

Grupa.....

Wrocław,

Imię i nazwisko studenta:

Imię i nazwisko prowadzącego:

.....

.....

Ćwiczenie nr 6.

Ocena wybranych parametrów metabolicznych komórki. Stres oksydacyjny.

Zadanie 1. Ocena peroksydacji lipidów na podstawie pomiaru dwualdehydu malonowego (MDA) w osoczu

Patologiczne implikacje reakcji reaktywnych form tlenu (RFT) i stresu oksydacyjnego prowadzą do podwyższenia stężeń produktów peroksydacji lipidów oraz zmian aktywności enzymów chroniących przed RFT i stężeń niskocząsteczkowych antyoksydantów.

Najbardziej znanym biologicznym procesem wolnorodnikowym jest peroksydacja lipidów, w której dochodzi do utleniania i degradacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych zawartych w lipidach błonowych, co w konsekwencji prowadzi do uszkodzenia komórki. Peroksydacja lipidów jest procesem lawinowym, zapewniającym ciągłą dostawę wolnych rodników, które inicjują następne reakcje peroksydacji. W wyniku procesu peroksydacji lipidów powstają krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, alkohole, cykliczne endonadtlenki oraz aldehydy, w tym dwualdehyd malonowy (*malondialdehyde*- MDA) uważany za wskaźnik procesu peroksydacji lipidów. Produkty reakcji MDA z kwasem tiobarbiturowym (*thiobarbituric acid*- TBA) określa się jako produkty TBA-reaktywne i uważa za markery nieenzymatyczne procesu peroksydacji lipidów. Duże zainteresowanie wzbudza także ostatnio inny aldehyd- 4- hydroksynonenal (4-HNE), którego poziom może świadczyć o zaawansowaniu choroby Alzheimera. Innym nieenzymatycznym markerem antyoksydacyjnym jest całkowity potencjał antyoksydacyjny (*Total antioxidant status*- TSA), który odzwierciedla całkowitą pojemność bariery antyoksydacyjnej danej komórki, tkanki czy narządu. Na wartość TAS zasadniczy wpływ mają enzymy antyoksydacyjne, jak również stężenia niskocząsteczkowych antyoksydantów. Wydaje się, że wartość tego parametru może być miarą równowagi prooksydacyjno- antyoksydacyjnej organizmu, wskaźnikiem wyczerpania rezerw antyoksydacyjnych w wyniku wysiłku czy w przebiegu chorób oraz wskazaniem do spożywania większej ilości witamin antyoksydacyjnych.

Zasada oznaczania: reakcja z kwasem tiobarbiturowym

Metoda oznaczania peroksydacji lipidów opiera się na reakcji aldehydu malonowego (MDA) z kwasem tiobarbiturowym (TBA). Podstawą jest powstawanie barwnego adduktu w reakcji pomiędzy

TBA i niektórymi produktami peroksydacji lipidów w kwaśnym środowisku i w podwyższonej temperaturze.

Powstający addukt ma różowe zabarwienie, a jego stężenie oznacza się spektrofotometrycznie.

Material:

Osocze krwi, homogenat tkanki

Odczynniki:

- A) 15% (m/v) roztwór kwasu trichlorooctowego (TCA) w 0,25 molowym roztworze HCl
- B) 0,37% (m/v) roztwór kwasu tiobarbiturowego (TBA) w 0,25 molowym roztworze HCl

Wykonanie:

- 1) Przygotowujemy próby w probówkach typu eppendorf wg tabeli

	Próba ślepa	Próba badana prawidłowa	Próba badana patologiczna
Odczynnik A	500μl	500μl	500μl
Odczynnik B	500μl	500μl	500μl
H ₂ O	500μl	-	-
Osocze/material biologiczny	-	500μl	500μl

- 2) Po wymieszaniu zamykamy probówki i ogrzewamy zawartość probówki w temperaturze 100°C (termoblok) przez 20 minut (w celu umieszczenia ich w termobloku oraz ich wyjęcia używamy pęsety).

UWAGA: PRZED INKUBACJĄ WIECZKO PROBÓWKI PROWADZĄCY PRZEKŁUWA SKALPELEM!

- 3) Po ochłodzeniu zawartość prób przenosimy do czystych probówek typu eppendorf i wirujemy przez 5 minut w mini wirówce (1500xg)
- 4) Po zwirowaniu mierzymy absorbancję supernatantu przy dł. fali 535 nm względem próby ślepej

Obliczenia:

Obliczamy stężenia dwualdehydu malonowego (MDA) w badanym preparacie na podstawie milimolowego współczynnika absorpcji $\epsilon=156 \text{ mmol}^{-1} \cdot 1 \cdot \text{cm}^{-1}$. Wynik podajemy w $\mu\text{mol/l}$.