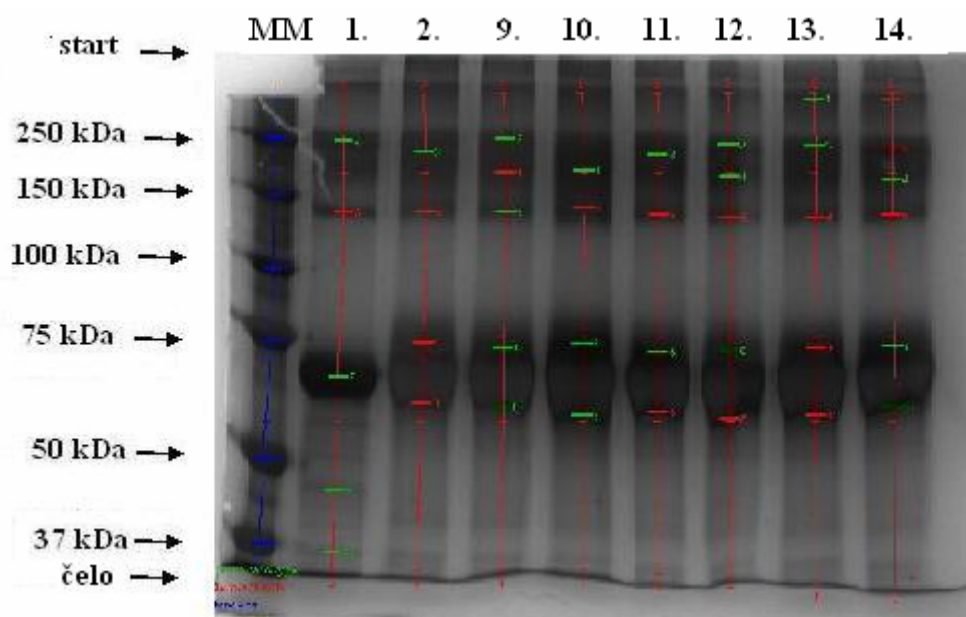
Již při prvních pokusech se ukázala nevhodnost použití daného komerčně dostupného preparátu BSA jako modelové bílkoviny pro elektroforetické experimenty. Bandy byly rozmazané a obtížně se dala určit hodnota Rf. Tento preparát obsahuje volné mastné kyseliny a globuliny, které pravděpodobně způsobily potíže při analýze výsledků (další bandy patrné v horní polovině gelu).

U SDS-PAGE se tyto problémy projeví zřetelněji a gely nemohly být vůbec použity pro vyhodnocení. Pokusila jsem se o úpravu podmínek elektroforetického stanovení změnou koncentrace roztředlovacího gelu z 10% na 7,5%. Pořadí nanášených vzorků je stejné, jako tomu bylo u nativní PAGE (tab. 10), pouze do první jamky jsem navíc pipetovala molekulový standard. Na ukázkou uvádím dva 7,5% gely barvené stříbrem (obr. 65 a 66).

Po obarvení se dal jen těžko posuzovat vliv methylglyoxalu a hydroxyskořicových kyselin. Předpokládala jsem, že AGEs se budou vyskytovat v horní třetině gelu jako nové proužky ve vzorcích 2 – 14, ale jak je patrné z obr. 65 a 66, lze tento předpoklad jen obtížně potvrdit.



Obr. 65: Vliv hydroxyskořicových kyselin na vznik AGEs sledovaný pomocí SDS-PAGE (gel 1). BSA bylo inkubováno s methylglyoxalem (0,5 mM) a HCAs při 37°C po dobu 7 dní. Podmínky: 4% zaostřovací a 7,5% roztředlovací gel, nanášené množství bílkoviny 4 µg/jamku, barvení Silver Staining.



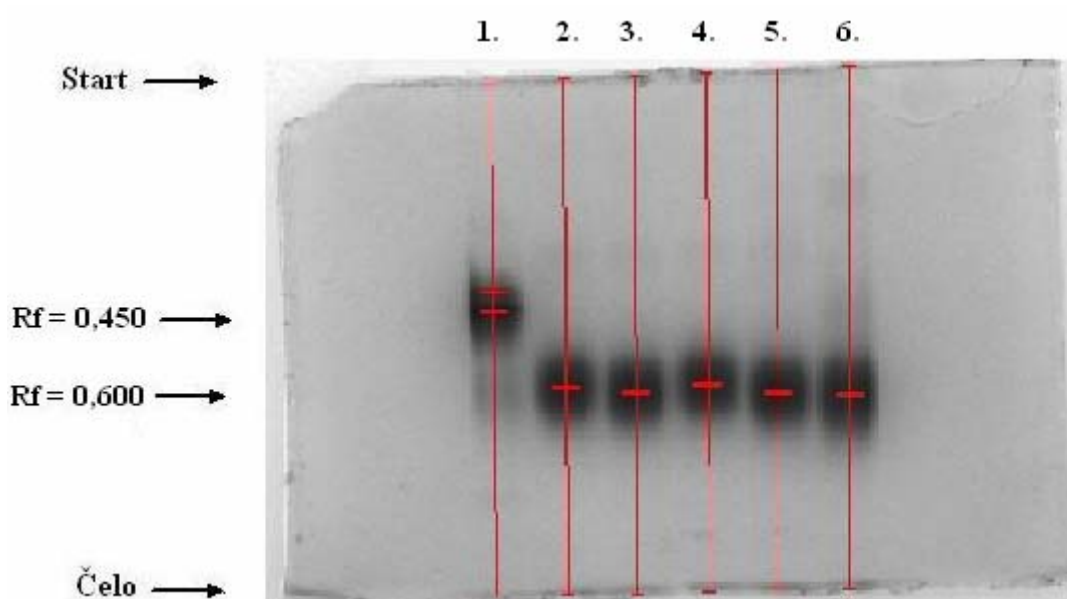
Obr. 66: Vliv hydroxyskořicových kyselin na vznik AGEs sledovaný pomocí SDS-PAGE (gel 2). BSA bylo inkubováno s methylglyoxalem (0,5 mM) a HCAs při 37°C po dobu 7 dní. Podmínky: 4% zaostřovací a 7,5% rozdělovací gel, nanášené množství bílkoviny 4 µg/jamku, barvení Silver Staining.

Ani po úpravě podmínek se nezlepšila kvalita obarvených gelů a vyhodnocení bylo velmi obtížné. Proto jsem pro další experimenty použila jako modelovou bílkovinu AST místo BSA. AST se na katedře biochemických věd používá jako modelová bílkovina pro experimenty s různými glykačními činidly, a i její chování při elektroforetické separaci je známé. Pro sledování možného antiglykačního účinku jednotlivých HCAs jsem používala už jen 100 µM koncentraci těchto látek, protože v předchozích metodikách u nich bylo nejlépe viditelné ovlivnění glykace bílkovinné molekuly. Elektroforesu (nativní PAGE i SDS-PAGE s následným imunoblottingem) jsem prováděla se vzorky inkubovanými 7 dní.

V tabulce 11 jsou zdokumentovány hodnoty Rf jednotlivých inkubačních směsí. Na základě číselných hodnot Rf a z gelu po nativní PAGE obarveného Coomassie Blue G250 je patrné, že žádná ze studovaných kyselin neprokázala antiglykační efekt na glykaci AST methylglyoxalem. Některé HCAs naopak tvorbu AGEs ještě podpořily (vznik dalších proužků s vysokou molekulovou hmotností u kyseliny kávové a rozmarýnové).

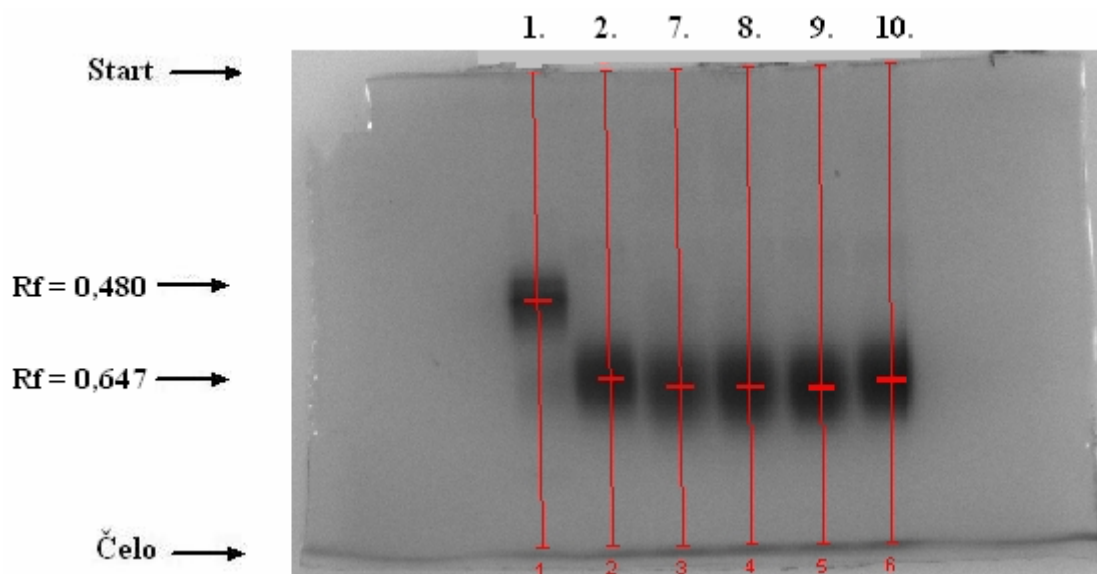
Tab. 11: Složení inkubačních směsí a hodnoty Rf jednotlivých vzorků po nativní PAGE.

Jamka	Inkubační směs	Rf gel 1/gel 2
1	AST	0,450/0,480
2	AST + MGO 0,5 mM	0,600/0,647
3	AST + MGO 0,5 mM + 100 $\mu$ M <i>o</i> -kumarová	0,612
4	AST + MGO 0,5 mM + 100 $\mu$ M <i>m</i> -kumarová	0,600
5	AST + MGO 0,5 mM + 100 $\mu$ M <i>p</i> -kumarová	0,620
6	AST + MGO 0,5 mM + 100 $\mu$ M kávová	0,627
7	AST + MGO 0,5 mM + 100 $\mu$ M rozmarýnová	0,665
8	AST + MGO 0,5 mM + 100 $\mu$ M chlorogenová	0,668
9	AST + MGO 0,5 mM + 100 $\mu$ M ferulová	0,673
10	AST + MGO 0,5 mM + 100 $\mu$ M sinapová	0,661



Obr. 67: Vliv hydroxyskořicových kyselin na molekulový náboj glykovaného AST sledovaný pomocí nativní PAGE (gel 1). AST bylo inkubováno s methylglyoxalem (0,5 mM) a HCAs při 37°C po dobu 7 dní. Podmínky: 4% zaostřovací a 7,5% rozdělovací gel, nanášené množství bílkoviny 9  $\mu$ g/jamku, barvení Coomassie Blue G250.

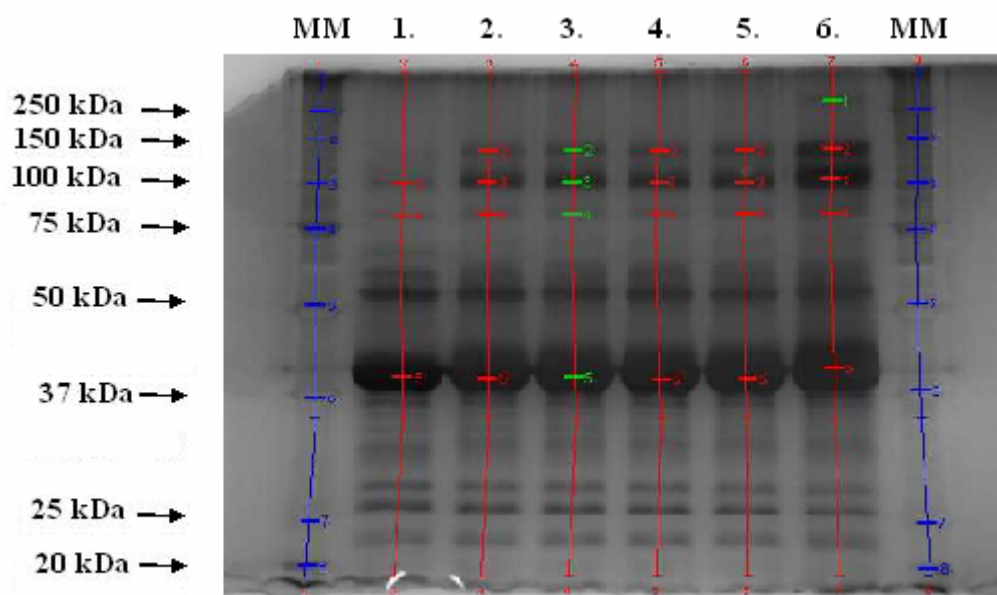




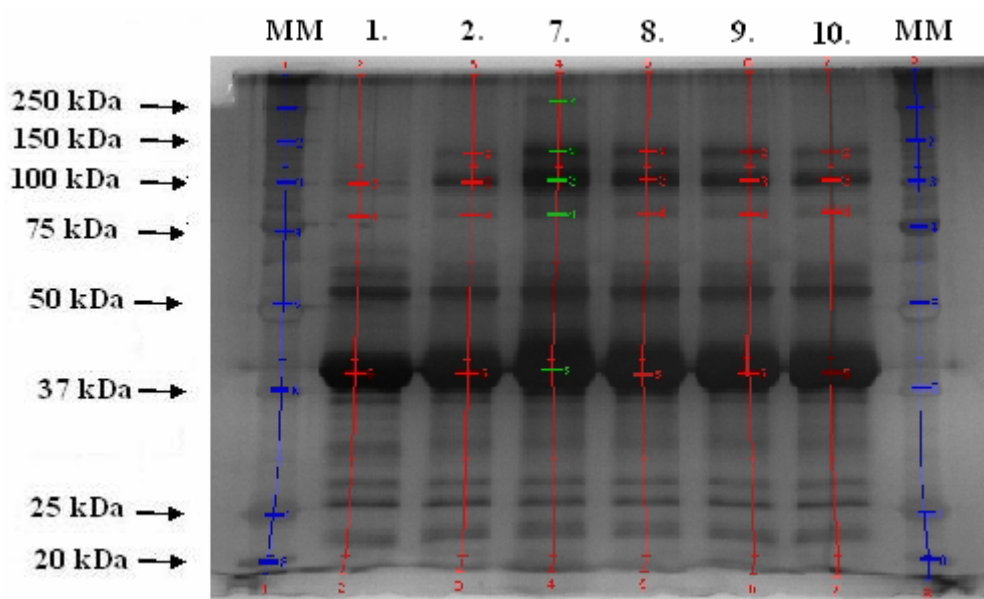
Obr. 68: Vliv hydroxyskořicových kyselin na molekulový náboj glykovaného AST sledovaný pomocí nativní PAGE (gel 2). AST bylo inkubováno s methylglyoxalem (0,5 mM) a HCAs při 37°C po dobu 7 dní. Podmínky: 4% zaostřovací a 7,5% rozdělovací gel, nanášené množství bílkoviny 9 µg/jamku, barvení Coomassie Blue G250.

Z gelů obarvených technikou Silver Staining po SDS-PAGE se ani u jedné ze zkoumaných kyselin neprojevila antiglykační schopnost. Naopak v mnoha případech kyseliny podporovaly glykaci molekuly AST a vznik dalších proužků s vysokou molekulovou hmotností, které pravděpodobně obsahují pozdní produkty glykace (obr. 69 a 70). Projevily se na gelu novým bandem nebo vyšší intenzitou bandů v oblasti vysokomolekulárních sloučenin (100 - 250 kDa). U 100 µM kyseliny kávové (gel 1, vzorek 6) a 100 µM kyseliny rozmarýnové (gel 2, vzorek 7) je z gelů patrné navýšení tvorby pozdních produktů glykace oproti glykované kontrole (AST + MGO, vzorek 2).

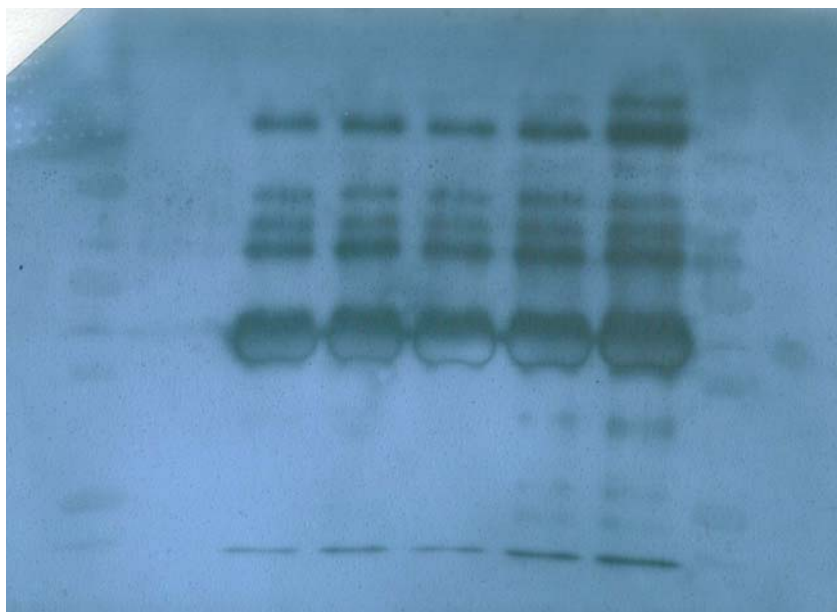
Vznik dalších produktů s vysokou molekulovou hmotností se podařilo potvrdit pomocí imunoblottingu (obr. 71 a 72). Kontrolní vzorek AST (inkubovaný bez MGO a bez HCAs) neobsahoval glykační produkty odvozené od methylglyoxalu, protože v dané jamce (vzorek 1) nebyl touto metodou detekován žádný band. Ve vzorcích obsahujících kyselinu kávovou, rozmarýnovou, chlorogenovou a ferulovou se po inkubaci objevil další proužek s  $M_w$  asi 140 kDa. RTG filmy po imunoblottingu byly rovněž vyhodnoceny pomocí programu QuantityOne, ale pro špatnou kvalitu skenů zde prezentují pouze obrázky naskenované běžným skenerem a tudíž bez vyhodnocení.



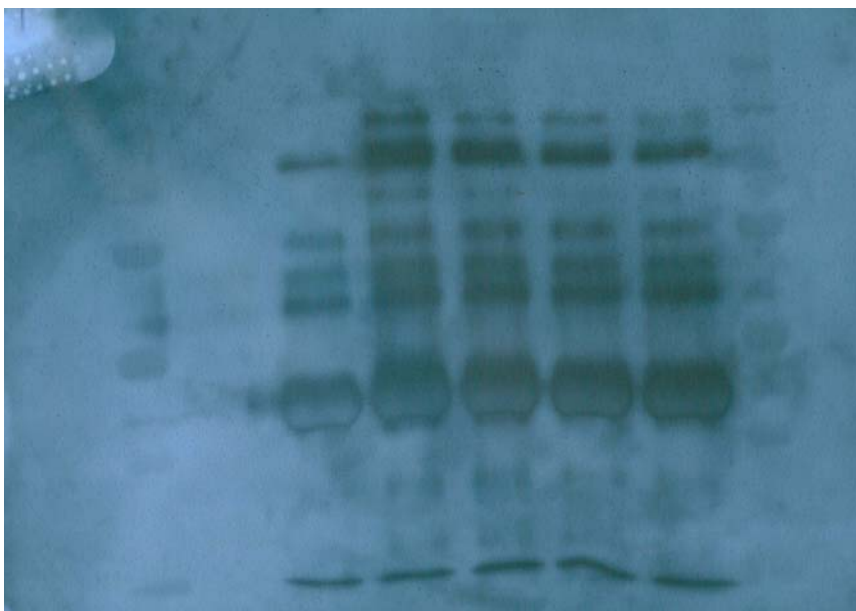
Obr. 69: Vliv hydroxyskořicových kyselin na vznik AGEs sledovaný pomocí SDS-PAGE (gel 1). AST bylo inkubováno s methylglyoxalem (0,5 mM) a HCAs (100  $\mu$ M) při 37°C po dobu 7 dní. Podmínky: 4% zaostřovací a 10% rozdělovací gel, nanášené množství bílkoviny 4  $\mu$ g/jamku, barvení Silver Staining.



Obr. 70: Vliv hydroxyskořicových kyselin na vznik AGEs sledovaný pomocí SDS-PAGE (gel 1). AST bylo inkubováno s methylglyoxalem (0,5 mM) a HCAs (100  $\mu$ M) při 37°C po dobu 7 dní. Podmínky: 4% zaostřovací a 10% rozdělovací gel, nanášené množství bílkoviny 4  $\mu$ g/jamku, barvení Silver Staining.



Obr. 71: Vliv hydroxyskořicových kyselin na vznik AGEs sledovaný pomocí imunoblottingu (RTG film 1). AST bylo inkubováno s methylglyoxalem (0,5 mM) a HCAs (100  $\mu$ M) při 37°C po dobu 7 dní. Podmínky: primární Ab proti MGO-AGEs, sekundární Ab konjugovaná s alkalickou fosfátasou, chemiluminiscenční detekce.



Obr. 72: Vliv hydroxyskořicových kyselin na vznik AGEs sledovaný pomocí imunoblottingu (RTG film 2). AST bylo inkubováno s methylglyoxalem (0,5 mM) a HCAs (100  $\mu$ M) při 37°C po dobu 7 dní. Podmínky: primární Ab proti MGO-AGEs, sekundární Ab konjugovaná s alkalickou fosfátasou, chemiluminiscenční detekce.

## **6. DISKUZE**

Teoretická část této práce byla zaměřena zejména na možnosti detekce pozdních produktů glykace. V experimentální části jsem sledovala vznik glykačních produktů ve dvou *in vitro* modelech a následně i vliv hydroxyskořicových kyselin na neenzymovou glykaci proteinů methylglyoxalem.

Methylglyoxal je reaktivní  $\alpha$ -dikarboxylová sloučenina, jejíž výrazné glykační vlastnosti již byly ověřeny v několika pracích publikovaných v odborných časopisech (Faure a kol. 2005, Meade a kol. 2003) a také na katedře biochemických věd, kde byl methylglyoxalový model glykace úspěšně zaveden v rámci diplomové práce Kláry Švehlové (2007). Hlavní výhodou použití MGO jako glykačního činidla je kratší doba inkubace než je tomu v případě monosacharidů. Pro glykaci proteinů jsem používala MGO v 0,5 mM koncentraci, která se osvědčila v již zmiňované práci Švehlové (2007).

V mnohých odborných pracích bylo BSA využíváno jako modelová bílkovina pro glykaci methylglyoxalem (Faure a kol. 2005, Wu a Yen 2005), ovšem na katedře biochemických věd se doposud pro experimenty využívala především aspartátaminotransferasa (Bacílková 2008, Švehlová 2007), kterou jsem použila i já při elektroforetických experimentech.

Hydroxyskořicové kyseliny jako zástupci látek fenolické povahy (polyfenoly) se řadí mezi antioxidanty (Natella a kol. 1999). Vztah mezi antioxidačními vlastnostmi těchto sloučenin a jejich chemickou strukturou byl prezentován v několika studiích za použití různých systémů generujících volné radikály (Natella 1999, Rice-Evans a kol. 1996). Tyto sloučeniny mají kromě antioxidačních vlastností také účinky imunomodulační, protizánětlivé a antimykotické (Boušová 2006).

V mé diplomové práci jsem se zaměřila na potenciální antiglykační vlastnosti hydroxyskořicových kyselin. Vycházela jsem z předpokladu, že antioxidační vlastnosti HCAs již byly popsány a že se během glykace tvoří volné radikály, které průběh glykace podporují. Látky s antioxidačními vlastnostmi by prostřednictvím zhášení volných radikálů mohly napomáhat k ochraně molekul proteinů před glykačními činidly (např. autooxidace cukrů), které vznikají degradací sacharidů, Schiffových bází,

přeskupování Amadoriho produktů i během celého glykoxidačního procesu (Singh a kol. 2001).

Detekce AGE produktů je založena na jejich charakteristických vlastnostech, protože jejich chemická struktura není dosud plně prostudována. Průběh glykace v použitém *in vitro* modelu jsem sledovala pomocí několika metod: fluorescenční spektroskopie, UV-VIS spektrofotometrie, nativní PAGE a SDS-PAGE následované barvením nebo imunoblottingem.

V rámci **fluorescenčních experimentů** jsem pomocí specifických vlnových délek excitace a emise sledovala vliv HCAs na tvorbu nespecifických AGEs, pentosidinu a na vnitřní fluorescenci BSA. U jednotlivých derivátů HCAs prezentuji výsledky dvěma způsoby. U detekce nespecifických AGEs a pentosidinu formou tabulky s průměrnými hodnotami intenzity fluorescence se směrodatnými odchylkami a následně v grafech (včetně směrodatných odchylek) jsou výsledky vyjádřeny procentuálně. Naměřené hodnoty jsou porovnávány s kontrolou obsahující BSA + MGO. Pro hodnocení vlivu na vnitřní fluorescenci byly výsledky zaznamenány pouze formou grafu závislosti fluorescence (vyjádřené v jednotkách AU) na době inkubace (0, 1, 3 a 7 dní). Vnitřní fluorescence je velmi citlivá vůči změnám v okolním prostředí, a pro tuto vlastnost je často využívána k hodnocení konformačních změn v molekule proteinu (Lakowicz 2004).

V úvodních experimentech jsem zkoumala nejdříve vliv délky inkubace na inkubační směsi obsahující samotné BSA a BSA + MGO. BSA po sedmidenní inkubaci při 37°C nevykazoval žádnou změnu v intenzitě fluorescence, což naznačuje, že v molekule BSA nedochází vlivem inkubace k žádným změnám v prostorovém uspořádání. Naopak byl zaznamenán významný pokles vnitřní fluorescence u vzorků obsahující glykační činidlo oproti vzorku obsahujícímu pouze BSA. Společně s výrazným poklesem vnitřní fluorescence ( $\lambda_{em} = 340$  nm) docházelo k nárůstu intenzity fluorescence v oblasti typické pro AGE produkty ( $\lambda_{em} = 385$  a 420 nm). Výrazný pokles vnitřní fluorescence je způsoben modifikací bílkoviny glykačním činidlem, která následně vede ke snížení autofluorescence tryptofanových zbytků v molekule BSA (Trp<sub>213</sub>, Trp<sub>134</sub>). Podobné závěry učinili i Faure a kol. (2005) ve své práci. Tito autoři používali stejný glykační model pouze s rozdílnými koncentracemi jednotlivých složek (BSA 20 mg/l, MGO 1 mg/ml). Literatura uvádí podobné výsledky ve sledování fluorescence tryptofanových

zbytků i v rozličných modelech glykace, např. při inkubaci BSA s glukosou (Bourdon a kol. 1999).

Největší snížení tvorby produktů pozdní glykace bylo zaznamenáno u 100  $\mu\text{M}$  kyseliny rozmarýnové a následně v pořadí u 100  $\mu\text{M}$  kyseliny ferulové, *o*-kumarové a *p*-kumarové. Kyselina *m*-kumarová a kávová (100  $\mu\text{M}$ ) způsobily pokles tvorby pentosidinu a to o 8% a 11% oproti glykované kontrole. U 100  $\mu\text{M}$  kyseliny sinapové a chlorogenové se projevil spíše mírný proglykační efekt. U nižších koncentrací HCAs se pozitivní účinek na glykaci objevil např. u 10  $\mu\text{M}$  kyseliny ferulové (inhibice tvorby pentosidinu).

Při sledování vývoje vnitřní fluorescence se projevil významný účinek MGO, který způsobil výrazné zhášení fluorescence tryptofanových zbytků. U HCAs jsem sledovala jejich schopnost tento účinek MGO pozastavit. Vyšší studované koncentrace HCAs (10 a 100  $\mu\text{M}$ ) způsobily naopak ještě větší pokles intenzity fluorescence tryptofanových zbytků než tomu bylo u vzorku obsahujícího BSA + MGO. Pouze u 1  $\mu\text{M}$  koncentrací všech HCAs byl pozorován mírnější pokles fluorescence oproti glykované molekule, což znamená, že pouze u této koncentrace by se dalo uvažovat o příznivém působení těchto látek. Ve vyšších koncentracích dochází k vazbě samotných HCAs na molekulu bílkoviny, což způsobuje zhášení tryptofanové fluorescence.

Další možností, jak sledovat vznik glykačních produktů a změny probíhající v konformaci bílkoviny, je **UV-VIS spektrofotometrie**.

Výsledky prezentuji u většiny derivátů kyseliny skořicové formou dvou grafů. V prvním grafu, kde je zaznamenáno celé spektrum bílkoviny v rozsahu vlnových délek 200 až 500 nm, sleduji vliv HCA na glykaci BSA methylglyoxalem po 7 dnech inkubace. Druhým grafem je rozdílové spektrum znázorňující vliv jednotlivých kyselin na vznik AGE produktů v tomtéž dni. Potenciální antiglykační efekt jednotlivých hydroxyskořicových kyselin byl hodnocen po odečtení hodnoty absorbance při vlnové délce 314 nm (oblast charakteristická pro AGEs). Z těchto hodnot jsem vypočítala procenta vzniku AGEs, která jsou zdokumentována formou souhrnné tabulky (tab. 9).

Absorpční spektrum molekuly BSA bylo po celou dobu inkubace stabilní, naproti tomu v absorpčním spektru glykované bílkoviny (BSA + MGO) jsem pozorovala přírůstek absorbance jak v oblasti 300 - 400 nm, tak v proteinové části molekuly BSA. Tento přírůstek absorbance se s délkou inkubace zvyšoval. Podobné změny absorpčního

spektra v proteinové části molekuly AST zaznamenala ve své diplomové práci Švehlová (2007).

Výsledky získané **měřením UV-spekter** se poněkud lišily od výsledků získaných při měření fluorescence AGEs produktů. Pozitivní účinky HCAs působení na průběh glykace byly potvrzeny pouze u 100  $\mu$ M kyseliny *m*-kumarové a *p*-kumarové. Kyselina kávová se překvapivě projevila jako látka s výrazným antiglykačním účinkem ve všech koncentracích ačkoliv při měření AGE produktů s fluorescenčními vlastnostmi se tento antiglykační účinek projevil v menší míře, a to pouze u nejvyšší studované koncentrace. Pozorovaný účinek kyseliny sinapové na absorpční spektrum glykovaného BSA je ve shodě s výsledky získanými při měření fluorescence. Tato látka měla proglykační účinek, který se výrazněji projevil zejména u vyšších koncentrací. Nejednotné výsledky stanovení můžeme sledovat například u 100  $\mu$ M kyseliny rozmarýnové, kde se oproti významnému antiglykačnímu efektu z fluorescenčního stanovení při hodnocení vlivu na glykaci pomocí absorpčních spekter tato kyselina chovala jako proglykační činidlo.

U všech kyselin bylo možné pozorovat ovlivnění absorpčního spektra nejen v oblasti glykačních produktů, ale i v oblasti aromatických aminokyselin. Tento jev si můžeme vysvětlit již dříve uvedenou vlastností HCAs, kterou je vazba těchto kyselin na molekulu BSA. Vazebnou afinitu HCAs k proteinové části bílkovinné molekuly prokázala ve svých experimentech i Švehlová (2007) a jako důkaz uváděla skutečnost, že absorpční spektra patřící samotné AST a AST s přídatkem HCA o určité koncentraci po odečtení hodnot absorbancí samotné HCA o téže koncentraci se lišily v oblasti vlnových délek od 250 do 280 nm, kde absorbují aromatické kyseliny.

Různými **elektroforetickými metodami** lze sledovat jednak tvorbu vysokomolekulárních agregátů vzniklých zesílením molekul proteinů vlivem glykačního činidla a AGE produktů (SDS-PAGE a immunoblotting) a také změny v náboji molekuly bílkoviny způsobené glykací (nativní PAGE). Výsledky jsou rozděleny po jednotlivých experimentech a jsou zdokumentovány na obrázcích naskenovaných na přístroji GelDoc XR. S ohledem na lepší přehlednost jsou některé výsledky dokumentovány formou tabulky popisující složení inkubačních směsí a příslušné hodnoty  $R_f$  (nativní PAGE).

V úvodních experimentech jsem se snažila optimalizovat podmínky elektroforetické separace. Ověřila jsem dílčí závěry z předchozích metod, např. modifikaci bílkoviny vlivem glykačního činidla a zvýšení hodnoty  $R_f$  s ohledem na ztrátu kladně nabitých

lysinových a argininových zbytků v molekule BSA. Jako nejvýhodnější podmínky separace u nativní PAGE se jevila koncentrace glykačního činidla 0,5 mM a množství nanášeného proteinu 8  $\mu\text{g}$  na jamku.

Zhodnocení potenciálního vlivu HCAs na glykaci BSA methylglyoxalem po čtrnáctidenní inkubaci pomocí nativní PAGE nepřineslo žádné statisticky významné výsledky. U některých kyselin došlo naopak ke zvýšení hodnoty  $R_f$  oproti glykované kontrole, což vypovídá spíše o proglykačním efektu těchto látek. Nejvýraznější zvýšení hodnoty  $R_f$  jsem zaznamenala u 100  $\mu\text{M}$  kyseliny sinapové a ferulové. Proglykační účinky 100  $\mu\text{M}$  kyseliny sinapové odpovídají závěrům z UV-VIS i fluorescenční spektroskopie.

Již po obarvení prvních gelů nativní PAGE jsem zaznamenala potíže při jejich vyhodnocování. Bandy byly rozmazané a detekce byla tudíž obtížná. Hlavní příčinou pravděpodobně byla přítomnost volných mastných kyselin a globulinů v komerčně dostupném preparátu BSA. Nejprve jsem se snažila o úpravu podmínek separace, ale po neúspěchu jsem se rozhodla pro změnu modelu glykace. Novým modelovým proteinem, který jsem používala pro další elektroforetické experimenty, byla aspartátaminotransferasa. Tento model glykace byl zvolen na základě předchozích experimentů, při kterých bylo ověřeno chování tohoto proteinu při elektroforetickém stanovení (Boušová a kol., submitted). Vliv HCAs na glykaci AST + MGO jsem sledovala pouze u 100  $\mu\text{M}$  koncentrace těchto látek s odkazem na výsledky předchozích použitých metod.

Výsledky s novým modelovým proteinem AST potvrdily závěry získané v modelu BSA + MGO pomocí nativní PAGE. Žádná ze studovaných kyselin nevykazovala antiglykační účinek a některé naopak zvýšily hodnotu  $R_f$  oproti glykované kontrole, což svědčí o jejich proglykační aktivitě. Obdobně jako u předešlého modelu glykace i tady jsem pozorovala nárůst hodnot  $R_f$  u 100  $\mu\text{M}$  kyseliny sinapové a ferulové.

Za denaturujících podmínek PAGE se v modelu glykace BSA + MGO potvrdila nevhodnost použitého preparátu BSA. Obarvené gely se nedaly vyhodnotit, protože bandy byly rozmazané a špatně detekovatelné. Z tohoto důvodu jsem pro další experimenty používala model AST + MGO. Na gelech obarvených stříbrem jsem zaznamenala vznik vysokomolekulárních agregátů s přibližnou molekulovou hmotností 120 kDa. Odpovídající band se nevyskytoval v inkubační směsi obsahující pouze AST. U žádné HCAs se neprojevil pozitivní antiglykační efekt. Naopak intenzita bandů



odpovídající AGE produktům se zvyšovala. Ve všech inkubačních směsích jsem pozorovala bandy s molekulovou hmotností kolem 42 kDa, které odpovídají monomeru AST, a také bandy s nižší molekulovou hmotností, které jsou pravděpodobně způsobené nečistotami přítomnými v komerčním preparátu AST.

Kromě barvení stříbrem následoval u některých gelů imunoblotting se specifickou protilátkou proti AGE produktům vzniklým působením MGO. V jamce obsahující čistou AST se neobjevil žádný band, což znamená, že v této inkubační směsi nejsou žádné produkty odvozené od MGO. Ve všech ostatních inkubačních směsích se projevila modifikace proteinu vlivem MGO, která se projevila vznikem pěti proužků s molekulovou hmotností 42, 55, 65, 70 a 120 kDa. V inkubační směsi obsahující kyselinu kávovou, rozmarýnovou, chlorogenovou a ferulovou se navíc objevil proužek s Mw 140 kDa, což znamená, že tyto látky podporují vznik vysokomolekulárních agregátů a tím projevují své proglykační účinky.

Ze studií zabývajících se antioxidačním účinkem HCAs vyplývá jeho závislost na počtu a pozici hydroxylových skupin v molekule těchto kyselin. Nejmenší antioxidační efekt mají monosubstituované deriváty kyseliny skořicové (kumarové kyseliny). Pro tento účinek je nejpodstatnější hydroxylová skupina v *para*-poloze na benzenovém jádře. Další substituce OH-skupinou antioxidační vlastnosti látky zvyšuje (kyselina kávová, chlorogenová a rozmarýnová). Antioxidační potenciál stejně jako stabilita naopak klesá s methylací těchto OH-skupin (kyselina sinapová a ferulová) (Rice-Evans a kol. 1996, Natella a kol. 1999, Chen a Ho 1997, Pannala a kol. 1998). U experimentů s antiglykační aktivitou těchto látek jsem zjistila opačnou závislost. Čím více hydroxylových skupin nebo dalších substituentů molekula HCA obsahovala, tím větší proglykační účinek většinou látka projevovala.

Získané výsledky neprokázaly statisticky významný pozitivní účinek na neenzymovou glykaci u žádné ze zkoumaných HCAs ani v jednom z použitých modelů glykace. Z výsledků jsou patrné nejednoznačné účinky hydroxyskořicových kyselin jako látek, které by mohly mít vliv na glykaci proteinových molekul reaktivním  $\alpha$ -dikarbonylem (MGO). Všechny dílčí pozitivní účinky těchto kyselin mohou být zastřeny jejich vazbou na samotnou molekulu bílkoviny a také nestabilitou těchto kyselin. Většina statisticky významných účinků byla vyhodnocena u HCAs v nejvyšší testované koncentraci. Takové koncentrace jsou za fyziologických podmínek při

běžném stravování v lidském organismu nedosažitelné. Nejvyšší dokumentované plazmatické hladiny těchto kyselin se pohybují v řádech jednotek  $\mu\text{mol/l}$  (Janebová a kol. 1999, Slanina a Táborská 2004).

## 7. ZÁVĚR

- 1) Methylglyoxal způsobil pokles vnitřní fluorescence BSA v průběhu inkubace, což naznačuje, že došlo ke změně prostorového uspořádání molekuly proteinu. Na absorpčních spektrech byl patrný posun maxim aromatických aminokyselin k vyšším vlnovým délkám během inkubace. Methylglyoxal také způsobil čtyřicetisedminásobný nárůst nespecifických AGEs a sedmnáctinásobné zvýšení pentosidinu při měření fluorescence po 7 dnech inkubace. Vznik glykačních produktů byl pozorován i v rozdílových UV-spektrech. Glykační produkty měly v absorpčních spektrech maximum při vlnové délce 314 nm.
- 2) Při optimalizaci podmínek elektroforetické separace glykovaného BSA jsem našla následující optimální podmínky:
  - a) pro nativní PAGE: koncentrace glykačního činidla 0,5 mM, koncentrace rozdělovacího gelu 7,5% a nanášené množství bílkoviny 8 µg na jamku.
  - b) pro SDS-PAGE: koncentrace glykačního činidla 0,5 mM, koncentrace rozdělovacího gelu 7,5% a nanášené množství bílkoviny 4 µg na jamku.
- 3) Účinky jednotlivých HCAs se mezi sebou liší a jsou závislé na použité koncentraci. Zatímco 100 µM kyselina *o*-kumarová vykazovala statisticky významné snížení tvorby pentosidinu o 20% ( $p < 0,01$ ) a tvorbu AGE produktů o 25%, tak 100 µM kyselina chlorogenová tvorbu AGEs ještě významně zvýšila a to o 53% ve srovnání s glykovanou kontrolou.
- 4) Z výsledků UV-spekter lze říci, že kyselinou s největším pozitivním účinkem na glykaci byla kyselina kávová a to ve všech testovaných koncentracích, zatímco 100 µM kyselina sinapová a chlorogenová ještě zvyšovaly vznik glykačních produktů.
- 5) Studované kyseliny neprojevily při nativní PAGE žádné pozitivní antiglykační účinky. Hodnoty Rf u kyseliny ferulové a sinapové byly ještě vyšší než hodnoty Rf u glykované kontroly. Z důvodu nevhodnosti použitého komerčně dostupného

preparátu BSA se nepodařilo vyhodnit gely z SDS-PAGE, a proto jsem pro další elektroforetické experimenty používala jako modelovou bílkovinu AST.

- 6) Experimenty s AST jako modelovým proteinem pro elektroforetickou separaci potvrdily výše zmíněné závěry z nativní PAGE u BSA. Hydroxyskořicové kyseliny neprojevily žádný antiglykační účinek a některé z nich glykaci prohlubovaly. A to zejména vícesubstituované deriváty. U pokusů s SDS-PAGE a imunoblottingem jsem pozorovala vznik vysokomolekulárních agregátů (120 kDa) ve všech směsích obsahujících MGO nebo MGO s HCA. V inkubačních směsích obsahujících 100  $\mu$ M kyselinu kávovou, chlorogenovou, rozmarýnovou a ferulovou jsem pozorovala vznik dalších AGE produktů s vyšší molekulovou hmotností (140 kDa) než tomu bylo u glykované kontroly.
  
- 7) Čím více substituentů studovaná látka ve své molekule obsahovala, tím výraznější proglykační účinky projevovала. Pozorovaná závislost je v rozporu s antioxidačními vlastnostmi těchto látek publikovanými v literatuře.

## **8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK**

3-DG	3-deoxyglukoson
AA	akrylamid
Ab-AP	sekundární protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatase
Ap-pufr	alkalická fosfatasa (pufr)
ALEs	produkty pozdní oxidace lipidů (advanced lipoxidation end-products)
AGE R1-R3	receptory R1-R3 pro AGE
AGEs	produkty pozdní glykace (advanced glycation end-products)
Anti-MGO	primární protilátka proti AGEs vzniklých působením MGO
APS	peroxodisíran amonný
AOPP	produkty pokročilé oxidace proteinů (advanced oxidation protein products)
AST	aspartátaminotransferasa
AU	arbitrary unit
BFB	bromfenolová modř
bisAA	bis-akrylamid
BSA	bovinní sérový albumin
BSA <sub>G100</sub>	BSA modifikovaný 100 mM glukosou
BSA <sub>G25</sub>	BSA modifikovaný 25 mM glukosou
CA	kyselina kávová
CEL	N <sup>ε</sup> -karboxyethyllysin
CME	karboxymethylethanolamin
CML	N <sup>ε</sup> -karboxymethyllysin
CoQ <sub>10</sub>	koenzym Q10
DHAP	dihydroxyacetonfosfát
DNTB	5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina)
DOLD	3-deoxyglukosone-derived lysine dimer
EIA	Enzyme Immuno Essay
ELFO	elektroforesa
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Essay
FA	kyselina ferulová

GAP	glyceraldehyd-3-fosfát
GO	glyoxal
GO-AGEs	glykační produkty odvozené od glyoxalu
GO-BSA	BSA modifikované glyoxalem
GODIC	glyoxal-derived imidazoline cross-link
GOLD	glyoxal-derived lysine dimer
GSH	glutathion (redukovaná forma)
GSSG	glutathion (oxidovaná forma)
GXL I	glyoxalasa I
GXL II	glyoxalasa II
HCA	hydroxyskořicová kyselina (hydroxycinnamic acid)
HCAs	hydroxyskořicové kyseliny (hydroxycinnamic acids)
HbA <sub>1c</sub>	glykovaný hemoglobin
HeLa buňky	imortalizované buňky karcinomu děložního hrdla získané od pacientky Helen Lane
HMW	vysokomolekulární agregáty (high molecular weight)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
HPLC-MS/MS	HPLC s hmotnostní detekcí
HSA	lidský sérový albumin (human serum albumin)
CHA	kyselina chlorogenová
IL-1 $\alpha$ , 6	interleukiny
ICAM-1	intracelulární adhezivní molekula (intercellular adhesion molecule-1)
IgG	imunoglobulin G
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě (low density lipoproteins)
LMW	nízkomolekulární látky (low molecular weight)
Lys	Lysin
mK	kyselina m-kumarová
MGO	methylglyoxal
MGO-BSA	BSA glykovaný methylglyoxalem
MOLD	methylglyoxal-derived lysine dimer
MODIC	methylglyoxal-derived imidazoline cross-link
MSR I, II	makrofágový scavengerový receptor typu I, II
Mw	molekulová hmotnost (molecular weight)

NADH	nikotinamidadeninucleotid (redukovaná forma)
NF- $\kappa$ B	nukleární faktor $\kappa$ B
oK	kyselina o-kumarová
pK	kyselina p-kumarová
PAGE	elektroforeza v polyakrylamidovém gelu (polyacrylamid gel electrophoresis)
PEG	polyethylenglykol
PDGF	platelet derived growth factor
PBS	“phosphate buffered saline“ (fyziologický roztok fosfátového pufru)
PEG	polyethylenglykol
PVDF	polyvinylidenfluorid
RA	kyselina rozmarýnová
RAGE	receptor pro produkty pozdní glykace (receptor of advanced glycation end-products)
Rf	poměrná mobilita (vzdálenost vzorku od startu/vzdálenost od startu k čelu; relative front)
RNS	reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
RONs	reaktivní formy kyslíku a dusíku (reactive oxygen and nitrogen species)
R-S-TNB <sup>-</sup>	smíšený disulfid vznikající reakcí DTNB s thiolovou skupinou proteinu
SA	kyselina sinapová
SDS	laurylsíran sodný (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
S.D.	směrodatná odchylka
TBS	TRISOvý pufr (TRIS buffered saline)
TBST	TRISOvý pufr obsahující Tween-20
TEMED	N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin
TNB <sup>2-</sup>	5-thio-2-nitrobenzoová kyselina
TNF $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$
Tris-HCl	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan hydrochlorid
Trp	tryptofan
VCAM-1	cévní buněčná adhezivní molekula (vascular cell adhesion molekule 1)
QA	kyselina chinová

## **9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

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

**Ahmed N, et al. (2002)** Assay of advanced glycation end products (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to N $\epsilon$ -carboxymethyl-lysine- and N $\epsilon$ -(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. *Biochem J.* 364: 1-14

**Ahmed N, Thornalley PJ (2003)** Quantitative screening of protein biomarkers of early glycation, advanced glycation, oxidation and nitrosation in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry multiple reaction monitoring. *Bioch Soc Trans.* 31(6): 1417-1422

**Bacilková (2008)** *Vliv látek s antioxidačními vlastnostmi na glykaci aspartátaminotransferasy.* Diplomová práce

**Beneš L (2008)** Antioxidancia. *Prakt lékáren.* 4(4): 183-185

**Beránek M, Dršata J, Palička V (2001)** Inhibitory effect of glycation on catalytic of activity of alanine aminotransferase. *Mol Cell Biochem.* 218(1-2): 35-39

**Beránek M, Palička V (1998)** Farmakologický význam glykací plazmatických proteinů. *Čes a Sloven Farm.* 47(5): 211-214

**Bohlender JM, et al. (2005)** Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 289: 645-659

**Bourajjaj M, et al. (2003)** Role of methylglyoxal adducts in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *Biochem Soc Trans.* 31(6): 1400-1402



**Bourdon E, Loreau N, Blache D (1999)** Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. *FASEB J.* 13: 233-244

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

**Boušová I, Bacílková E, Dobrijević S, Dršata J (2009)** *Non-enzymatic glycation of aspartate aminotransferase by methylglyoxal, effect of hydroxycitric and uric acid.* submitted.

**Burr ML (1995)** Explaining the French paradox. *J R Soc Health.* 115(4): 217-219

**Chen JH, Ho CT (1997)** Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related hydroxycinnamic Acids Compounds. *J Agric Food Chem.* 45(7): 2374-2378

**Coussons PJ, et al. (1997)** Glucose modification of human serum albumin: a structural study. *Free Radic Biol Med.* 22(7): 1217-1227

**Dewick PM (2002)** *Medicinal natural products, a biosynthetic approach.* 2. vyd. Chichester. Velká Británie: John Wiley and Sons Ltd. 507 s.

**Dyer DG, et al. (1991)** Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose. Identification of glucose and other carbohydrates as possible precursors of pentosidine in vivo. *J Biol Chem.* 266(18): 11654-60.

**Dolhofer-Bliesener R, et al. (1995)** Immunological determination of advanced glycosylation end-products in human blood and urine. *Nephrol Dial Transplant.* 10: 657-664

**Faure P, et al. (2005)** Albumin antioxidant capacity is modified by methylglyoxal. *Diabetes Metab.* 31(2): 169-177

**Hammes HP, et al. (1999)** Diabetic retinopathy risk correlates with intracellular concentrations of the glycooxidation product N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl) lysine independently of glycohaemoglobin concentrations. *Diabetologia*. 42(5): 603-607

**Haslam E (1995)** Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J Nat Prod*. 59(2): 205-215

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

**Jakuš V (2003)** Úloha neenzymové glykácie a glykooxidácie v rozvoji diabetických a vaskulárných komplikácií. *Čs Fyziol*. 52(2): 51-65

**Jandera P (1999)** *Atomová a molekulová spektroskopie se zaměřením na stopovou analýzu kontaminantů. Díl B – Molekulová spektroskopie v organické analýze*. 1. vyd. Pardubice. Česká Republika: Univerzita Pardubice. 288 s.

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

**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. 233 s.

**King GL, Brownlee M (1996)** The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 25(2): 255-270

**Klenk DC, et al. (1982)** Determination of Glycosylated Hemoglobin by Affinity Chromatography: Comparison with Colometric and Ion-Exchange Methods, and Effects of Common Interferences. *Clin Chem*. 28(10): 2088-2094

**Komrsková D (2006)** *Antioxidační mechanismy v prevenci oxidačního poškození*. Disertační práce

**Lakowicz JR (2004)** *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2. vyd. New York. USA: Springer Inc. 698 s.

**Lyons TJ, et al. (1991)** Decrease in skin collagen glycation with improved glycemic control in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 87(6): 1910-1915.

**Meade, et al. (2003)** The role of Dicarbonyl Compounds in non-enzymatic Crosslinking A structure-Activity Study. *Bioorg Med Chem*. 11(6): 853-62

**Monnier VM, Cerami A (1981)** Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins. *Science*. 211(4481): 491-493

**Natella F, et al. (1999)** Benzoic and Cinnamic Acid Derivates as Antioxidants: Structure-Activity Relation. *J Agric Food Chem*. 47(4): 1453-1459

**Njoroge FG, Monnier VM (1989)** The chemistry of the Maillard reaction under physiological conditions: a review. *Prog Clin Biol Res*. 304: 85-107.

**Obšil T, Pavlíček Z (1997)** Glykace proteinů a fosfolipidů: Maillardova reakce in vivo. *Chem listy*. 91: 558-569.

**Odani H, et al. (1996)** First evidence for accumulation of protein-bound and protein-free pyrroline in human uremic plasma by mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun*. 224(1): 237-241

**Oya T, et al. (1998)** A novel biomarker for hyperglycemia, MRX isolated from hydrolysate of glycated proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 246: 267-271

**Pannala AS, et al. (1998)** Inhibition of peroxynitrite dependent tyrosine nitration by hydroxycinnamates: nitration or electron donation? *Free Radic Med*. 24(4): 594-606

**Peters T (1996)** *All about albumin: biochemistry, genetics and medical application*. 1. vyd. San Diego. USA: Academic Press. 432 s.

**Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM (2006)** Methylglyoxal Comes of AGE. *Cell*. 124:258-260.

**Rendell M, et al. (1985)** Use of aminophenylboronic acid affinity chromatography to measure glycosylated albumin levels. *J Lab Clin Med*. 105 (1): 63-9

**Requena JR, et al. (1997)** Carboxymethylethanolamine, a biomarker of phospholipid modification during the maillard reaction in vivo. *J Biol Chem*. 272(28): 17473-17479.

**Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996)** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. 20: 933-56

**Riener CK, Kada G, Gruber HJ (2002)** Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal Bioanal Chem*. 373(4-5). s. 266-76.

**Rumlová M, Pačes V, Ruml T (2003):** *Základní metody genového inženýrství*, 1.vyd. VŠCHT Praha: JMP Tisk s.r.o. s. 55

**Sady C, et al. (2000)** Maillard reactions by  $\alpha$ -oxoaldehydes: detection of glyoxal-modified proteins. *Biochem Biophys Acta*. 1481: 255-264

**Sano H, et al. (1999)** Receptors for proteins modified by advanced glycation endproducts (AGE) – their functional role in atherosclerosis. *Mech Ageing Dev*. 107(3): 333-346.

**Schalkwijk CG, Stehouwer CD, van Hinsbergh VW (2004)** Fructose-mediated nonenzymatic glycation: sweet coupling or bad modification. *Diabetes Metab Res Rev*. 20(5): 369-382

**Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG (1997)** Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest*. 99(3): 457-468

**Sell DR a Monnier VM (1989)** Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. *J Biol Chem.* 264(36): 21579-21602

**Shibayama R, et al. (1999)** Autoantibody Against N<sup>ε</sup>-(Carboxymethyl)lysine: An Advanced Glycation End Product of the Maillard reaction. *Diabetes.* 48(9): 1842-1848

**Shinohara M, et al. (1998)** Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. *J Clin Invest.* 101(5): 1142-1147

**Singh R, et al. (2001)** Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia.* 44(2): 129-146.

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

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

**Škottová N, et al. (2004)** Phenolics-rich extracts from *Silybum marianum* and *Prunella vulgaris* reduce a high-sucrose diet induced oxidative stress in hereditary hypertriglyceridemic rats. *Pharmacol Res.* 50(2): 123-130.

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

**Švehlová K (2007)** *Účinky antioxidantů přírodního původu v modelu glykace proteinů.* Diplomová práce

**Takahashi M, et al. (1995)** Direct measurement of crosslinks, pyridinoline, deoxypyridinoline, and pentosidine, in the hydrolysate of tissues using high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 232(2): 158-162.

**Trnková L, et al. (2008)** Antioxidants and environmental stress: Spectroscopic study on stability of natural compounds and their interaction with a molecule of protein in vitro model. *Sborník abstraktů Ecopole 2008*, s. 308.

**Vlassara H (1997)** Recent progress in advanced glycation end products and diabetic complications. *Diabetes*. 46: 19-25

**Vlassara H, Brownlee M, Cerami A (1985)** High-affinity-receptor-mediated uptake and degradation of glucose-modified proteins: a potential mechanism for the removal of senescent macromolecules. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82(17): 5588-5592

**Vostrý M (2006)** *Vliv methylglyoxalu na spektrální vlastnosti glutamátdehydrogenasy*. Rigorózní práce

**Weber J, Kayser A, Rinas U (2005)** Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* in glucose-limited continuous culture. II. Dynamic response to famine and feast, activation of the methylglyoxal pathway and oscillatory behaviour. *Mikrobiology*. 151(Pt 3): 707–716.

**Westermeier R (2005)** *Electrophoresis in practice*. 4.vyd. Weinheim Německo: Wiley-VCH. s. 406

**Wu CH, Yen GC (2005)** Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. *J Agric Food Chem*. 53: 3167-3173

Sorbenty Iontosorb [online]. C1999. poslední revize 1. 1. 2008 [citováno 6. 1. 2009]. Dostupné z: [http://www.iontosorb.cz/cz/afi\\_chro.htm](http://www.iontosorb.cz/cz/afi_chro.htm)

Internetová strana Warwick Medical School:  
<http://www2.warwick.ac.uk/fac/med/research/csri/proteindamage/physiology/diabetes/slides4.jpg>