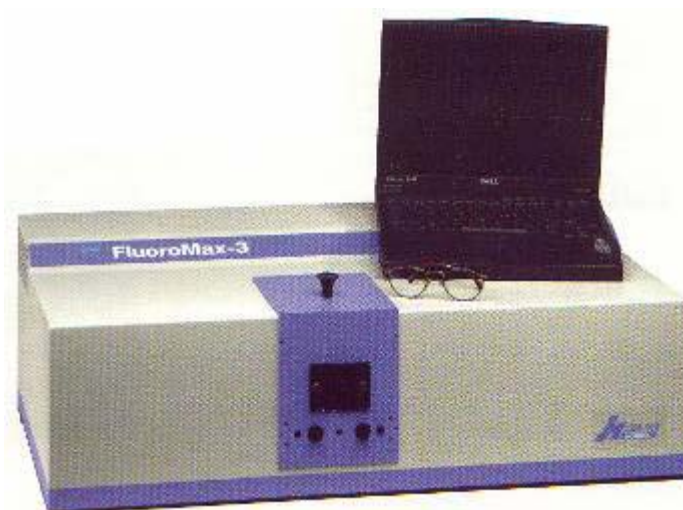


3. Experimenty

V této kapitole jsou uvedeny protokoly vybraných experimentů využívajících fluorescenční spektroskopii. Kromě vlastního fluorescenčního měření jsou popsány i některé další metody související s popisovaným experimentem (především přípravou vzorků a zpracováním výsledků). Všechna měření lze provést na běžném spektrofluorimetru vybaveném polarizačním zařízením, ale předpokládají znalost základních biochemických a biofyzikálních postupů. Prezentované výsledky byly získány na spektrofluorimetru FluoroMax-3 (Jobin Yvon, Horiba) s programovým vybavením DATAMAX a GRAMS/32.



Nehledě na typ fluorimetru, je pro citlivost a přesnost měření důležitá čistota fluorimetrických kyvet. Pro skleněné a křemenné kyvety je doporučen tento způsob mytí:

1. ponechat alespoň 24 hod namočené v kyselině chromsírové
2. omýt deionizovanou vodou
3. namočit na 5 hodin (ne déle!!!) do čistícího roztoku (20 tablet KOH/100 ml metanolu)
4. omýt deionizovanou vodou
5. namočit do koncentrované kyseliny dusičné až do použití, před nímž se kyvety vypláchnou deionizovanou vodou

3.1. Polarita rozpouštědla

V tomto demonstračním experimentu je ukázán vliv polarity rozpouštědla na fluorescenci sondy kyseliny 6-(p-toluidino)-2-naftalénsulfonové (TNS) rozpuštěné ve stejné koncentraci v roztocích obsahujících různé procento etanolu.

Vlastnosti fluorescenční sondy kyseliny 6-(p-toluidino)-2-naftalénsulfonové (TNS):

- MW = 313,88
- rozpouštědlo pro zásobní roztok: dimethylformamid (DMF)
- rozpouštědlo pro spektroskopická měření: metanol (MeOH)
- dlouhovlnné absorpční maximum v metanolu: $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 318 \text{ nm}$ (molární extinkční koeficient: $26000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)
- fluorescenční emisní maximum v metanolu: $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 443 \text{ nm}$
- kvantový výtěžek fluorescence je závislý na okolním prostředí a je zvláště citlivý na přítomnost vody; emise je závislá na rozpouštědle

Materiál:

- kyselina 6-(p-toluidino)-2-naftalénsulfonová (TNS, Fluka)
- etanol pro UV spektroskopii (Lachema)
- destilovaná voda
- skleněné zkumavky
- mikropipety

Postup:

1. Připravte zásobní roztok TNS: odvažte cca 3 mg TNS a rozpust'te nejprve v 96% etanolu a poté upravte na koncentraci 2 mmol/l v 80% etanolu.
2. Připravte vzorky dle Tabulky 3.1, tak aby výsledná koncentrace TNS byla 5 $\mu\text{mol/l}$.
3. Změřte excitační spektra vzorků při $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$
4. Změřte emisní spektra vzorků při $\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$

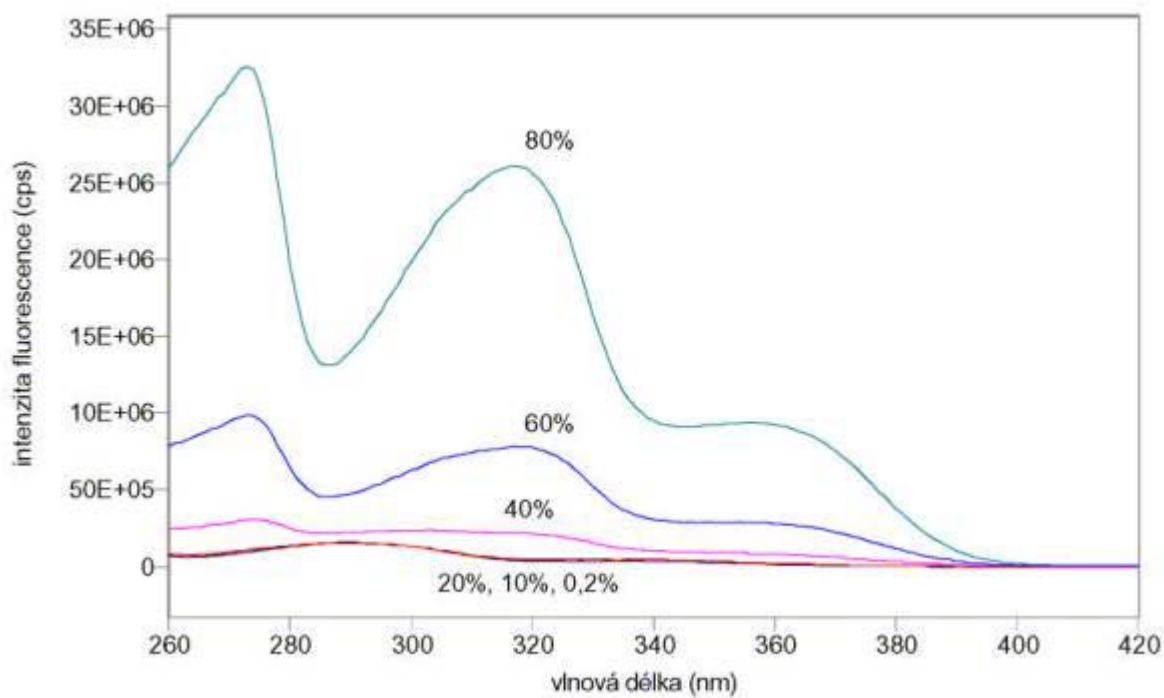
Tabulka 3.1

č. vzorku	dest. voda (μl)	etanol (80%) (μl)	TNS (2 mmol/l) (μl)	výsledné % etanolu
1	3990	0	10	0,2
2	3500	490	10	10
3	3000	990	10	20
4	2000	1990	10	40
5	1000	2990	10	60
6	0	3990	10	80

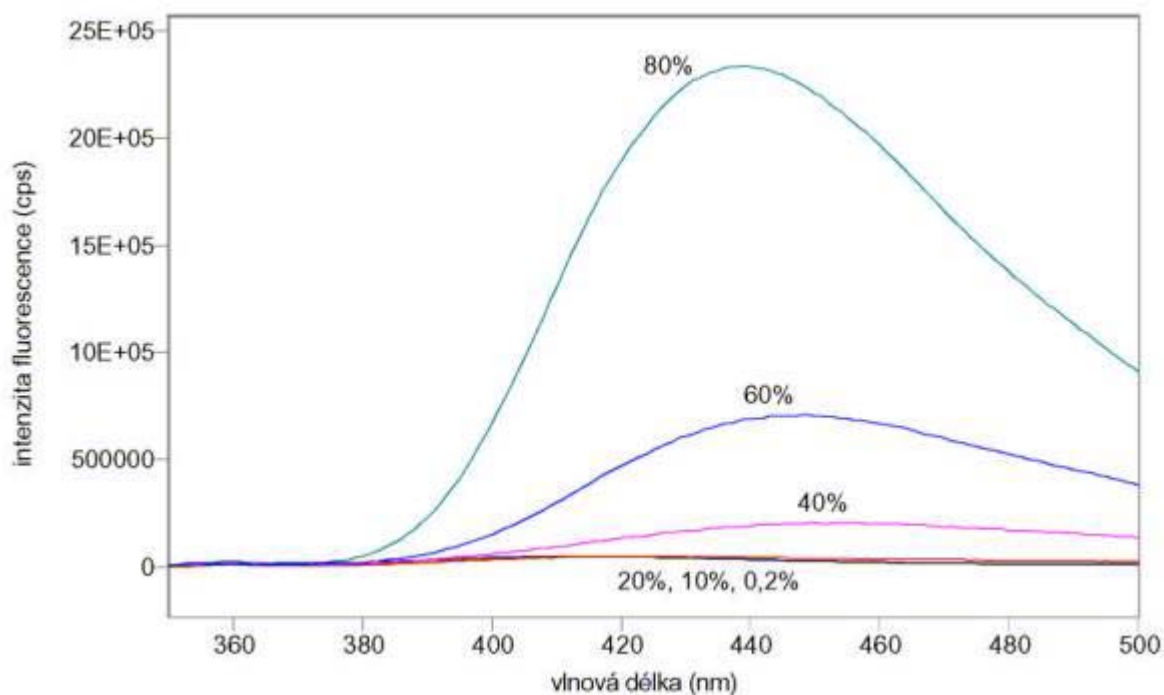
Výsledky:

Změřená excitační a emisní spektra sondy TNS jsou na obr. 3.1 a 3.2. Měření byla provedena na spektrofluorimetru FluoroMax-3.

Obr. 3.1 Excitační spektra TNS ($\lambda_{em} = 440 \text{ nm}$) v roztocích obsahujících 0,2 – 80% etanolu.



Obr. 3.2 Emisní spektra TNS ($\lambda_{ex} = 320 \text{ nm}$) v roztocích obsahujících 0,2 – 80% etanolu.



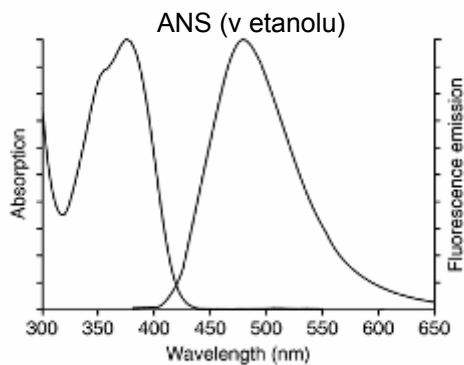
3.2. Vazba sond na bílkoviny

V tomto demonstračním experimentu je ukázán vliv vazby sondy ANS na albumin na její fluorescenci a zhášení fluorescence jódem.

Vlastnosti fluorescenční sondy 1-anilinonaftalén-8-sulfonátu sodného (ANS):

- MW = 321,33
- rozpouštědlo pro zásobní roztok: dimethylformamid (DMF)
- rozpouštědlo pro spektroskopická měření: metanol (MeOH)
- dlouhovlnné absorpční maximum v metanolu: $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 372 \text{ nm}$ (molární extinkční koeficient: $7800 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)
- fluorescenční emisní maximum v metanolu: $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 480 \text{ nm}$
- kvantový výtěžek fluorescence je závislý na okolním prostředí a je zvláště citlivý na přítomnost vody; emise je závislá na rozpouštědle
- podrobný popis vlastností ANS lze nalézt v práci [Slavík J.: Anilinonaphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function. *Biochim. Biophys. Acta* 694, 1-25 (1982)]

Obr. 3.3 Fluorescenční spektra sondy ANS v etanolu



(Podle: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.)

Material:

- 1-anilinonaftalén-8-sulfonát sodný (ANS, ICN Pharmaceuticals)
- lidský albumin (MW = 69000)
- jodid draselný (MW = 166,00)
- skleněné zkumavky
- mikropipety
- pufr A (120 mmol/l NaCl, 10 mmol/l KCl, 30 mmol/l Tris HCl, pH 7,4)

Postup:

1. Připravte zásobní roztoky 2,5 mmol/l ANS, 0,25 mmol/l albuminu a 5 mol/l KJ.
2. Připravte vzorky dle Tabulky 3.2, tak aby výsledné koncentrace ANS a albuminu byly 5 $\mu\text{mol/l}$ a výsledné koncentrace KJ 20 až 100 mmol/l
3. Změřte excitační a spektra vzorků při $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$
4. Změřte emisní spektra vzorků při $\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$

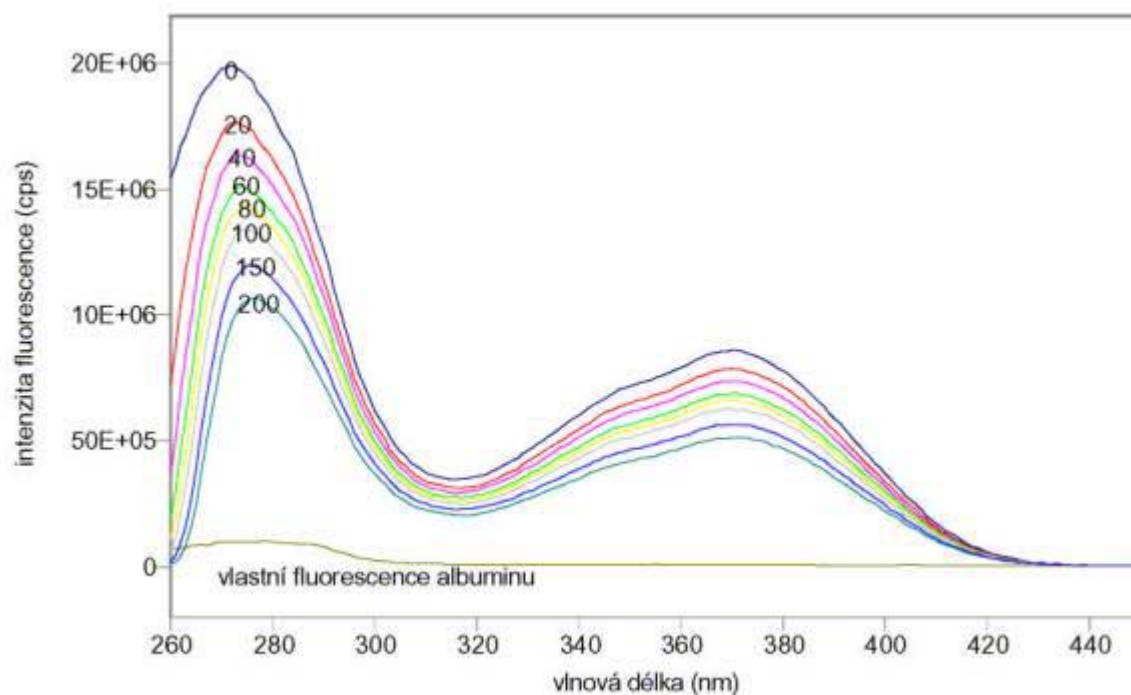
Tabulka 3.2

č. vzorku	pufř A (μl)	albumin (μl)	ANS (μl)	KJ (μl)	výsledná koncentrace KJ (mmol/l)
0	4900	100	0	0	0 (vlastní fluorescence albuminu)
1	4890	100	10	0	0
2	4870	100	10	20	20
3	4850	100	10	40	40
4	4830	100	10	60	60
5	4810	100	10	80	80
6	4790	100	10	100	100
7	4740	100	10	150	150
8	4690	100	10	200	200

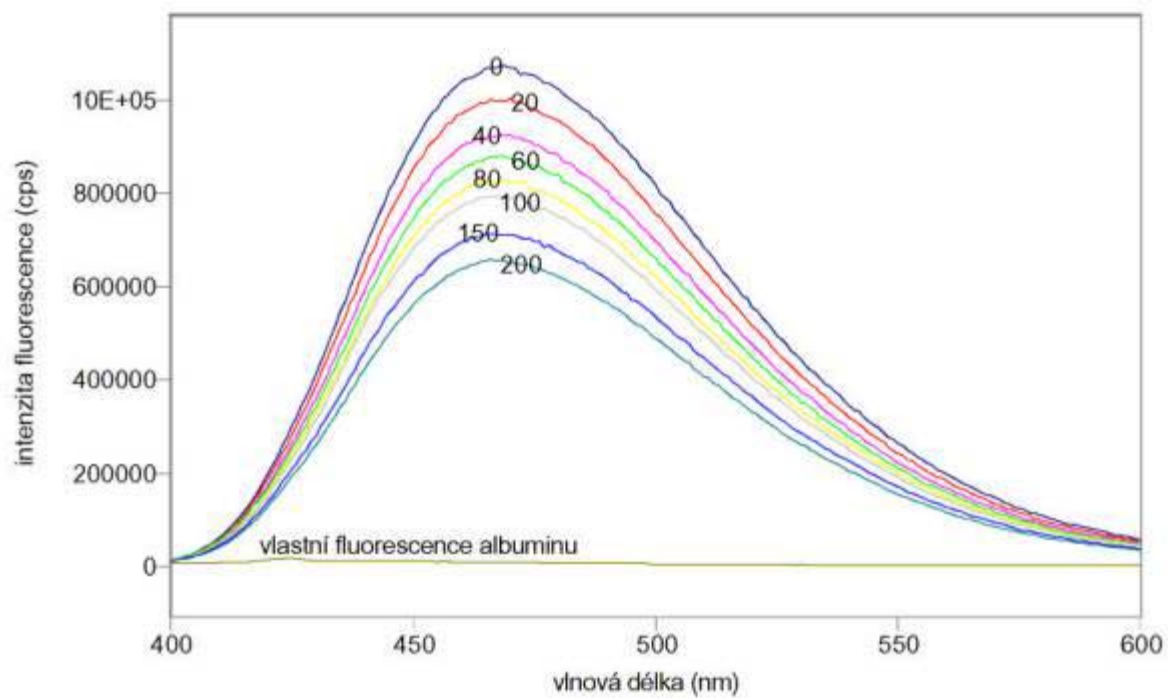
Výsledky:

Změřená excitační a emisní spektra sondy ANS vázané k albuminu v přítomnosti různých koncentrací jodidu draselného jako zhášedla jsou na obr. 3.4 a 3.5. Měření byla provedena na spektrofluorimetru FluoroMax-3.

Obr. 3.4 Excitační spektra ANS ($\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$) vázaného na albumin v roztocích obsahujících 0 – 200 mmol/l jodidu draselného.



Obr. 3.5 Emisní spektra ANS ($\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$) vázaného na albumin v roztocích obsahujících 0 – 200 mmol/l jodidu draselného.



3.3. Dynamický stav lipidových membrán

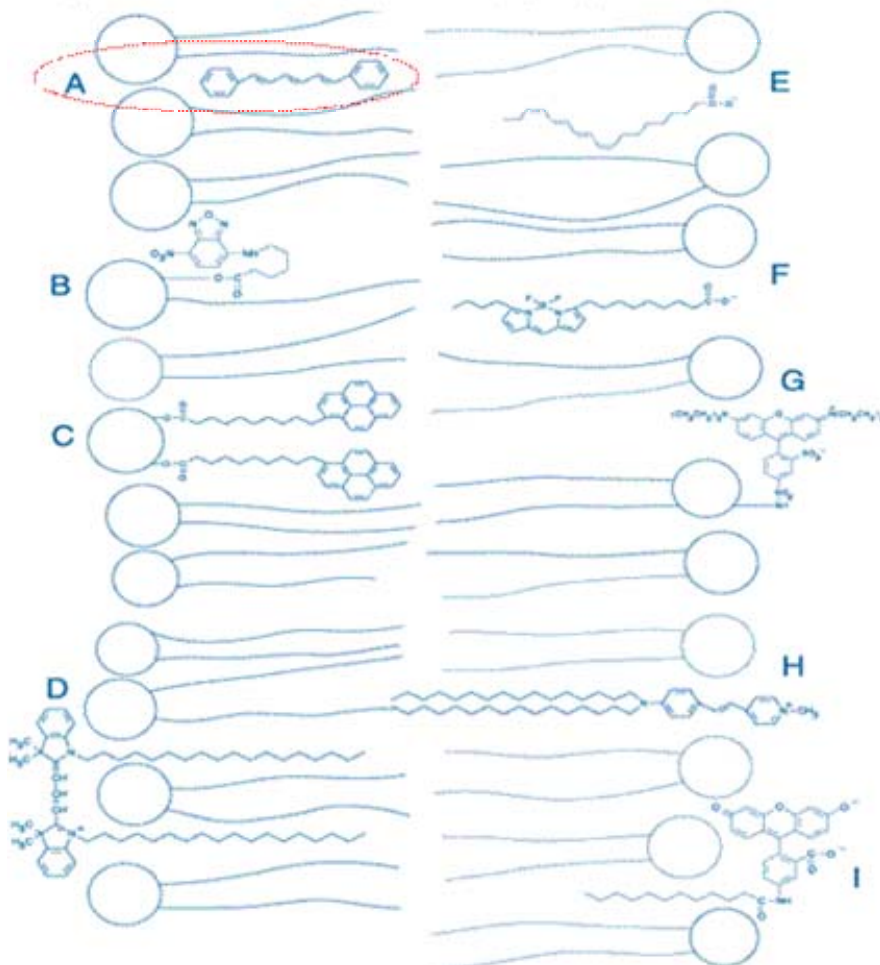
V tomto experimentu jsou ukázány možnosti měření polarizované fluorescence v ustáleném stavu (tj. při kontinuálním buzení). Jsou testovány možnosti fluorescenční membránové sondy 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrienu (DPH) pro stanovení změn dynamického stavu lipidových dvojvrstev. Měření je provedeno jednak v modelových membránách, liposomech, jednak v erytrocytárních membránách. Je proto uveden také postup přípravy velkých jednovrstevných liposomů a erytrocytárních ghostů.

Vlastnosti fluorescenční sondy 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrienu (DPH):

- MW = 232,32
- rozpouštědlo pro zásobní roztok: dimethylformamid (DMF), acetonitril (MeCN)
- rozpouštědlo pro spektroskopická měření: metanol (MeOH), aceton
- zásobní roztoky DPH se často připravují v tetrahydrofuranu (THF); dlouhodobé skladování v THF se však nedoporučuje kvůli možné tvorbě peroxidů v tomto rozpouštědle
- dlouhovlnné absorpční maximum v metanolu: $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 350 \text{ nm}$ (molární extinkční koeficient: $88000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)
- fluorescenční emisní maximum v metanolu: $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 452 \text{ nm}$
- DPH a jeho deriváty prakticky nefluoreskují ve vodě. Absorpční a emisní spektra mají více píků; vlnová délka, rozlišení a relativní intenzita těchto píků závisí na prostředí. Uvedené hodnoty $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}$ a $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ jsou pro nejintenzivnější pík v metanolu.

Obr. 3.6 Lokalizace fluorescenčních sond v lipidové dvojvrstvě

Lokalizace a orientace vybraných fluorescenčních sond ve fosfolipidové dvojvrstvě: A) DPH, B) NBD-C₆-HPC, C) bis-pyrene-PC, D) DiI, E) *cis*-parinaric acid, F) BODIPY 500/510 C₄, C₉, G) *N*-Rh-PE, H) DiA, I) C₁₂-fluorescein



(Podle: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.)

Materiál:

- 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH, Sigma)
- fosfatidylcholin izolovaný z hovězího mozku
- ACD roztok (0,8% kyselina citrónová, 2,2% citrát sodný (Na₃C₆H₅O₇), 2,4% glukóza, pH 4,3)
- plná krev
- centrifuga
- zařízení LiposoFast-Basic
- skleněné zkumavky, mikropipety
- pufr A (120 mmol/l NaCl, 10 mmol/l KCl, 30 mmol/l Tris HCl, pH 7,4)
- hypotonický pufr pro hemolýzu (izotonický pufr A se 20x naředí redestilovanou vodou a pH se upraví na 7.4 pomocí NaOH a HCl)

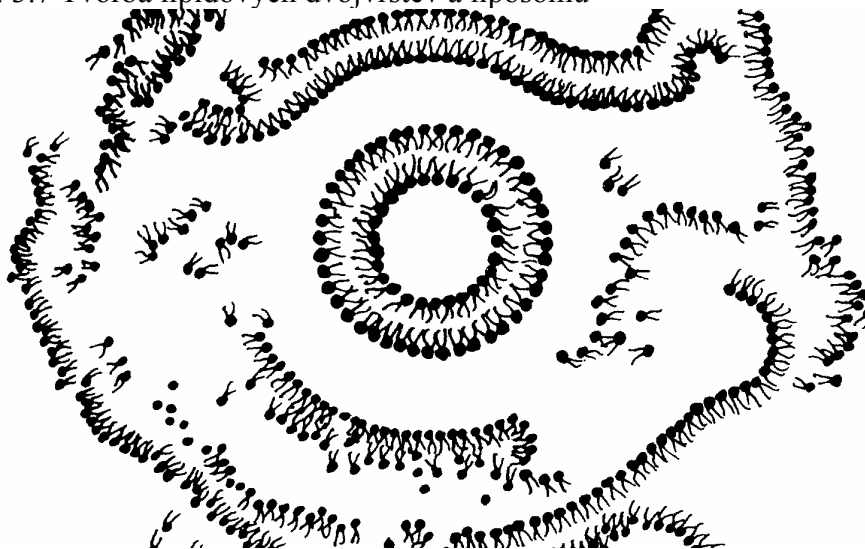
Postup:

Příprava velkých jednovrstevných liposomů (LUV)

Liposomy jsou váčky (vezikuly) uzavírající vodný roztok membránou tvořenou především fosfolipidy. Tvoří se spontánně, když jsou fosfolipidy dispergovány ve vodném prostředí.

V závislosti na způsobu přípravy mohou vzniknout liposomy 1. mnohvrstevné (multilamellar vesicles, MLV), 2. malé jednovrstevné (small unilamellar vesicles, SUV) nebo 3. velké jednovrstevné (large unilamellar vesicles, LUV). V našich experimentech jsme použili LUV o průměru cca 100 nm.

Obr. 3.7 Tvorba lipidových dvojvrstev a liposomů



Liposomy byly připravovány z fosfatidylcholinu (PC) izolovaného z bílé hmoty hovězího mozku. PC byl separován z hrubého extraktu lipidů sloupcovou chromatografií. Výsledná čistota fosfolipidů byla lepší než 95% (určeno dvourozměrnou tenkovrstevnou chromatografií). Fosfolipidy byly uchovávány v dusíkové atmosféře ve směsi chloroform/metanol (2 : 1, v/v) při -30 °C. Koncentrace fosfolipidů byla určena z měření koncentrace fosforu (viz níže). Nejprve byly připraveny velké mnohvrstevné liposomy (modifikovanou Banghamovou metodou) a z nich byly protlačováním přes polykarbonátové filtry pomocí zařízení Liposofast-Basic (Avestin, Inc.) připraveny LUV:

1. přenést 1 až 20 mg fosfolipidu ve směsi chloroform/metanol (2:1) do skleněné nádoby a rozpouštědlo odpařit proudem dusíku při teplotě kolem 40 °C tak, aby na stěně nádoby vznikla tenká vrstva fosfolipidu
2. nádobku umístit po několik hodin ve vakuu, aby byly odstraněny zbytky rozpouštědla
3. přidat 2 ml pufru A a vzorek inkubovat v 50 °C po dobu 5 minut
4. intenzivně třepat a nakonec krátce sonikovat (cca 5 s) v sonikátoru XL 2020 (Heat Systems - Ultrasonics) na stupni 4
5. inkubovat vzorek v 50 °C po dobu 30 minut a poté jej krátce protřepat a naředit pufrém A na požadovanou koncentraci fosfolipidu (např. 1 mmol PC/ml); tím jsou připraveny PC-MLV
6. zařízení Liposofast-Basic vyčistit etanolem
7. první polovinu držáku filtrů zasunout do krytu a vložit polykarbonátový filtr s póry 100 nm na „O“ ring
8. přidat druhou část držáku filtrů do krytu tak, aby „O“ ringy byly vidět pozorovacím otvorem
9. utáhnout ručně pevně tak abychom se vyhnuli zkroucení držáku a aby mrtvý objem byl co nejmenší (filtry jsou těsně stlačeny mezi „O“ ringy)
10. zatlačit a současně jemně zašroubovat speciální injekční stříkačky do držáku filtrů (jedna obsahuje MLV)
11. protlačit liposomy přes filtr alespoň 11 krát (lichý počet!!!)
12. odebrat LUV a naředit

Příprava erytrocytárních ghostů

Membrány z erytrocytů byly připraveny modifikovanou metodou dle Dodge et al. [Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D.J.: The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys. 100, 119-130 (1963)]. Všechny operace se provádějí při 4°C:

1. krev (cca 4 ml) odebrat do ACD roztoku (0,5 ml) a centrifugovat v odběrové zkumavce při 200g (1000 až 1200 RPM na JK23, výkyvný rotor), 20°C, 15 min.
2. odebrat opatrně plazmu obohacenou trombocyty (PRP) i s horní vrstvičkou sedimentu (erymasy) a zbytek erymasy 3 x promýt pufrém A (4°C, 10 min, 1000 g = 3000 RPM na K23)
3. sediment z původních 4 ml krve se rozpipetuje do dvou 50 ml zkumavek, přidá se cca 30 ml hypotonického pufru, pečlivě se promíchá a potom centrifuguje (20000 g, 4°C, 40 min.)
4. ghosty se ještě alespoň 2x promyjí hypotonickým pufrém (poměr buňky:promývací roztok je asi 1:30); pečlivé odstraňování supernatantu je velmi důležité
5. po posledním točení se membrány roztřepou v cca 2 ml pufru A a převedou se do ependorfek v objemu odpovídajícím původnímu objemu krve
6. odebere se vzorek (20 µl) pro stanovení proteinů a fosforu a membrány se dají zamrazit.

Stanovení fosforu v membránách

Fosfát je určován metodou dle [Bartlett, G.R.: Phosphorus assay in column chromatography. J. Biol. Chem. 234 (1959) 466-468; Wagner, H., Lissau, A., Holzi, J., Horammer, L.: The incorporation of ³²P into inositolphosphatides of the rat brain. J. Lipid Res. 3 (1962) 177-180].

Roztoky:

- 2,5% molybdenan amonný (25 g/l)
- 0,02 M KH₂PO₄ (272,2 mg/100 ml)
- 70% HClO₄
- 10% kyselina askorbová (vždy čerstvá)
- standard: 100x zředěný roztok 0,02 mol/l KH₂PO₄ (1ml+99 ml vody)

Postup:

1. vzorky odpařit pod dusíkem v kalibrovaných zkumavkách
2. vzorek, standard (S1 = 0,25 ml 0,2 mmol/l KH₂PO₄; S2 = 0,5 ml 0,2 mmol/l KH₂PO₄) nebo slepý vzorek + 0,30 ml HClO₄ (70%)
3. spalovat v pískové lázni 60 min při 180 °C (standarty se spalovat nemusí)
4. po vychladnutí doplnit do 2,0 ml redestilovanou vodou, třepat
5. přidat 0,25 ml molybdenanu amonného, třepat
6. přidat 0,25 ml kyseliny askorbové, třepat (výsledný objem je 2,5 ml)
7. 5 min vařit ve vodní lázni
8. 5 min chladit v ledové vodě
9. změřit absorbanci A_{vzorek} při 820 nm proti slepému vzorku
10. provést výpočet na základě skutečnosti, že ve standardu S1 je 0,05 µmol fosfátu (P_i), ve standardu S2 je 0,10 µmol P_i:
 - kalibrační faktor f pro 0,05 µmol P_i je:
(průměr z S1 + (průměr z S2/2))/2 = f
 - koncentrace P_i ve vzorku je:
 $c(\mu\text{mol P}_i/\text{ml}) = c(\text{mmol/l}) = (0,05 \cdot A_{\text{vzorek}})/(f \cdot V)$
kde je V – objem vzorku odebraného pro měření P_i v mililitrech

- přibližnou koncentraci fosfolipidů ($MW \cong 752$) v mg/ml dostaneme vydělením této hodnoty $c(\text{mmol/l})$ koeficientem 1,33

Metoda fluorescenčních sond

Pro měření relativních změn fluidity plazmatických membrán byla použita metoda fluorescenčních sond s hydrofobní membránovou sondou 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH, Sigma). DPH byl rozpuštěn v acetonu v koncentraci 6 mmol/l a tento zásobní roztok byl uložen v mrazničce. Pro měření byl připraven vždy čerstvý roztok v pufru A v koncentraci 6 μM DPH (injektováním pomocí Hamiltonovy stříkačky 10 μl za intenzivního míchání). Tento roztok byl smíchán s pufrům A a suspenzí liposomů nebo membrán tak, aby výsledná koncentrace DPH byla 2 μM a koncentrace fosfolipidů cca 100 $\mu\text{mol/l}$ v případě buněčných membrán a 50 $\mu\text{mol/l}$ v případě PC-LUV. Po 60 minutách inkubace v 37°C byla měřena polarizovaná fluorescence (anizotropie fluorescence) při excitační vlnové délce 350 nm a emisní vlnové délce 450 nm na spektrofluorimetru FluoroMax-3 (Jobin Yvon, Horiba) s polarizačním příslušenstvím. Měření daného vzorku bylo opakováno alespoň 10x a hodnoty byly zprůměrnovány.

Polarizovaná fluorescence roztoků se měří ve směru kolmém ke směru budícího paprsku, který je polarizován ve svislém směru. Je přitom nutno provádět korekci na vliv emisního monochromátoru spektrofluorimetru na polarizaci jím procházejícího záření. **Anizotropie fluorescence** se určuje ze vztahu

$$(1.21) \quad r = (I_{\parallel}^V - G I_{\perp}^V) / ((I_{\parallel}^V + 2 G I_{\perp}^V))$$

kde I_{\parallel}^V a I_{\perp}^V jsou složky světelné intenzity rovnoběžné nebo kolmé k směru (vertikálnímu) polarizace budícího záření a G je korekční faktor, který lze změřit při excitačním záření polarizovaném vodorovně jako poměr $I_{\perp}^H / I_{\parallel}^H$.

Výsledky:

Pro ilustraci jsou v tabulce uvedeny výsledky měření anizotropie fluorescence DPH (r_{DPH}) v ghostech (při 37 °C) u starších osob trpících hypercholesterolémií. Byla změřena závislost r_{DPH} na době podávání léku snižujícího sérový cholesterol (simvastatinu). Současně byl v membránách změřen poměr cholesterolu k celkovým fosfolipidům (CH/PL). Jak je vidět z tabulky 3.3 bylo měření r_{DPH} mnohem přesnější, než stanovení CH/PL.

Tabulka 3.3 Anizotropie fluorescence sondy DPH v ghostech

SIMVASTATIN	GHOSTY					SÉRUM	
	r_{DPH}			poměr cholesterol/fosfolipidy v ghostech		celkový sérový cholesterol	
0	0,2382	±	0,0065	0,756	±	0,137	6,57 ± 1,26
1 měsíc	0,2338	±	0,0062	0,804	±	0,111	6,20 ± 0,89
2 měsíce	0,2320	±	0,0115	0,711	±	0,085	5,10 ± 0,42
13-16 měsíců	0,2316	±	0,0062	0,788	±	0,209	5,02 ± 0,39
zdravé kontroly	0,2280	±	0,0067	0,683	±	0,127	3,83 až 5,8

Anizotropie fluorescence r_{DPH} v liposomech připravených z fosfatidylcholinu je mnohem menší, než r_{DPH} v ghostech. Pro ilustraci jsou v následující tabulce 3.4 uvedeny hodnoty r_{DPH}

v PC-LUV (při 37°C) v závislosti na množství imipraminu (antidepresiva) přidaného k liposomům před inkubací s DPH.

Tabulka 3.4 Anizotropie fluorescence sondy DPH ve velkých jednovrstevných liposomech

PC-LUV	
koncentrace imipraminu ($\mu\text{mol/l}$)	r_{DPH}
0	0,08624
0,01	0,08513
0,1	0,08484
1	0,08484
10	0,08550
100	0,09156

3.4. Vlastní fluorescence bílkovin

Vlastní fluorescenci proteinů je způsobena aromatickými aminokyselinami v nich obsaženými: tryptofanem (Trp), tyrozinem (Tyr) a fenylalaninem (Phe). Dominující je fluorescence z tryptofanu, naopak prakticky vůbec se neuplatňuje fenylalanin (viz kap. 2.1). V tomto experimentu jsou změřena fluorescenční excitační a emisní spektra albuminu a čistého tryptofanu, tyrozinu a fenylalaninu.

Vlastnosti L-tryptofanu:

- MW = 204,23
- absorpční maximum: $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 295 \text{ nm}$
- fluorescenční emisní maximum: $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 353 \text{ nm}$
- emise Trp je vysoce závislá na polaritě a okolním prostředí

Vlastnosti L-tyrozinu:

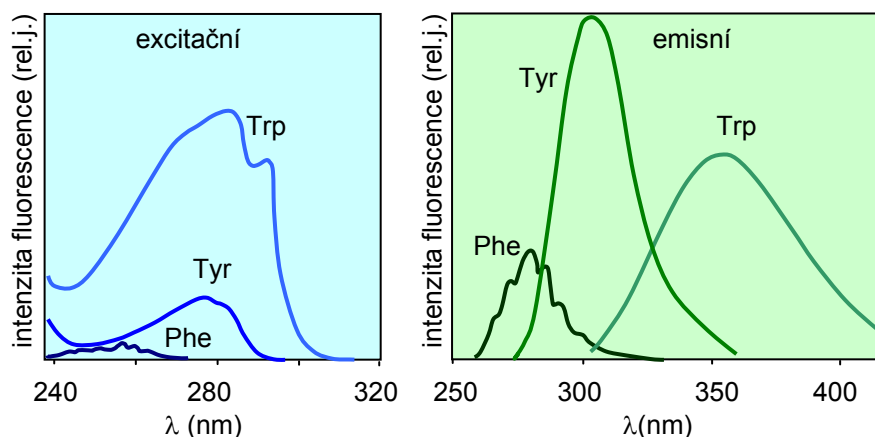
- MW = 181,19
- absorpční maximum: $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 275 \text{ nm}$
- fluorescenční emisní maximum: $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 304 \text{ nm}$
- emise Tyr je relativně málo citlivá na polaritu rozpouštědla

Vlastnosti L-fenylalaninu:

- MW = 165,19
- absorpční maximum: $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 260 \text{ nm}$
- fluorescenční emisní maximum: $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 282 \text{ nm}$
- emise Phe je strukturovaná

Fluorescence proteinů je obvykle excitována při 280 nm nebo při delších vlnových délkách, takže fenylalanin není ve většině experimentů excitován. Navíc je kvantový výtěžek fluorescence Phe velmi malý (kolem 0,02). Tryptofanovou fluorescenci v proteinech lze selektivně excitovat při 295-305 nm.

Obr. 3.8 Fluorescenční spektra tryptofanu (Trp), tyrozinu (Tyr) a fenylalaninu (Phe)



(Podle: Lakowicz 1999.)

Materiál:

- L-tryptofan (Aldrich), L-tyrozin (Fluka), L-fenylalanin (Fluka)

- lidský albumin (MW = 69000)
- pufr A (120 mmol/l NaCl, 10 mmol/l KCl, 30 mmol/l Tris HCl, pH 7,4)
- skleněné zkumavky, mikropipety, ...

Postup:

1. Připravte zásobní roztoky 10 mmol/l Trp, 10 mmol/l Tyr, 10 mmol/l Phe a 0,25 mmol/l albuminu v pufru A.
2. Pro vlastní měření je nařed'te pufrém A na koncentrace 20 $\mu\text{mol/l}$ Trp, 100 $\mu\text{mol/l}$ Tyr, 10 mmol/l Phe a 5 $\mu\text{mol/l}$ albuminu.
3. Změřte excitační a emisní spektra vzorků za podmínek uvedených v tabulce 3.5

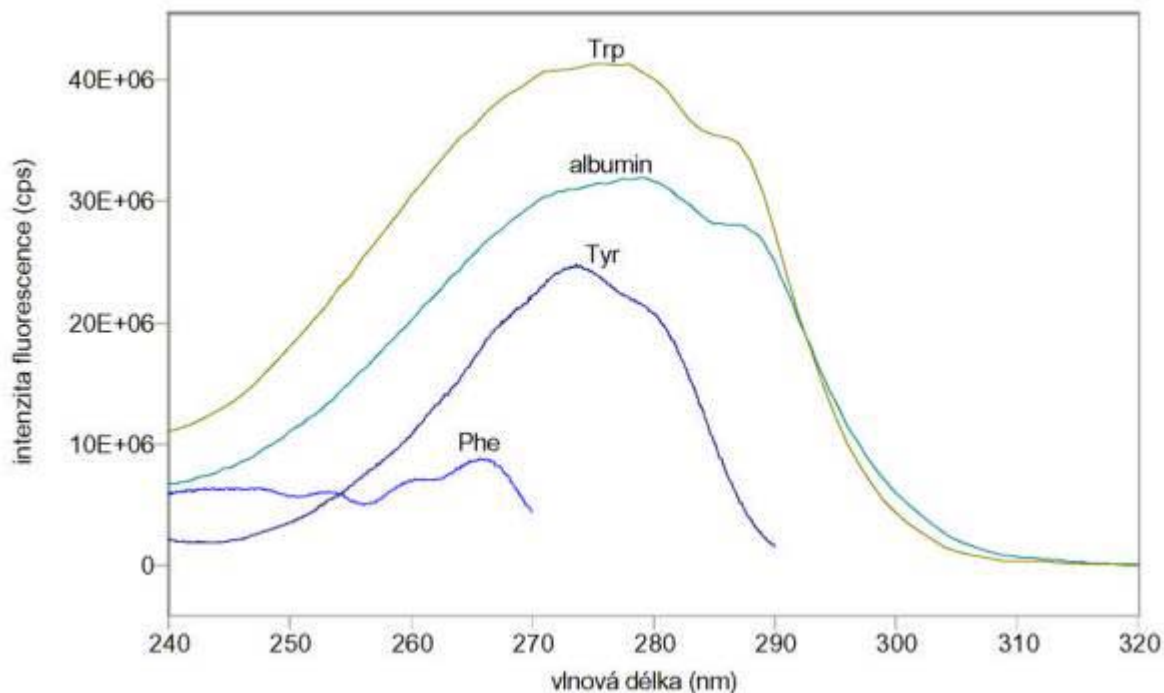
Tabulka 3.5

	excitační spektrum		emisní spektrum	
	λ_{em} (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
L-tryptofan	350	240-320	280	300-420
L-tyrozin	300	240-290	270	280-360
L-fenylalanin	280	240-270	250	260-360
albumin	350	240-320	280	300-420

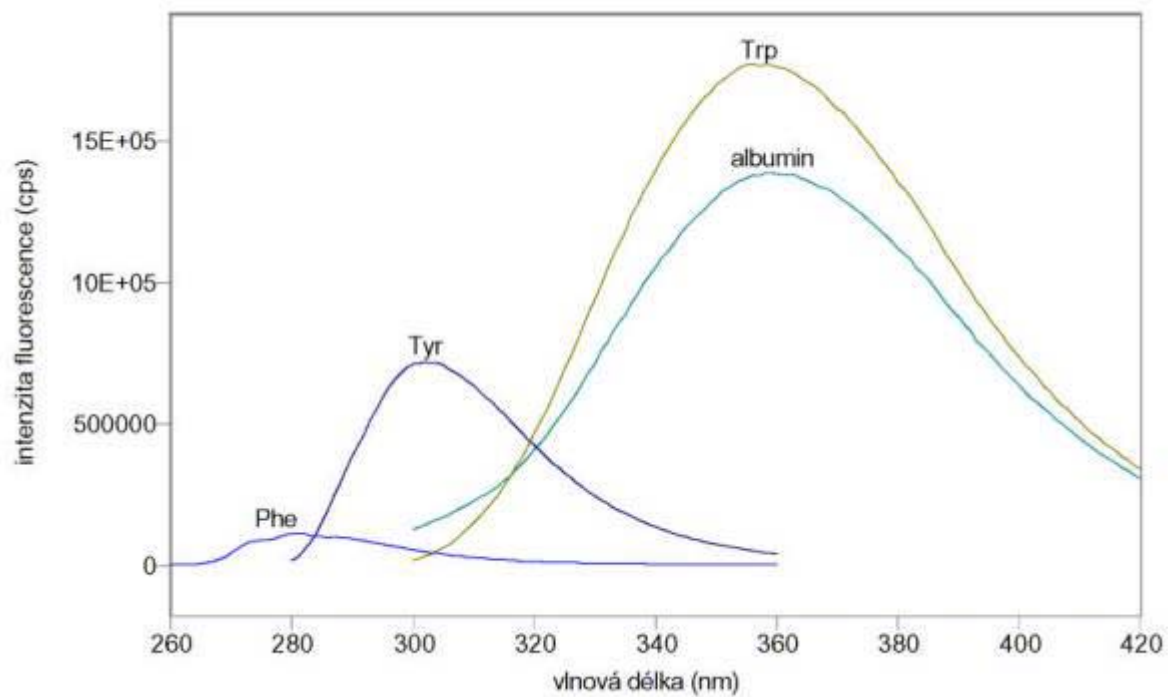
Výsledky:

Změřená excitační a emisní spektra vlastní fluorescence tryptofanu (Trp), tyrozinu (Tyr), fenylalaninu (Phe) a albuminu v pufru A jsou na obr. 3.9 a 3.10. Je vidět, že prakticky veškerá vlastní fluorescence albuminu pochází od tryptofanu. Měření byla provedena na spektrofluorimetru FluoroMax-3.

Obr. 3.9 Excitační spektra 20 $\mu\text{mol/l}$ Trp ($\lambda_{em} = 350$ nm), 100 $\mu\text{mol/l}$ Tyr ($\lambda_{em} = 300$ nm), 10 mmol/l Phe ($\lambda_{em} = 280$ nm) a 5 $\mu\text{mol/l}$ albuminu ($\lambda_{em} = 350$ nm).



Obr. 3.10 Emisní spektra 20 $\mu\text{mol/l}$ Trp ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$), 100 $\mu\text{mol/l}$ Tyr ($\lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}$), 10 mmol/l Phe ($\lambda_{\text{ex}} = 250 \text{ nm}$) a 5 $\mu\text{mol/l}$ albuminu ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$).



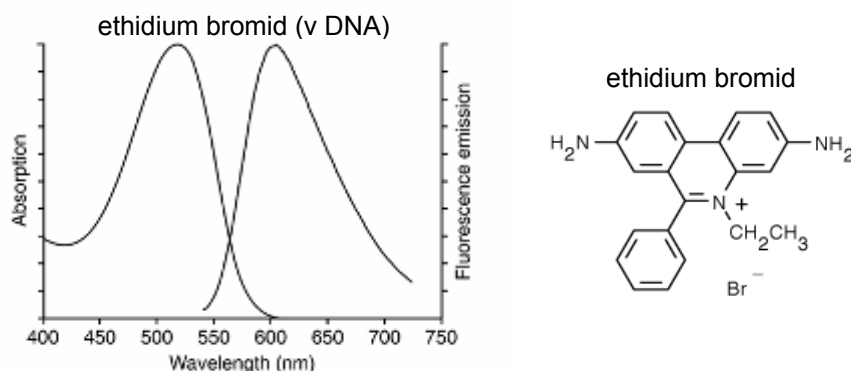
3.5. Fluorescenční značení DNA

Nukleotidy a nukleové kyseliny obecně nefluoreskují. Pro jejich vizualizaci a identifikaci se proto používá řada fluorescenčních sond (viz kap. 2.2.2 a Tabulka 2.6). V tomto experimentu je ukázána možnost použití sondy ethidium bromidu pro barvení jader neživých buněk granulocytů nebo lymfocytů.

Vlastnosti sondy ethidium bromidu:

- MW = 394,31
- dobře rozpustný ve vodě
- ve vodě fluoreskuje málo, po navázání k DNA se fluorescence zvyšuje asi 30 krát
- doba dohasínání fluorescence ve vodě je asi 1,7 ns, po vazbě k dvouřetězcové DNA se zvyšuje na 20 ns
- vazba k DNA se uskutečňuje vmezeřováním rovinného aromatického kruhu mezi páry bází dvouřetězcové DNA
- absorpční maximum v DNA: $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 523 \text{ nm}$
- fluorescenční emisní maximum v DNA: $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 604 \text{ nm}$

Obr. 3.11 Fluorescenční spektra ethidium bromidu



(Podle: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.)

Materiál:

- ethidium bromid (EB, Merck)
- plná krev
- dextran
- Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences)
- centrifuga
- termostat
- skleněné zkumavky
- mikropipety
- fosfátový pufr (PBS, pH 7,4)
- pufr A (120 mmol/l NaCl, 10 mmol/l KCl, 30 mmol/l Tris HCl, pH 7,4)
- ACD roztok (0,8% kyselina citrónová, 2,2% citrát sodný (Na₃C₆H₅O₇), 2,4% glukóza, pH 4,3)

Postup:**Izolace granulocytů z krve**

1. krev odebrat do ACD roztoku (v objemovém poměru 1:9)
2. v umělohmotné injekční stříkačce promíchat 4 díly krve a 1 díl 6% dextranu v PBS
3. nechat (stříkačku špičkou vzhůru) 30 minut v 37°C, potom vytlačit plazmu
4. promýt v PBS (centrifugace 20 min při 1500 RPM na JK23)
5. je-li příměs erytrocytů provést hypotonní lýzu (0,25 ml vzorku + 0,75 ml vody, při 37°C po 10 s, potom přidat koncentrovaný NaCl)

Izolace lymfocytů z plné krve

1. krev odebrat do citrátového roztoku (nesrážlivá krev)
2. promíchat 2 ml krve a 2 ml pufru A
3. přidat 3 ml Ficoll-Paque Plus do zkumavky a opatrně navrstvit 4 ml zředěné krve
4. centrifugovat při 400g po dobu 30 min při 20 °C
5. odsát horní vrstvu (může být uchována pro pozdější použití)
6. přenést vrstvu s lymfocyty do centrifugační kyvety (cca 2 ml)
7. přidat alespoň 3 objemy pufru A, promíchat
8. centrifugovat při 60-100g po 10 min při 20 °C
9. odstranit supernatant a opakovat promytí
10. suspendovat lymfocyty v pufru A v koncentraci $5 \cdot 10^7$ /ml

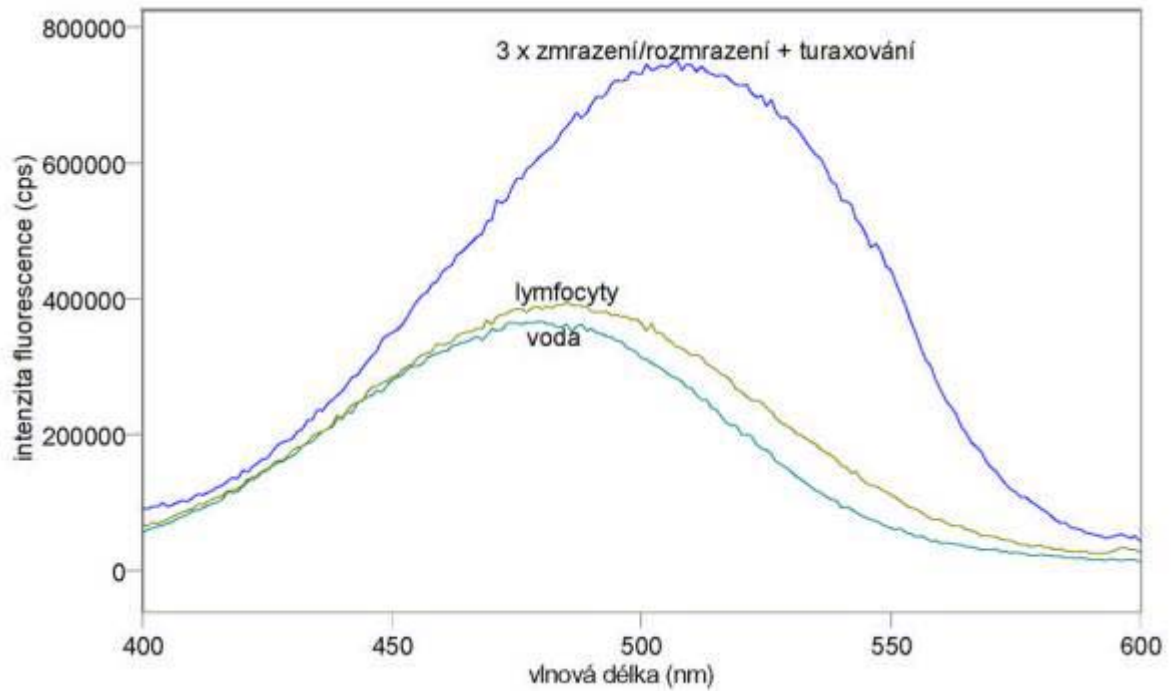
Barvení DNA ethidium bromidem:

1. připravit zásobní roztok ethidium bromidu ve vodě (2,5 mmol/l)
2. smíchat pufr A, granulocyty nebo lymfocyty a ethidium bromid, tak aby výsledné koncentrace byly cca 10^6 buněk/ml a 10 μ mol/l ethidium bromidu
3. změřit excitační fluorescenční spektrum při $\lambda_{em} = 610$ nm a emisní spektrum při $\lambda_{ex} = 520$ nm
4. vzorek několikrát rychle zmrazit a rozmrazit, krátce turaxovat a znovu měřit excitační a emisní spektra

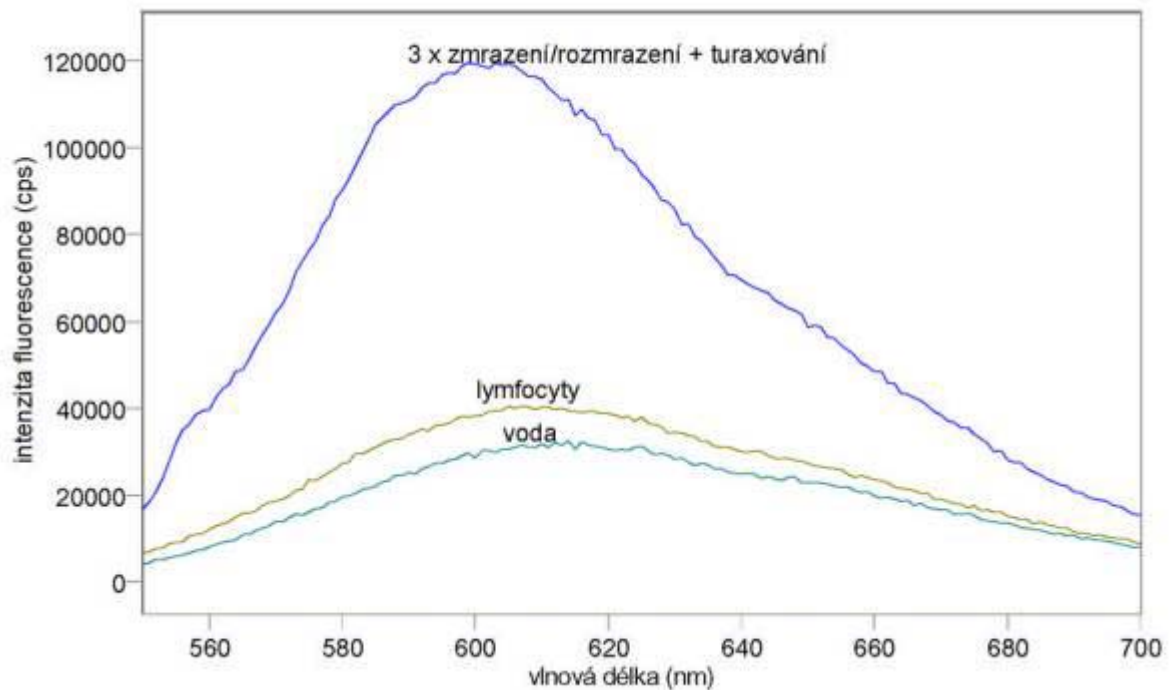
Výsledky:

Změřená excitační a emisní spektra ethidium bromidu ve pufru A, po přidání lymfocytů a po vazbě k jejich DNA jsou uvedena na obr. 3.12 a 3.13. Měření byla provedena na spektrofluorimetru FluoroMax-3.

Obr. 3.12 Excitační fluorescenční spektra 10 $\mu\text{mol/l}$ ethidium bromidu ve vodě a v DNA lymfocytů ($\lambda_{\text{em}} = 610 \text{ nm}$).



Obr. 3.13 Emisní fluorescenční spektra 10 $\mu\text{mol/l}$ ethidium bromidu ve vodě a v DNA lymfocytů ($\lambda_{\text{ex}} = 520 \text{ nm}$).



3.6. Kalcium

Kalciové sondy jsou nejčastěji používané nitrobuněčné indikátory (viz kap. 2.3.5). Protože neprocházejí buněčnou membránou, dostávají se do buněk mikroinjekcí nebo elektroporací, nebo jako acetoxylmetylestery (AM estery), které jsou uvnitř buňky štěpeny nitrobuněčnými esterázami za vzniku negativně nabitých sond.

V tomto experimentu jsou vyzkoušeny vlastnosti dvou sond pro měření Ca^{2+} : Fluo-3 a Quin-2. Po vazbě kalcia vykazuje Quin-2 jak změnu intenzity fluorescence, tak posuv absorpčního maxima, Fluo-3 téměř nefluoreskuje za nepřítomnosti Ca^{2+} . Jedná se tedy o sondy, pro něž je koncentrace Ca^{2+} dána vztahem (viz kap. 2.3.5):

$$(2.1) \quad c_a = K_d (I - I_{\min}) / (I_{\max} - I)$$

kde je K_d – disociační konstanta vazebného místa pro kalcium na indikátoru, I_{\min} – intenzita fluorescence indikátoru, když není navázán žádný vápník, I_{\max} – intenzita fluorescence plně obsazeného indikátoru, I – intenzita fluorescence ve vzorku, kde je jen část vazebných míst indikátoru obsazena Ca^{2+} . Měření I_{\max} vyžaduje lýzu buněk a titraci uvolněného indikátoru nebo použití ionoforů, aby došlo k saturaci nitrobuněčného indikátoru kalcie.

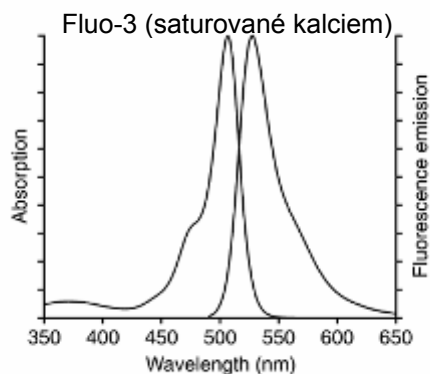
Vlastnosti sondy Quin-2:

- MW = 541,51 (pro bezvodou látku)
- mírná rozpustnost ve vodě (pH > 6)
- neprostupuje membránou, ale prodává se i AM ester (Quin-2, AM), který membránou prostupuje
- kvantový výtěžek fluorescence volné formy je 0,03; po navázání kalcia vzrůstá na 0,14
- doba dohasínání fluorescence volné formy je 1,35 ns, po vazbě Ca^{2+} se zvyšuje na 11,6 ns
- absorpční maximum volné formy 356 nm, vázané formy 336 nm
- fluorescenční emisní maximum volné formy 500 nm, vázané formy 503 nm
- disociační konstanta $K_d = 60,0 \text{ nmol/l}$

Vlastnosti sondy Fluo-3:

- MW = 769,5 (Fluo-3 tetraoctová kyselina)
- rozpustná ve vodě (pH > 6)
- neprostupuje membránou, ale prodává se i AM ester (Fluo-3, AM), který membránou prostupuje
- kvantový výtěžek fluorescence se po navázání kalcia zvýší asi 40 krát
- doba dohasínání fluorescence volné formy je 0,04 ns, po vazbě Ca^{2+} se zvyšuje na 1,28 ns
- absorpční maximum 504 nm
- fluorescenční emisní maximum 526 nm
- disociační konstanta $K_d = 390 \text{ nmol/l}$

Obr. 3.14 Absorpční a fluorescenční spektrum sondy Fluo-3 saturované kalcíem



(Podle: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.)

Materiál:

- Quin-2 (Sigma), Fluo-3 (Fluka)
- CaCl₂ (MW = 110,99)
- EGTA
- skleněné zkumavky
- mikropipety

Postup:

1. Quin-2 a Fluo-3 rozpustíte ve vodě (pH>6) v koncentraci 2 mmol/l
 2. CaCl₂ rozpustíte ve vodě v koncentracích 10 mmol/l a 10 μmol/l
 3. připravte 1 mmol/l EGTA ve vodě
 4. smíchejte vodu, sondu a CaCl₂ dle Tabulky 3.6 a změřte
 - excitační spektra Fluo-3 při $\lambda_{em} = 540$ nm; emisní spektra Fluo-3 při $\lambda_{ex} = 480$ nm
 - excitační spektra Quin-2 při $\lambda_{em} = 500$ nm; emisní spektra Quin-2 při $\lambda_{ex} = 336$ nm
- místo měření spekter můžete měřit jen intenzitu fluorescence:
- Fluo-3 při $\lambda_{ex} = 504$ nm a $\lambda_{em} = 526$ nm
 - Quin-2 při $\lambda_{ex} = 356$ nm a $\lambda_{em} = 500$ nm

Tabulka 3.6

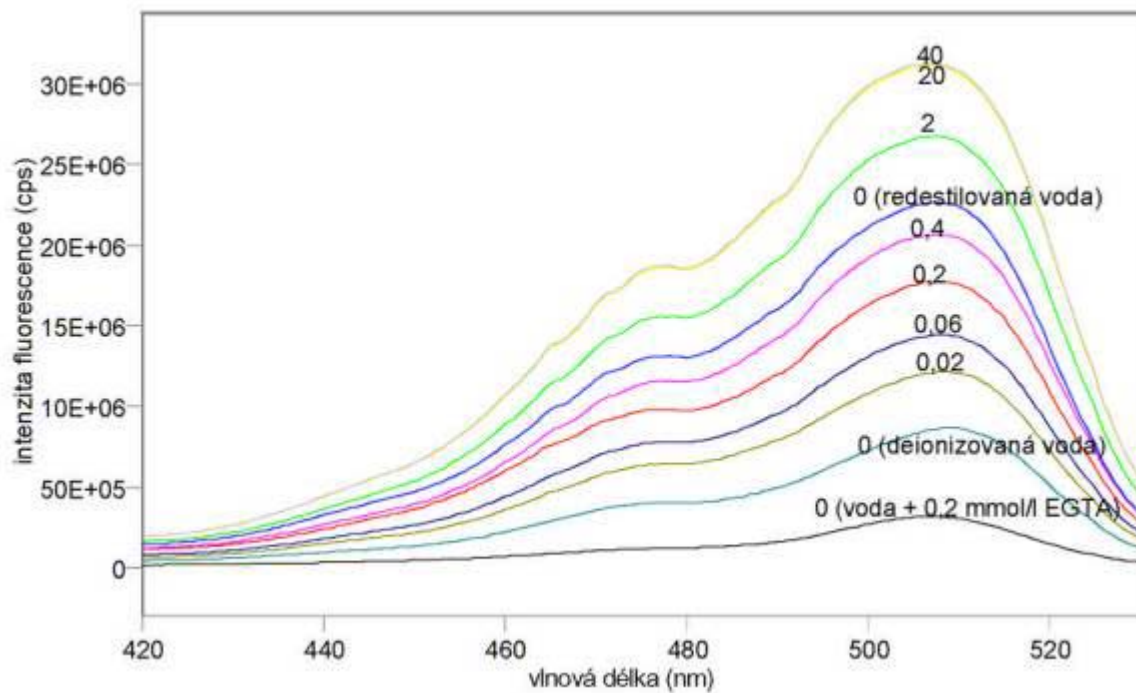
voda (μl)	Fluo-3 (μl)	Quin-2 (μl)	CaCl ₂ 10 μmol/l (μl)	CaCl ₂ 10 mmol/l (μl)	EGTA 1 mmol/l (μl)	výsl. konc. Ca ²⁺ (μmol/l)
3975	25	0	0	0	1000	0
4975	25	0	0	0	0	0
4945	25	0	30	0	0	0,06
4775	25	0	200	0	0	0,4
4974	25	0	0	1	0	2
4965	25	0	0	10	0	20
4955	25	0	0	20	0	40
4925	25	0	0	50	0	100
3975	0	25	0	0	1000	0
4975	0	25	0	0	0	0
4945	0	25	30	0	0	0,06
4965	0	25	0	10	0	20
4955	0	25	0	20	0	40

Poznámka: Do vzorku s nulovou koncentrací přidaného CaCl_2 byl přidán 0,2 mmol/l EGTA pro vychytání iontů Ca^{2+} .

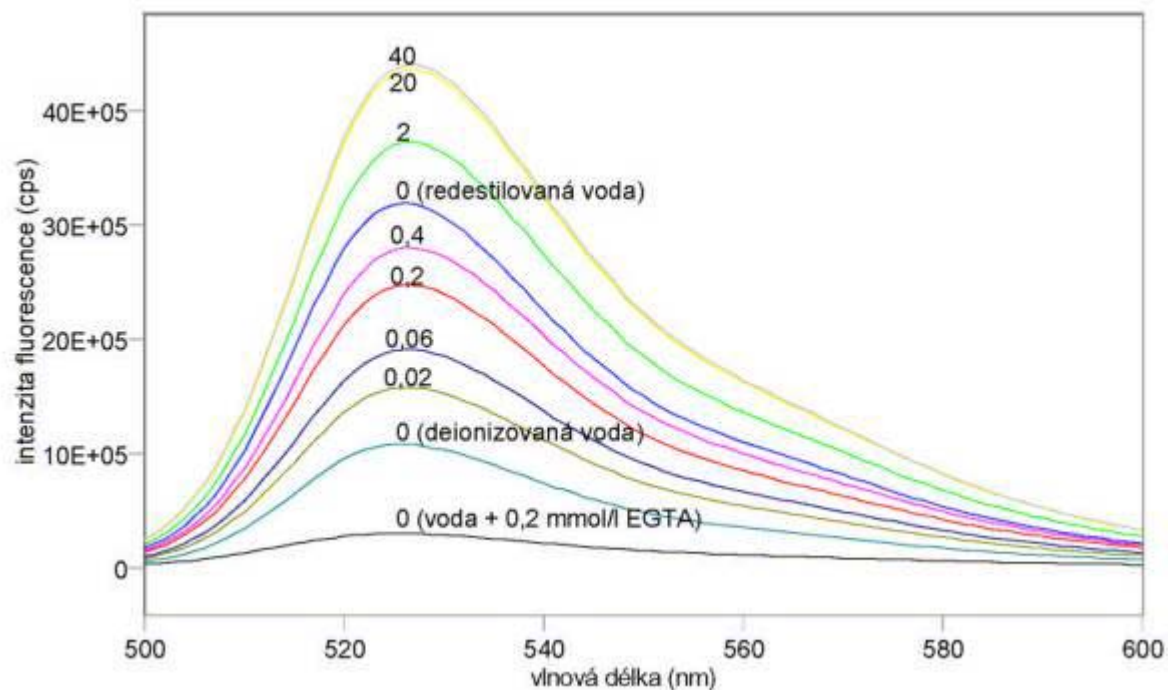
Výsledky:

Změřená excitační a emisní spektra sondy Fluo-3 při různých koncentracích kalcia jsou uvedena na obr. 3.15 a 3.16. Excitační a emisní spektra sondy Quin-2 při různých koncentracích kalcia jsou uvedena na obr. 3.17 a 3.18. Měření byla provedena na spektrofluorimetru FluoroMax-3. Výsledky mimo jiné ukazují, že v použité redestilované vodě byly přítomny ionty Ca^{2+} , které měření při nízkých koncentracích CaCl_2 zkreslily. Je vhodnější použít deionizovanou vodu. Jak se dalo předpokládat z hodnot disociačních konstant, je sonda Quin-2 citlivější na změny koncentrací kalcia při jeho nižších koncentracích (kolem 0,06 $\mu\text{mol/l}$), zatímco sonda Fluo-3 je nejcitlivější při vyšších koncentracích Ca^{2+} (kolem 0,4 $\mu\text{mol/l}$).

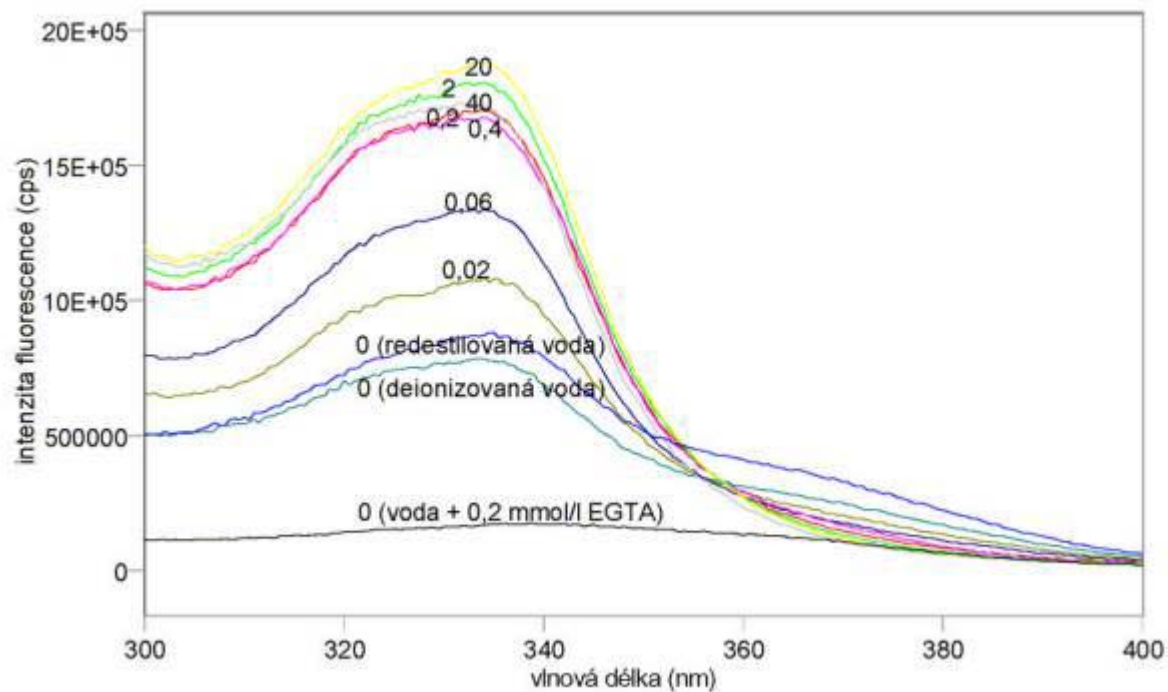
Obr. 3.15 Excitační fluorescenční spektra 10 $\mu\text{mol/l}$ Fluo-3 ($\lambda_{\text{em}} = 540 \text{ nm}$) při různých koncentracích CaCl_2 ($\mu\text{mol/l}$).



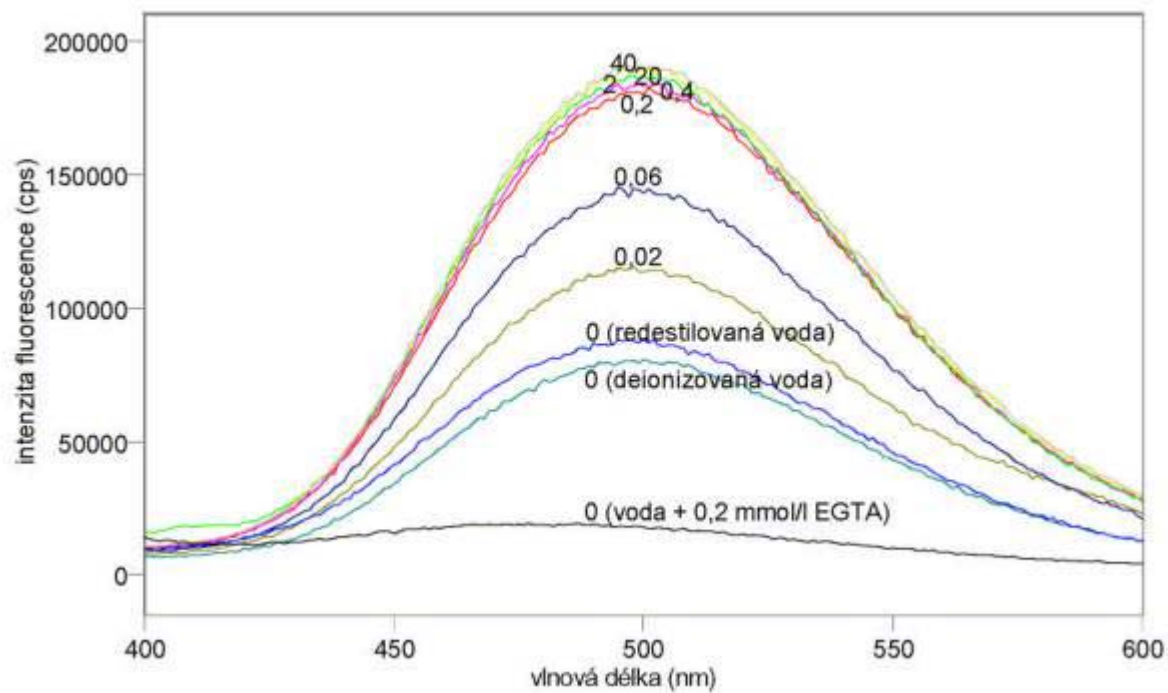
Obr. 3.16 Emisní fluorescenční spektra 10 $\mu\text{mol/l}$ Fluo-3 ($\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$) při různých koncentracích CaCl_2 ($\mu\text{mol/l}$).



Obr. 3.17 Excitační fluorescenční spektra 10 $\mu\text{mol/l}$ Quin-2 ($\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$) při různých koncentracích CaCl_2 ($\mu\text{mol/l}$).



Obr. 3.18 Emisní fluorescenční spektra 10 $\mu\text{mol/l}$ Quin-2 ($\lambda_{\text{ex}} = 336 \text{ nm}$) při různých koncentracích CaCl_2 ($\mu\text{mol/l}$).



3.7. Membránový potenciál

V tomto experimentu je popsán jednoduchý způsob detekce změn membránového potenciálu živých buněk pomocí fluorescenčních sond citlivých na elektrický potenciál přes membránu (viz. kap. 2.3.7). Experiment je proveden s buňkami lymfocytů izolovaných z periferní krve a potenciálovou fluorescenční sondou 3,3'-dihexyloxakarbocyanin jodidem (DiOC₆(3)). Změna membránového potenciálu je indukována valinomycinem, vysokými koncentracemi mimobuněčného KCl, ouabainem a Tritonem X 100.

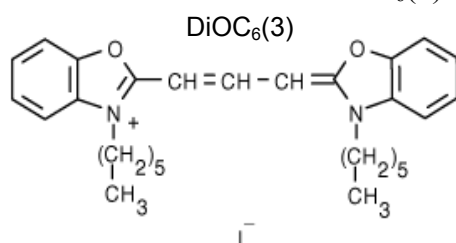
Triton X 100 je neiontový detergent, který rozpouští membrány a tvoří micely s membránovými lipidy a proteiny. **Ouabain** je inhibitor Na⁺K⁺-ATPázy. **Valinomycin** je ionofor přenašečového typu pro K⁺, tzn. zvyšuje permeabilitu membrán tím, že selektivně váže ion K⁺, difunduje membránou a uvolňuje K⁺ na druhé straně membrány (tento efekt se může uplatňovat jen do vyrovnání koncentrací iontů K⁺ na obou stranách membrány).

Sonda DiOC₆(3) je citlivá na membránový potenciál jak plazmatické membrány, tak i mitochondriální membrány [Salvioli et al.: FEBS Letters 411, 77-82, 1997]. Pro měření změn mitochondriálního membránového potenciálu se proto musí použít specifické mitochondriální inhibitory [Kalbacová et al.: Cytometry 52A, 110-116, 2003].

Vlastnosti sondy DiOC₆(3):

- MW = 572,53
- nízká rozpustnost ve vodě
- patří do skupiny karbocyninových potenciometrických fluorescenčních sond s pomalou odezvou
- rozpouštědlo pro zásobní roztok: dimetylsulfoxid (DMSO) nebo etanol (EtOH)
- rozpouštědlo pro spektroskopická měření: metanol (MeOH)
- absorpční maximum v metanolu: $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 484 \text{ nm}$ (molární extinkční koeficient: $154000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)
- fluorescenční emisní maximum v metanolu: $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 501 \text{ nm}$
- pracovní koncentrace se udává 40-200 nmol/l
- prochází buněčnou membránou
- může být použita pro značení jak mitochondrií, tak endoplazmatického retikula (po uvolnění sondy z mitochondrií)

Obr. 3.19 Potenciálová sonda DiOC₆(3)



Materiál:

- DiOC₆(3) jodid (Sigma)
- valinomycin (MW = 1111,36, Sigma)

- ouabain (MW = 584,2, Sigma)
- Triton X 100 (Merck)
- Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences)
- centrifuga
- pufr A (120 mmol/l NaCl, 10 mmol/l KCl, 30 mmol/l Tris HCl, pH 7,4) s 1% glukózou
- pufr B (120 mmol/l NaCl, 120 mmol/l KCl, 30 mmol/l Tris HCl, pH 7,4) s 1% glukózou
- skleněné zkumavky, mikropipety, ...

Postup:

Izolace lymfocytů z plné krve

1. krev odebrat do citrátového roztoku (nesrážlivá krev)
2. promíchat 10 ml krve a 10 ml pufru A
3. přidat 15 ml Ficoll-Paque Plus do průhledné centrifugační kyvety a opatrně navrstvit 20 ml zředěné krve
4. centrifugovat při 400g po dobu 30 min při 20 °C
5. odsát horní vrstvu (může být uchována pro pozdější použití)
6. přenést vrstvu s lymfocyty do centrifugační kyvety (cca 10 ml)
7. přidat alespoň 3 objemy pufru A, promíchat
8. centrifugovat při 60-100g po 10 min při 20 °C
9. odstranit supernatant a opakovat promytí
10. suspendovat lymfocyty v pufru A v koncentraci $5 \cdot 10^7$ /ml

Měření změn membránového potenciálu:

1. připravte zásobní roztok 10 mmol/l DiOC₆(3) jodidu v DMSO a z něj pracovní roztok 0,1 mmol/l v etanolu
2. připravte tyto zásobní roztoky: 1 mmol/l valinomycin v etanolu, 2 mmol/l ouabain v pufru A, 10% Triton X 100 v pufru A
3. proveďte tato měření:
 - A) časová závislost fluorescence sondy po přidání k lymfocytům:
 - připravte vzorky s výslednými koncentracemi 10 μmol/l DiOC₆(3), 10^6 lymfocytů/ml
 - změřte excitační a emisní spektra DiOC₆(3) v samotném pufru A a v časech 1, 5, 10 a 30 minut po přidání lymfocytů
 - B) vliv depolarizace membrány na fluorescenci DiOC₆(3):
 - smíchejte jednotlivé složky podle Tabulky 3.7 ve výsledných koncentracích: 10^6 lymfocytů/ml, 0,2 μmol/l DiOC₆(3), 1 μmol/l valinomycin, 100 μmol/l ouabain, 0,01% Triton X 100
 - inkubujte ve tmě 30 min v 37 °C
 - promyjte dvakrát v pufru A nebo B (centrifugací 10 min, 100 g, 20 °C) a sediment resuspendujte v původním objemu pufru A nebo B
 - s polarizátorem orientovaným svisle a analyzátozem pootočeným o „magický“ úhel 54,74° změřte excitační a emisní spektra nebo intenzitu fluorescence DiOC₆(3) při buzení $\lambda_{ex}^{max} = 484$ nm a $\lambda_{em}^{max} = 519$ nm; při 37 °C
 - C) vliv Tritonu X 100 na fluorescenci DiOC₆(3):
 - změřte excitační a emisní spektra DiOC₆(3) v pufru A bez lymfocytů v přítomnosti 0,01% a 0,1% Tritonu X 100

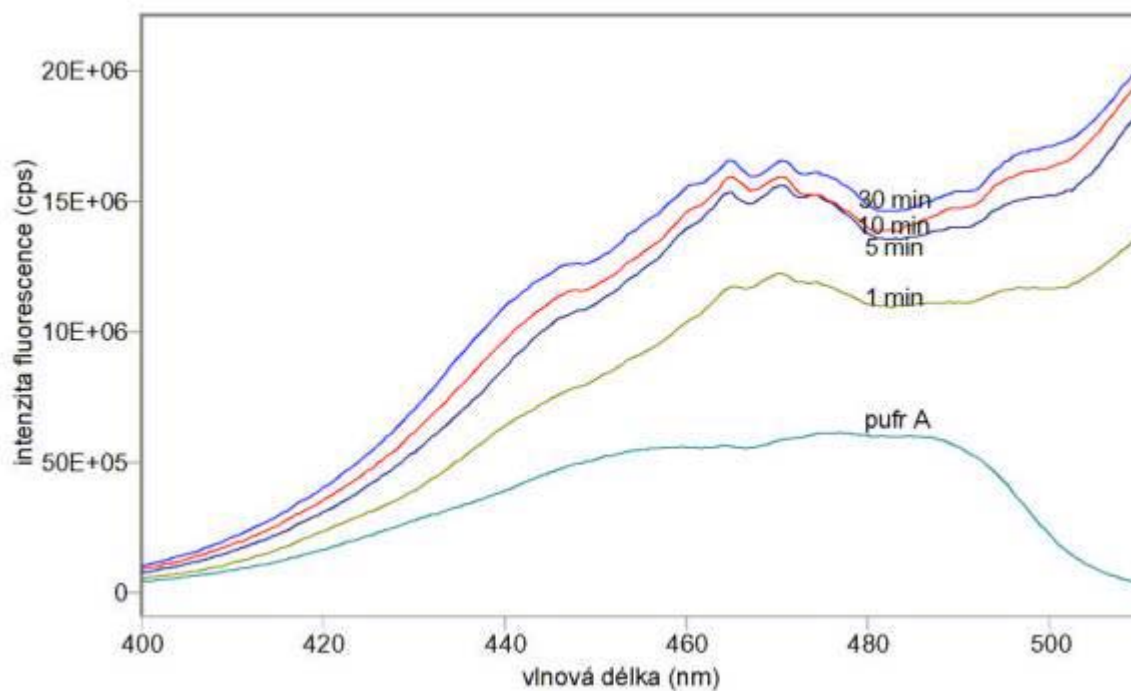
Tabulka 3.7

č.	pufr A	pufr B	lymfocyty	valinomycin	ouabain	Triton X 100	DiOC ₆ (3)
1	4890	0	100	0	0	0	10
2	4885	0	100	5	0	0	10
3	4640	0	100	0	250	0	10
4	4885	0	100	0	0	5	10
5	0	4890	100	0	0	0	10
6	0	4885	100	5	0	0	10

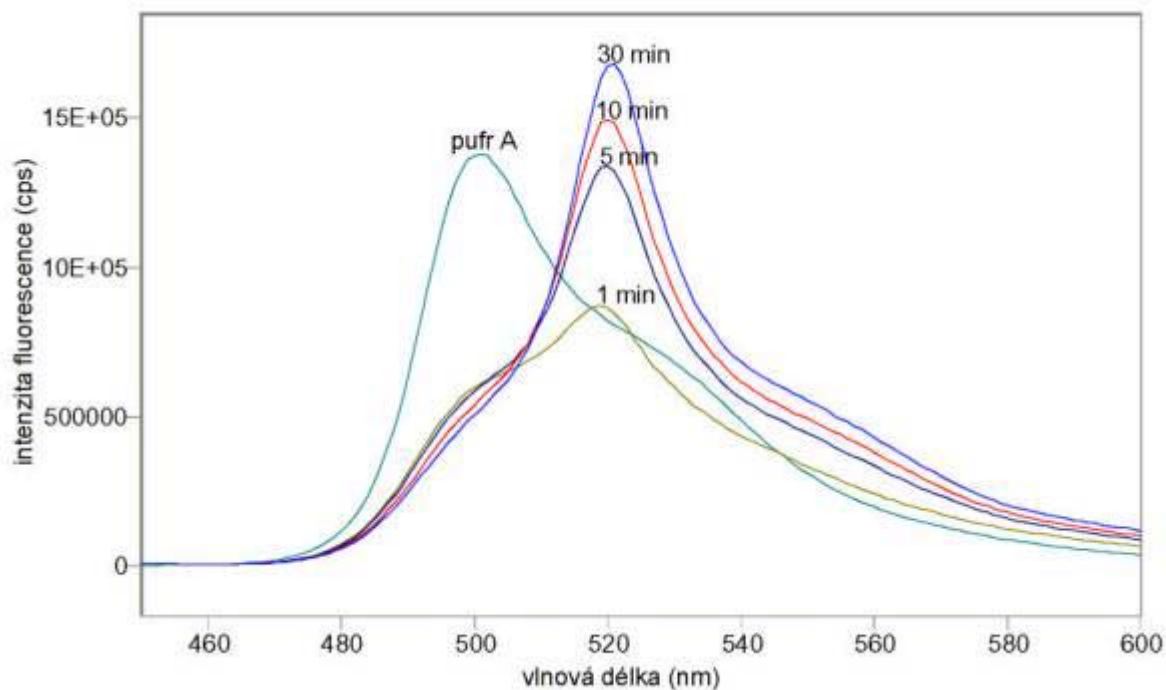
Výsledky:

- A) Na obr. 3.20 a 3.21 jsou excitační a emisní spektra sondy DiOC₆(3) v koncentraci 10 μmol/l v samotném pufru A bez buněk a v různých časech po přidání lymfocytů v koncentraci 10⁶/ml. Na obr. 3.22 jsou emisní spektra téhož vzorku v různých časech po přidání 0,01% Tritonu X 100. Při těchto měřeních nebyla odstraňována volná sonda.
- B) Na obr. 3.23 a 3.24 jsou excitační a emisní spektra sondy DiOC₆(3) přidané k lymfocytům v konečné koncentraci 200 nmol/l a vliv depolarizace membrány na tato spektra po přidání valinomycinu, ouabainu nebo Tritonu X 100 (dle Tabulky 3.7). Výsledky ukazují, že na fluorescenci DiOC₆(3) v lymfocytech nemá valinomycin výrazný vliv, zatímco depolarizace způsobená inkubací buněk s ouabainem nebo v pufru s vysokým obsahem K⁺ způsobuje výrazné snížení fluorescence této sondy. Největší změna byla způsobena Tritonem X 100, který ale buňky zcela likviduje. Ve všech případech byly lymfocyty po 30 minutové inkubaci v 37 °C dvakrát promyty puftrem pro odstranění mimobuněčné sondy.
- C) Na obr. 3.25 a 3.26 jsou excitační a emisní spektra sondy DiOC₆(3) přidané k pufru A (bez buněk) v konečné koncentraci 200 nmol/l před a po přidání různých koncentrací Tritonu X 100. Výsledky ukazují, že samotný detergent velmi zvyšuje kvantový výtěžek fluorescence sondy DiOC₆(3), což se musí brát v úvahu v experimentech, kdy Triton X 100 není dostatečně odmyt ze vzorku.

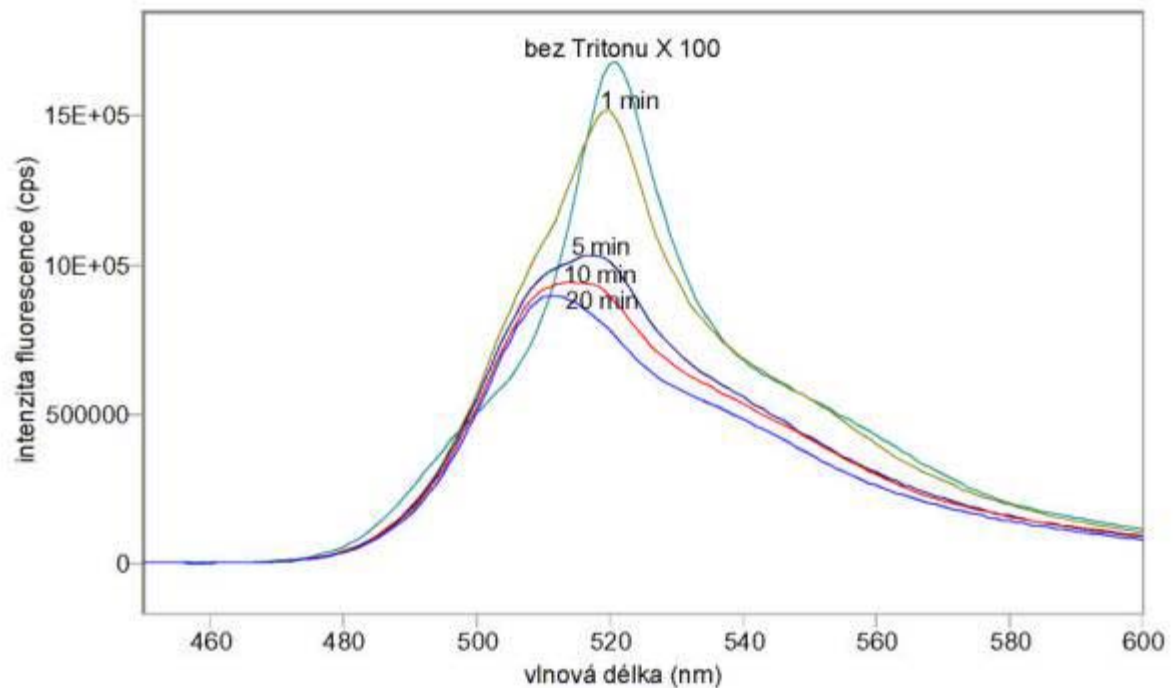
Obr. 3.20 Excitační spektra ($\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$) potenciálové sondy DiOC₆(3) v pufru A před přidáním a v různých časech po přidání lymfocytů



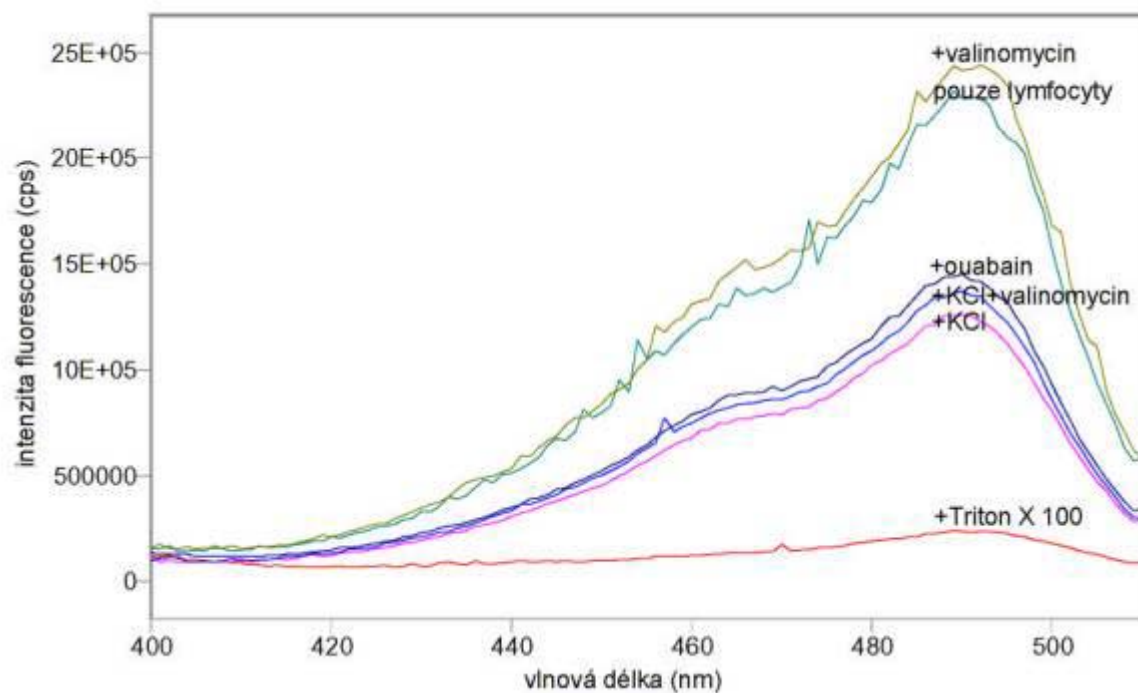
Obr. 3.21 Emisní spektra ($\lambda_{ex} = 440 \text{ nm}$) potenciálové sondy DiOC₆(3) v pufru A před přidáním a v různých časech po přidání lymfocytů



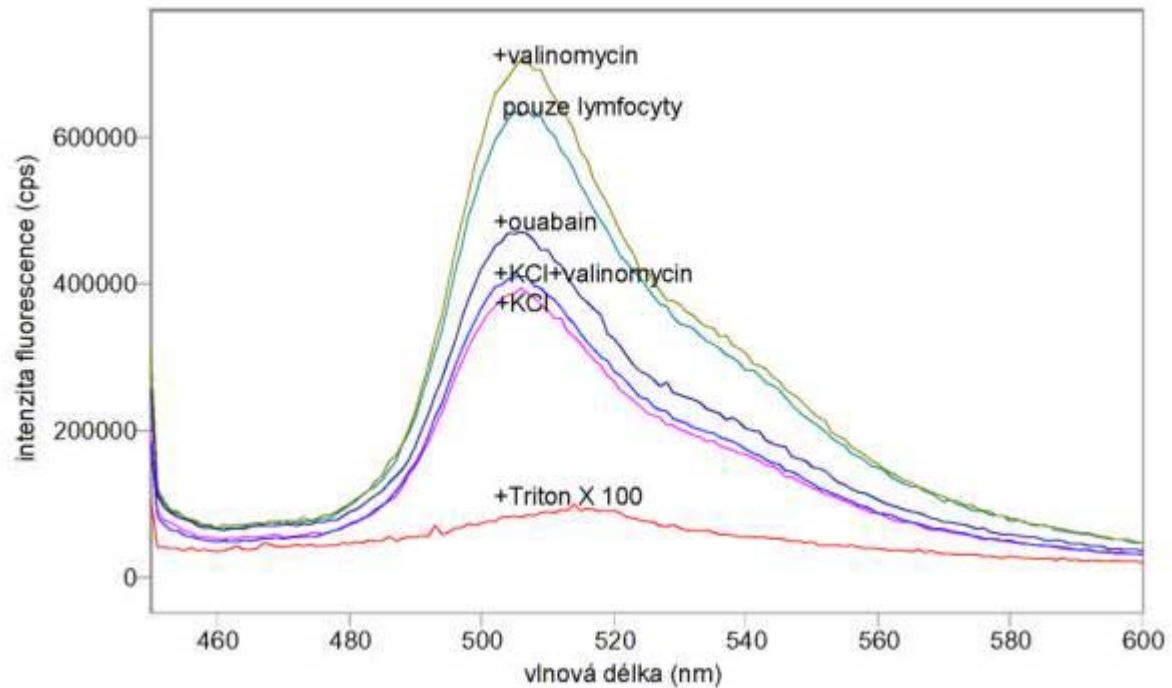
Obr. 3.22 Emisní spektra ($\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$) potenciálové sondy DiOC₆(3) v pufru A s lymfocyty před přidáním a v různých časech po přidání 0,01% Tritonu X 100



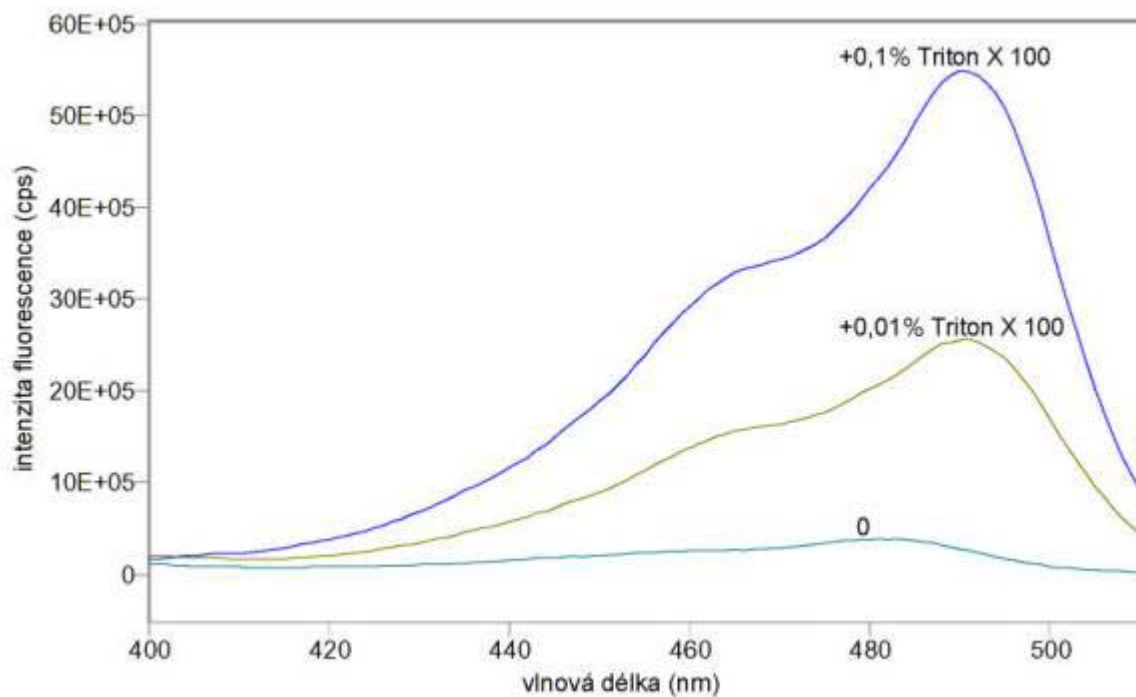
Obr. 3.23 Excitační spektra ($\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$) potenciálové sondy DiOC₆(3) v lymfocytech inkubovaných: 1) v pufru A (pouze lymfocyty), 2) s 1 $\mu\text{mol/l}$ valinomycinem v pufru A (+valinomycin), 3) se 100 $\mu\text{mol/l}$ ouabainem v pufru A (+ouabain), 4) s 0,01% Tritonem X 100 v pufru A (+Triton X 100), 5) v pufru B (+KCl) a 6) v pufru B s 1 $\mu\text{mol/l}$ valinomycinem (+KCl+valinomycin)



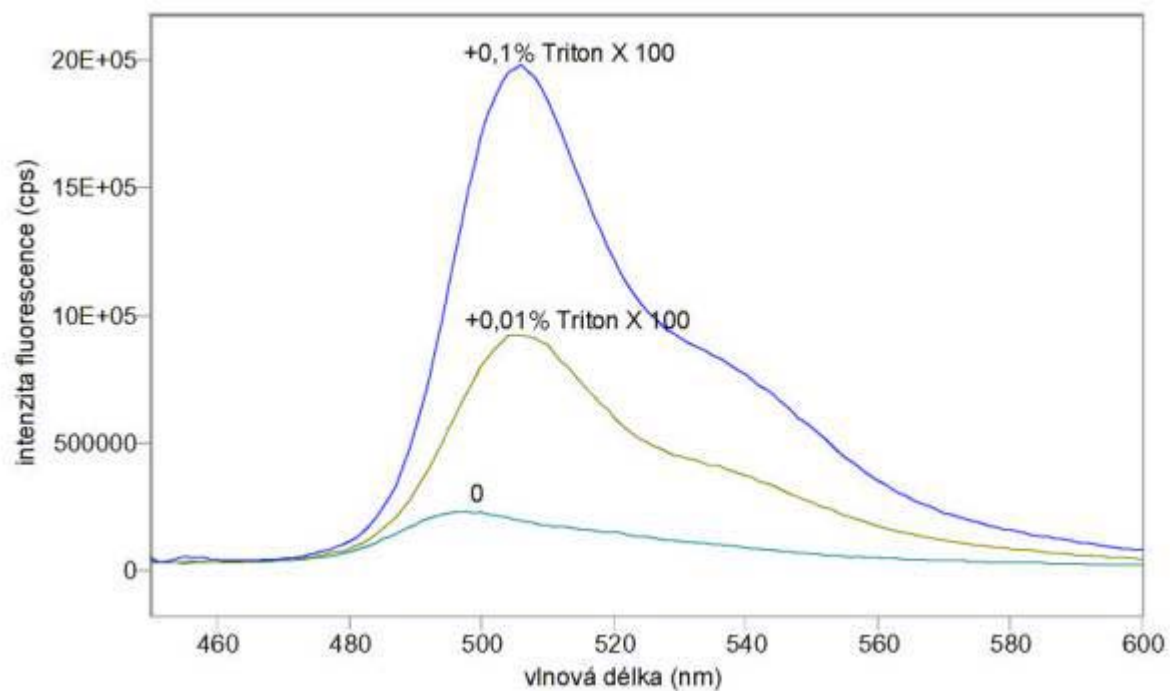
Obr. 3.24 Emisní spektra ($\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$) potenciálové sondy DiOC₆(3) v lymfocytech inkubovaných: 1) v pufru A (pouze lymfocyty), 2) s 1 $\mu\text{mol/l}$ valinomycinem v pufru A (+valinomycin), 3) se 100 $\mu\text{mol/l}$ ouabainem v pufru A (+ouabain), 4) s 0,01% Tritonem X 100 v pufru A (+Triton X 100), 5) v pufru B (+KCl) a 6) v pufru B s 1 $\mu\text{mol/l}$ valinomycinem (+KCl+valinomycin)



Obr. 3.25 Excitační spektra ($\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$) potenciálové sondy DiOC₆(3) v pufru A při různých koncentracích Tritonu X 100



Obr. 3.26 Emisní spektra ($\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$) potenciálové sondy DiOC₆(3) v pufru A při různých koncentracích Tritonu X 100



3.8. Změny pH

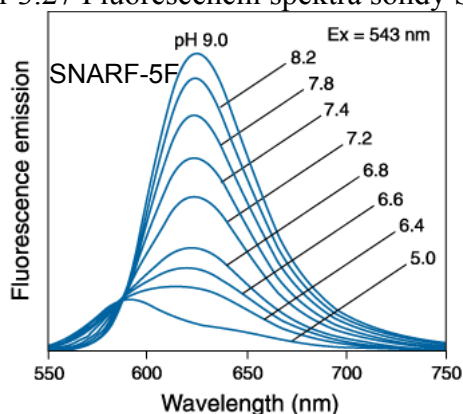
Sondy pro měření změn pH jsou popsány v kapitole 2.3.6. V tomto experimentu je ilustrována citlivost fluorescenčních sond pro měření pH. s použitím sondy SNARF-5F.

SNARF-5F patří do skupiny **seminaftorhodafluorů**, což je relativně nová skupina fluorescenčních indikátorů pH vyznačující se výraznými posuvy jak v absorpčním, tak v emisním spektru. Jedná se o sondy vhodné pro tzv. poměrná měření, kdy z poměru intenzit fluorescence měřené při dvou různých vlnových délkách emise lze zjistit pH okolního prostředí. Fluorescenční je jak kyselá, tak zásaditá forma těchto sond. Pro lepší prostupnost dovnitř živých buněk lze použít jejich acetoxymetylové (AM) nebo acetátové estery.

Vlastnosti sondy SNARF-5F:

- MW = 471,44
- nízká rozpustnost ve vodě
- zásobní roztok: pH > 6
- patří do skupiny seminaftorhodafluorů
- absorpční maximum v kyselém/neutrálním roztoku: $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 555 \text{ nm}$ (molární extinkční koeficient: $27000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)
- fluorescenční emisní maximum v kyselém/neutrálním roztoku: $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 590 \text{ nm}$
- absorpční maximum v zásaditém roztoku: $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 579 \text{ nm}$ (molární extinkční koeficient: $49000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)
- fluorescenční emisní maximum v zásaditém roztoku: $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 630 \text{ nm}$
- $\text{pK}_a = 7,2$

Obr 3.27 Fluorescenční spektra sondy SNARF-5F při různých pH



(Podle: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.)

Materiál:

- SNARF®-5F 5-(a 6)-karboxylová kyselina (Molecular Probes)
- skleněné zkumavky, mikropipety, ...
- pufrý s upraveným pH 5 až 9

Postup:

1. připravte zásobní roztok 2 mmol/l SNARF-5F v DMSO (dimetylsulfoxid)
2. do 5 ml pufru (pH = 5 – 9) přidejte (Hamiltonovou stříkačkou) 10 μl sondy SNARF-5F v konečné koncentraci 4 $\mu\text{mol/l}$

3. změřte excitační fluorescenční spektra vzorků při $\lambda_{em} = 630 \text{ nm}$
4. změřte emisní fluorescenční spektra vzorků při $\lambda_{ex} = 540 \text{ nm}$

Výsledky:

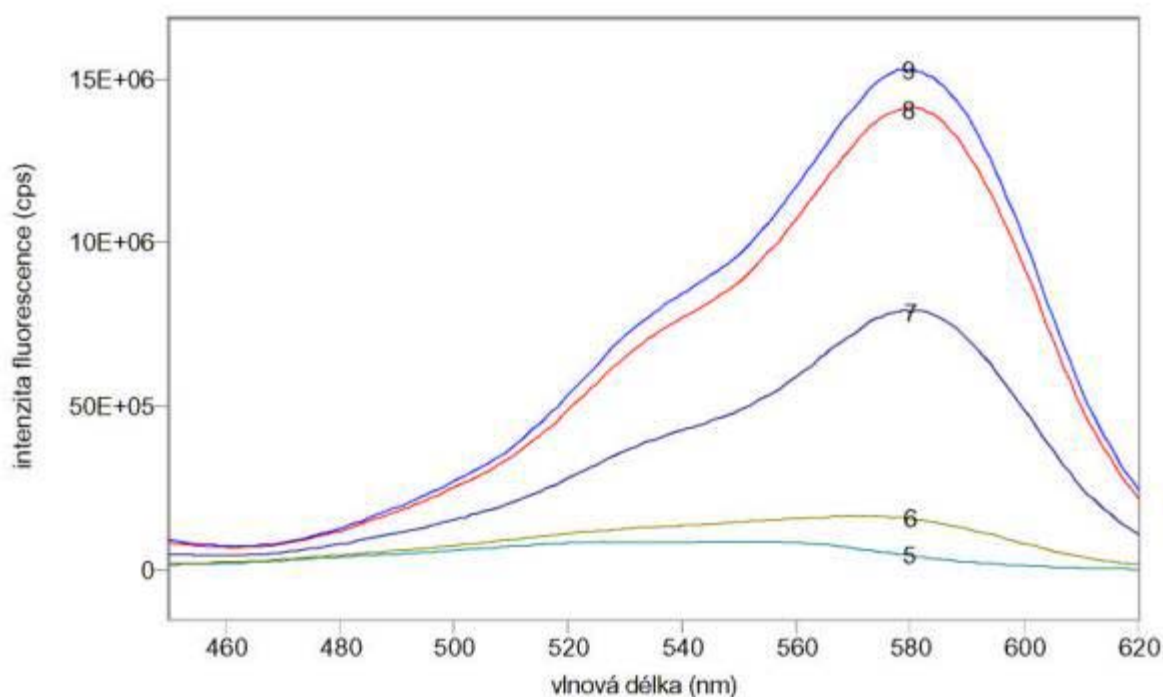
Změřená excitační a emisní spektra sondy SNARF-5F při různých pH jsou uvedena na obr. 3.28 a 3.29. Měření byla provedena na spektrofluorimetru FluoroMax-3.

Sondy typu SNARF lze použít pro měření pH změřením poměru intenzit fluorescence při emisních vlnových délkách 580 a 640 nm; závislost poměru emisních intenzit na pH není lineární, jak je vidět z obr. 3.30. Kalibraci fluorescenční odezvy SNARF-5F lze provést pomocí pufrů s různými pH, v nichž je měřen poměr intenzit fluorescence při dvou různých vlnových délkách ($\lambda_1=580 \text{ nm}$, $\lambda_2=640 \text{ nm}$):

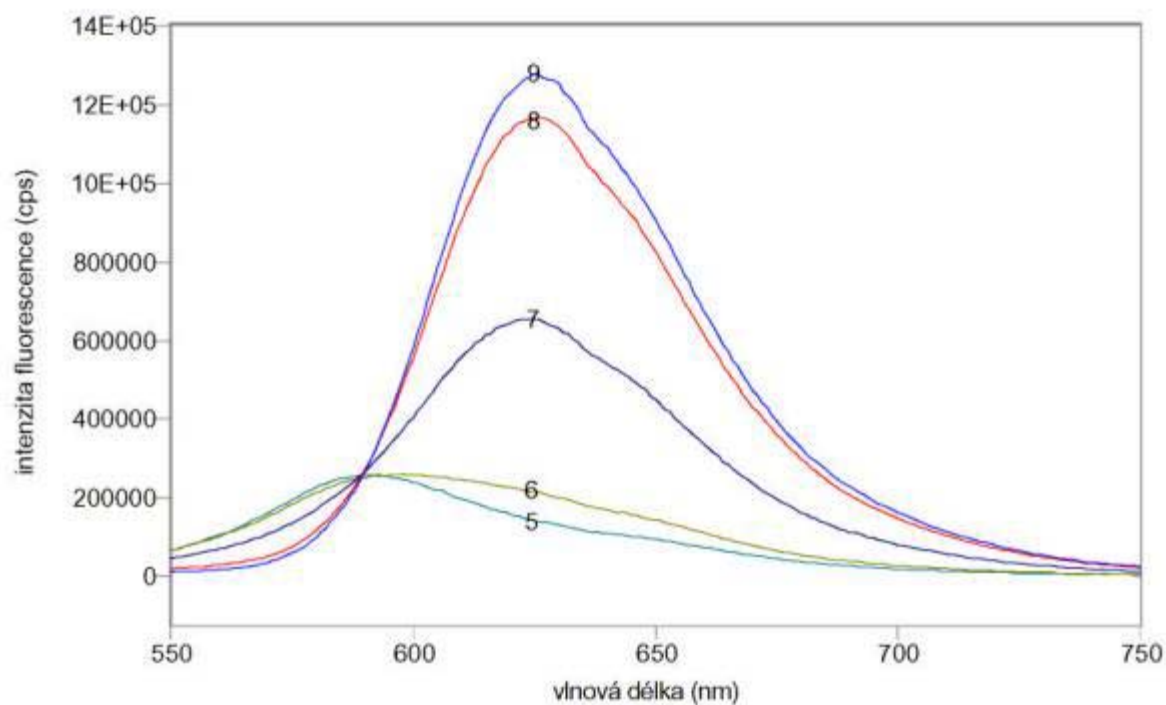
$$(3.1) \quad \text{pH} = \text{p}K_a - \log\left[\frac{(R-R_B)}{(R_A-R)} \cdot \frac{I_B(\lambda_2)}{I_A(\lambda_2)}\right]$$

kde je R poměr intenzit fluorescence při dvou různých vlnových délkách ($I(\lambda_1)/I(\lambda_2)$), indexy A a B označují limitní hodnoty v kyselé a zásadité oblasti titrační křivky; pro SNARF-5F je $\text{p}K_a=7,2$. Korekce na fluorescenci pozadí musí provedena před výpočtem poměrů R.

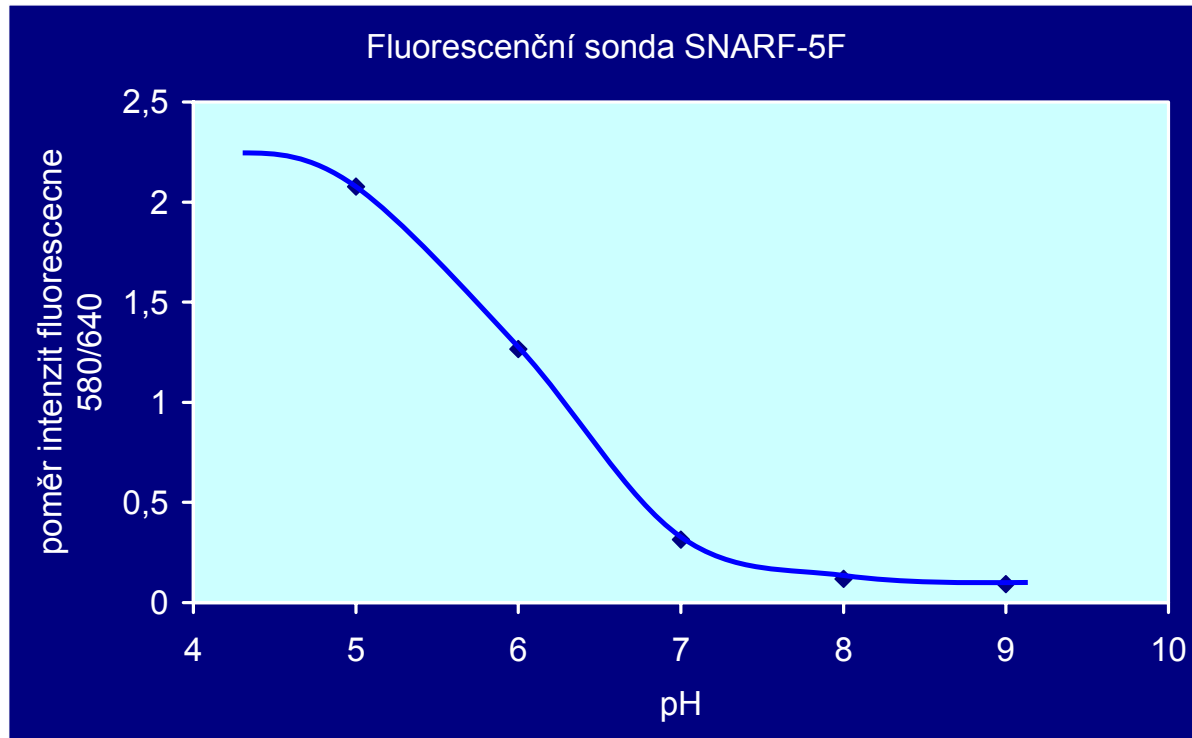
Obr. 3.28 Excitační fluorescenční spektra 4 $\mu\text{mol/l}$ SNARF-5F ($\lambda_{em} = 630 \text{ nm}$) při různých hodnotách pH roztoku.



Obr. 3.29 Emisní fluorescenční spektra 4 $\mu\text{mol/l}$ SNARF-5F ($\lambda_{\text{ex}} = 540 \text{ nm}$) při různých hodnotách pH roztoku.



Obr. 3.30 Závislost poměru intenzit fluorescence sondy SNARF-5F měřených při 580 a 640 nm na pH



3.9. Propustnost membrán

Karboxyfluorescein nebo calcein jsou zadržovány uvnitř neporušených buněk nebo lipidových vesíků (viz též kap. 2.3.1). Fluorescence těchto látek je přitom >95% zhasána při koncentracích nad 100 mmol/l. Propustnost lipidových dvojvrstev pro takové fluorofory lze studovat tímto způsobem: koncentrovaný roztok fluoroforu ve vodě se uzavře v liposomech, které se potom oddělí od neuzavřeného barviva gelovou filtrací nebo centrifugací. Uvolňování fluoroforu z liposomů je potom provázáno zvyšováním intenzity fluorescence. Lze sledovat jak spontánní uvolňování, tak uvolňování vyvolané jinou látkou. Kompletní lýzu lze uskutečnit přidáním detergentu, Tritonu X-100.

Vlastnosti sondy 5-(a 6)-karboxyfluorescein (5(6)-FAM):

- MW = 376,32
- střední rozpustnost ve vodě; zásobní roztok v dimethylformamidu, pH>6
- absorpční maximum v kyselém/neutrálním roztoku: $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 475 \text{ nm}$ (molární extinkční koeficient: $28000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)
- fluorescenční emisní maximum v kyselém/neutrálním roztoku: $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 517 \text{ nm}$
- absorpční maximum v zásaditém roztoku: $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 492 \text{ nm}$ (molární extinkční koeficient: $75000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)
- fluorescenční emisní maximum v zásaditém roztoku: $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 517 \text{ nm}$
- $\text{pK}_a = 6,4$

Materiál:

- 5-(a 6)-karboxyfluorescein (Fluka)
- fosfatidylcholin (Sigma)
- Triton X-100
- pufr A (120 mmol/l NaCl, 10 mmol/l KCl, 30 mmol/l Tris HCl, pH 7,4)
- skleněné zkumavky, mikropipety, ...

Postup:

1. připravte roztok 100 mmol/l 5-(a 6)-karboxyfluoresceinu v pufru A s pH zvýšeným na 9
2. připravte 10% roztok Tritonu-X v pufru A
3. připravte velké mnohvrstevné liposomy z fosfatidylcholinu, kdy jako vodný roztok použijte 100 mmol/l karboxyfluorescein:
 - přenést 2 mg fosfolipidu ve směsi chloroform/metanol (2:1) do skleněné nádoby a rozpouštědlo odpařit proudem dusíku při teplotě kolem 40 °C tak, aby na stěně nádoby vznikla tenká vrstva fosfolipidu
 - nádobku umístit po několik hodin ve vakuu, aby byly odstraněny zbytky rozpouštědla
 - přidat 2 ml 100 mmol karboxyfluoresceinu a vzorek inkubovat v 50 °C po dobu 5 minut
 - intenzivně třepat a nakonec krátce sonikovat (cca 5 s) v sonikátoru XL 2020 (Heat Systems - Ultrasonics) na stupni 4
 - inkubovat vzorek v 50 °C po dobu 30 minut a poté jej krátce protřepat
4. liposomy promyjte 2 krát pufrům A (centrifugací při 30000 g, 15 min, 20 °C)
5. liposomy naředíte pufrům A na výslednou koncentraci fosfatidylcholinu 100 $\mu\text{mol/ml}$
6. v časech 30, 60, 90 a 120 minut po naředění liposomů změřte excitační a emisní spektra nebo intenzitu fluorescence karboxyfluoresceinu při buzení $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$;

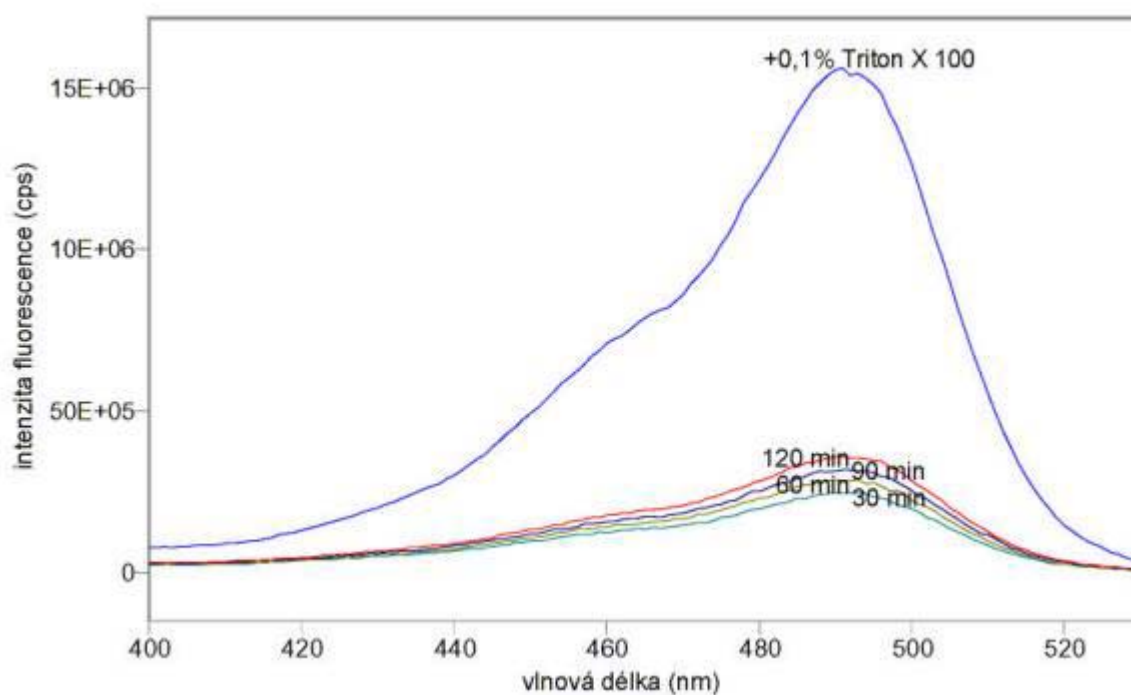
při 20 °C; s polarizátorem orientovaným svisle a analyzátozem pootočeným o „magický“ úhel 54,74°

7. přidejte Triton X-100 v konečné koncentraci 0,1% a znovu změřte fluorescenci karboxyfluoresceinu

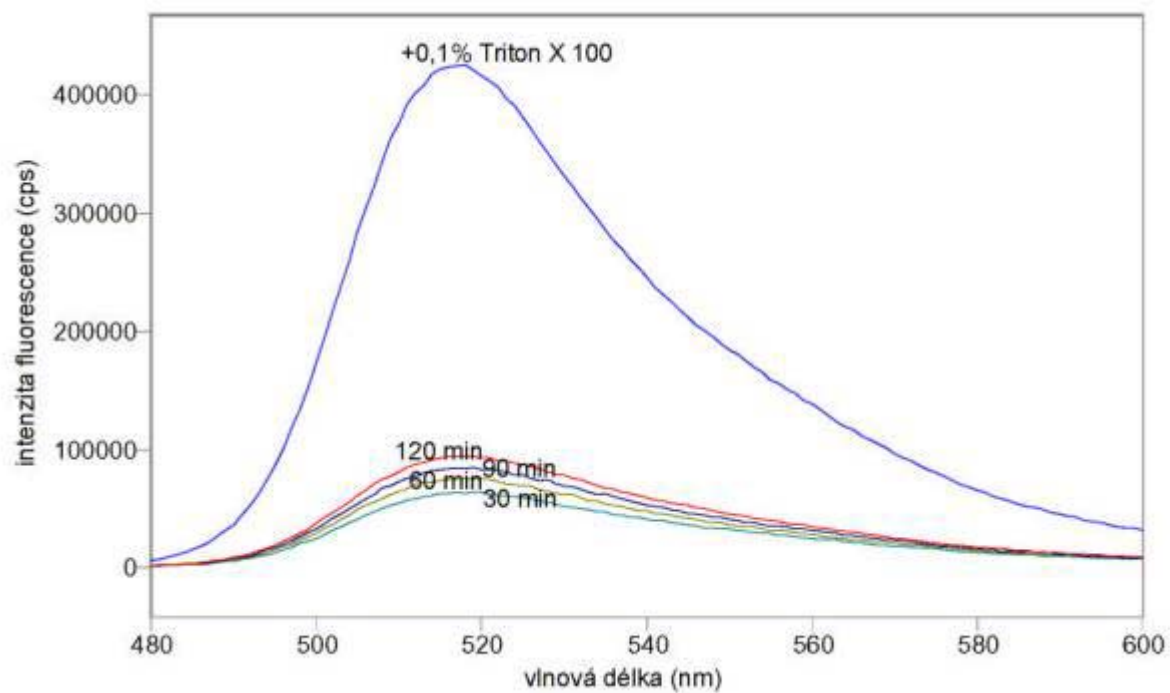
Výsledky:

Na obr. 3.31 a 3.32 jsou excitační a emisní spektra 5-(a 6)-karboxyfluoresceinu uvolňovaného z mnohvrstevných fosfatidylcholinových liposomů obsahujících koncentrovaný fluorofor jednak spontánně (v časech 30, 60, 90 a 120 min po naředění liposomů puftrem A), jednak po destrukci liposomů 0,1% Tritonem X 100.

Obr 3.31 Excitační fluorescenční spektra ($\lambda_{em} = 540$ nm) 5-(a 6)-karboxyfluoresceinu uvolňovaného z mnohvrstevných liposomů spontánně v časech 30, 60, 90 a 120 minut po naředění liposomů a po úplném uvolnění působením 0,1% Tritonu X 100.



Obr 3.32 Emisní fluorescenční spektra ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$) 5-(a 6)-karboxyfluoresceinu uvolňovaného z mnohovrstevných liposomů spontánně v časech 30, 60, 90 a 120 minut po naředění liposomů a po úplném uvolnění působením 0,1% Tritonu X 100.



3.10. Speciální experimenty

3.10.1. Vazebné parametry receptorů

Membránové receptory pro neurotransmitery lze charakterizovat jejich afinitou K_a (nebo disociační konstantou $K_d = 1/K_a$) k neurotransmitteru či jinému ligandu a vazebnou kapacitou B_{max} . K_a charakterizuje sílu vazby ligandu ke specifickému vazebnému místu na receptoru a B_{max} odpovídá denzitě receptorů v membráně. Disociační konstanty neurotransmitterových receptorů leží obvykle v nanomolární oblasti a pro jejich měření tedy potřebujeme detekovat subnanomolární koncentrace vzájemících se látek. Vazebné parametry receptorů se proto běžně určují pomocí ligandů, které k nim mají specifickou vazbu a které jsou značeny radionuklidy (obvykle agonisté nebo antagonisté receptorů). Metoda vazby radioligandu je velmi dobře rozpracována a popsána (např. v monografii [Neurotransmitter Receptor Binding, Yamamura, H.I., Enna, S.J. and Kuhar, M.J., eds., 2nd ed., Raven Press, New York, 1985]. Citlivost fluorescenční spektroskopie však umožňuje tato měření provádět i pomocí fluorescenčních ligandů (viz kap. 2.3.2), neboť za optimálních podmínek lze měřit i femtomolární koncentrace fluoroforů. Problém je dosud v nedostatečném počtu fluorescenčně značených ligandů pro neurotransmitterové receptory a větší pracnosti experimentu.

V tomto experimentu je popsán postup měření vazebných parametrů α_1 -adrenergických receptorů v lymfocytech pomocí jejich antagonisty - prazosinu fluorescenčně značeného látkou BODIPY FL. Postup je analogický postupu u metody vazby radioligandu, tj. měří se koncentrační závislost vazby ligandu k buněčným membránám. Pro oddělení volného a navázaného ligandu byla použita technika rychlé filtrace, která umožňuje velmi rychlé a snadné oddělení volného a vázaného ligandu za předpokladu, že použitý filtr je schopen zachytit částice, k nimž se ligand váže a současně je jeho propustnost dostatečná pro rychlý průchod promývací tekutiny. Pro záchyt lymfocytů jsme použili skleněné mikrovláknité filtry GF/C (Whatman), které byly impregnovány 0,1% polyetyleniminem pro snížení vazby volného ligandu na filtr. Vzorky byly naředěny 3 ml pufru A, filtrovány a filtry se zachycenými lymfocyty byly dvakrát promyty ledovým pufrem A (2 x 3 ml). Celková doba filtrace byla <10 sec., což umožňuje spolehlivé měření vazebných procesů s disociační konstantou 10^{-8} mol/l. Filtry byly umístěny do zkumavek a zhomogenizovány v 5 ml metanolu. Po centrifugaci byly 4 ml metanolu měřeny na spektrofluorimetru ($\lambda_{ex} = 490$ nm, $\lambda_{em} = 511$ nm).

Nespecifická vazba byla určena jako vazba BODIPY FL prazosinu v přítomnosti nadbytku (10 μ mol/l) neznačeného prazosinu. Tato vazba byla odečtena od celkové vazby a data byla vyhodnocena. Vyhodnocení dat je rovněž analogické jako při použití metody vazby radioligandu. Parametry vazebných izoterm B_{max} a K_d byly spočteny metodami nelineární regresní analýzy s použitím programu AccuFit Saturation Two-Site (Beckman). Bylo použito označení běžné pro ligand-receptorové studie:

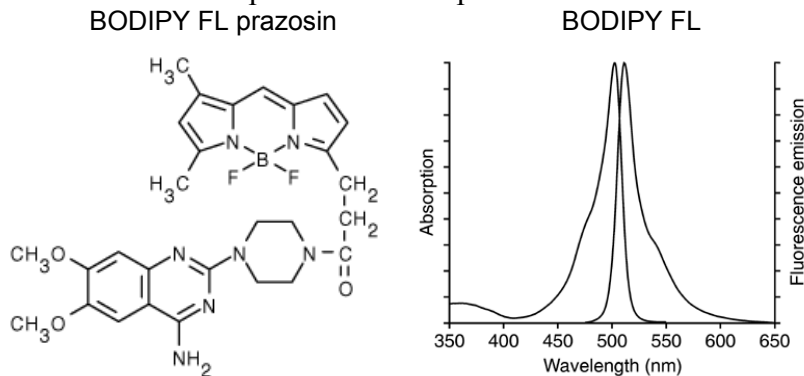
$$(3.2) \quad B = B_{max} \cdot F / (K_d + F)$$

kde je B - množství prazosinu navázaného k 10^6 lymfocytů, F - koncentrace volného prazosinu, B_{max} - maximální počet vazebných míst (vazebná kapacita) a K_d - rovnovážná disociační konstanta.

Vlastnosti BODIPY FL prazosinu:

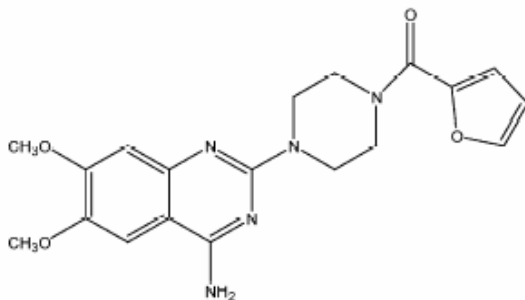
- MW = 563,41
- rozpouštědlo pro zásobní roztok: dimethylsulfoxid (DMSO) nebo etanol (EtOH)
- rozpouštědlo pro spektroskopická měření: metanol (MeOH)
- absorpční maximum v metanolu: $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 504 \text{ nm}$ (molární extinkční koeficient: $77000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)
- fluorescenční emisní maximum v metanolu: $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 511 \text{ nm}$
- rozpustnost ve vodě je nízká
- antagonist α_1 -adrenoceptorů

Obr. 3.33 BODIPY FL prazosin a absorpční e emisní fluorescenční spektrum BODIPY FL.



(Podle: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.)

Obr. 3.34 Vzorec prazosinu



Materiál:

- BODIPY FL prazosin (Molecular Probes)
- prazosin (MW = 419,9, Sigma; rozpustný ve vodě do 0,5 mg/ml, v metanolu do 6 mg/ml)
- skleněné mikrovlnné filtry Whatman GF/C
- filtrační zařízení
- Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences)
- metanol
- skleněné zkumavky, mikropipety, ...
- centrifuga
- pufr A (120 mmol/l NaCl, 10 mmol/l KCl, 30 mmol/l Tris HCl, pH 7,4)

Postup:

Izolace lymfocytů z plné krve

1. krev odebrat do citrátového roztoku (nesrážlivá krev)
2. promíchat 2 ml krve a 2 ml pufru A

3. přidat 3 ml Ficoll-Paque Plus do zkumavky a opatrně navrstvit 4 ml zředěné krve
4. centrifugovat při 400g po dobu 30 min při 20 °C
5. odsát horní vrstvu (může být uchována pro pozdější použití)
6. přenést vrstvu s lymfocyty do centrifugační kyvety (cca 2 ml)
7. přidat alespoň 3 objemy pufru A, promíchat
8. centrifugovat při 60-100g po 10 min při 20 °C
9. odstranit supernatant a opakovat promytí
10. suspendovat lymfocyty v pufru A v koncentraci $5 \cdot 10^7/\text{ml}$

Vazba prazosinu na lymfocyty

1. veškerá práce se dělá v ledové lázni (cca 2 °C)
2. připravit roztoky v pufru A:
 - 50 $\mu\text{mol/l}$ prazosin
 - 100 nmol/l BODIPY FL prazosin
 - 5 nmol/l BODIPY FL prazosin
3. do skleněných zkumavek pipetovat vzorky dle Tabulky 3.8; vazba se startuje přidáním BODIPY FL prazosinu
4. standardy: stejná množství BODIPY FL prazosinu jako byla přidána ke vzorkům pipetovat rovněž do prázdných vialek
5. nechat inkubovat 30 min ve 2°C a poté přidat 3 ml ledového pufru A a vzorek filtrovat přes GF/C filtry impregnované 0,1% polyetyleniminem
6. filtry ještě dvakrát promýt 3 ml pufru A a potom je umístit do skleněných vialek
7. k filtrům i ke standardům přidat 5 ml metanolu; filtry homogenizovat (turaxovat), nechat přes noc ve tmě, centrifugovat a odebrat supernatant pro měření
8. měřit fluorescenci BODIPY FL prazosinu v metanolu ($\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 511 \text{ nm}$)
9. analýza dat: spočítat parametry K_d a B_{max} pomocí nelineární regrese (analogicky, jako se dělá v metodě vazby radioligandu)

Tabulka 3.8

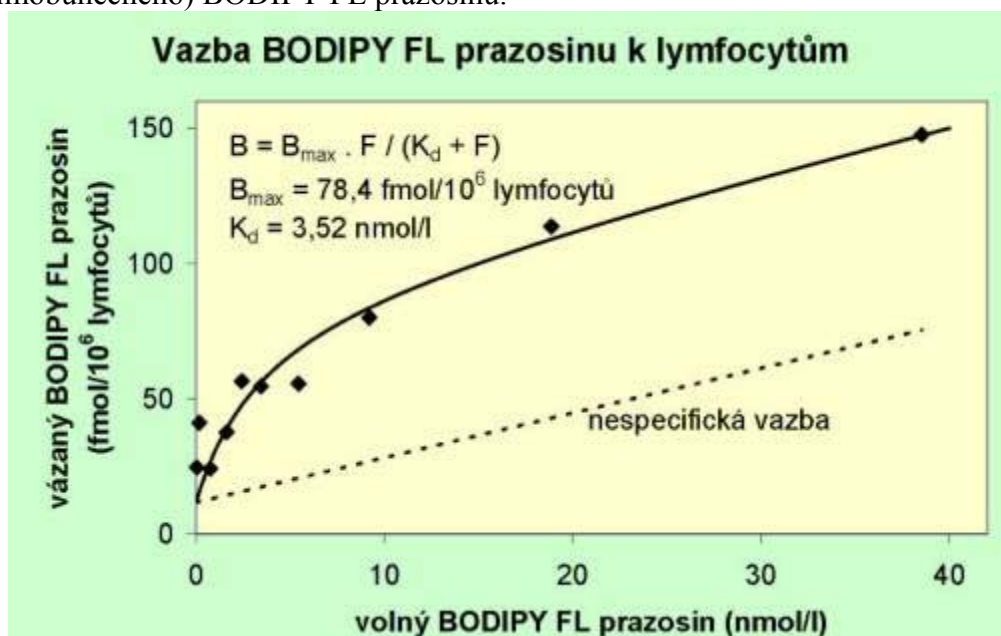
č. vzorku	pufr A	lymfocyty ($5 \cdot 10^7/\text{ml}$)	prazosin ($50 \mu\text{mol/l}$)	BODIPY FL prazosin (5 nmol/l)	BODIPY FL prazosin (100 nmol/l)	výsledná koncentrace BODIPY FL prazosinu (nmol/l)
celková vazba:						
1	185	50		15		0,3
2	170	50		30		0,6
3	150	50		50		1
4	100	50		100		2
5	50	50		150		3
6	190	50			10	4
7	185	50			15	6
8	175	50			25	10
9	150	50			50	20
10	100	50			100	40
nespecifická vazba:						
11	135	50	50	15		0,3
12	120	50	50	30		0,6
13	100	50	50	50		1

14	50	50	50	100		2
15	0	50	50	150		3
16	140	50	50		10	4
17	135	50	50		15	6
18	125	50	50		25	10
19	100	50	50		50	20
20	50	50	50		100	40
standardy:						
21				15		
22				30		
23				50		
24				100		
25				150		
26					10	
27					15	
28					25	
29					50	
30					100	

Výsledky:

Na obr 3.35 je vynesena závislost BODIPY FL prazosinu vázaného na lymfocyty proti koncentraci volného (nenavázaného) BODIPY FL prazosinu. Tečkovaně je znázorněna nespecifická vazba, tj. vazba v přítomnosti nadbytku neznačeného prazosinu. Plná čára odpovídá rovnici $B = B_{\max} \cdot F / (K_d + F)$, kde B označuje vázaný a F volný BODIPY FL prazosin. V tomto experimentu tedy vyšla hodnota disociační konstanty pro vazbu prazosinu k lymfocytům $K_d = 3,52 \text{ nmol/l}$ a vazebná kapacita $B_{\max} = 78,4 \text{ fmol}/10^6 \text{ lymfocytů}$.

Obr. 3.35 Závislost BODIPY FL prazosinu vázaného k lymfocytům na koncentraci volného (mimobuněčného) BODIPY FL prazosinu.



3.10.2. Vliv psychotropních látek

Pro in vitro studium interakcí léčiv s lipidovou částí buněčných membrán jsou používány izolované buňky, membrány a modelové systémy. Rozdělení molekul mezi vodnou fází a buněčné membrány je modelováno třemi základními systémy: 1. jednoduché rozdělení v systému voda/organické rozpouštědlo; 2. chromatografické rozdělovací systémy; 3. liposomy. Liposomy jsou široce používaným modelem lipidové části buněčných membrán a umožňují měřit nejen rozdělovací koeficienty, ale i vazebné parametry. Liposomy jsou váčky (vezikuly) uzavírající vodný roztok membránou tvořenou především fosfolipidy. Tvoří se spontánně, když jsou fosfolipidy dispergovány ve vodném prostředí. V závislosti na způsobu přípravy mohou vzniknout liposomy 1. mnohvrstevné (multilamellar vesicles, MLV), 2. malé jednovrstevné (small unilamellar vesicles, SUV) nebo 3. velké jednovrstevné (large unilamellar vesicles, LUV). V našich experimentech jsme použili MLV, které jsou tvořeny vezikuly o velikosti 10^{-1} až 100 μm (příčměž každý váček je tvořen mnoha koncentrickými vrstvičkami lipidových dvojvrstev) a LUV o průměru cca 100 nm. V mnoha experimentech bylo prokázáno, že MLV a LUV jsou dobrým modelem lipidové části buněčných membrán.

Metodou fluorescenčních sond s použitím membránové sondy 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) byl měřen vliv různých koncentrací (10 nmol/l – 100 $\mu\text{mol/l}$) psychotropních látek na mikroviskozitu lipidových membrán připravených z fosfatidylcholinu (PC-LUV, PC-MLV):

- imipramin (IMI)
- amitriptylin (AMI)
- dothiepin (PRO)
- citalopram (CIT)
- chlorpromazin (CPR)
- klozapin (KLO)
- anandamid (ANA)

Materiál:

- 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH, Sigma)
- fosfatidylcholin (PC, Sigma)
- psychotropní látky (různý původ)
- zařízení LiposoFast-Basic
- skleněné zkumavky
- mikropipety
- pufr A (120 mmol/l NaCl, 10 mmol/l KCl, 30 mmol/l Tris HCl, pH 7,4)

Postup:

Postup přípravy liposomů a měření se sondou DPH byl analogický jako je popsáno v kapitole 3.3.

Výsledky:

- výrazné snížení anizotropie fluorescence (zvýšení fluidity) bylo pozorováno při vyšších koncentracích anandamidu
- bez výrazné změny bylo přidání dothiepinu, amitriptylinu a citalopramu
- zvýšená anizotropie fluorescence DPH v membránách byla zjištěna vlivem imipraminu, chlorpromazinu a klozapinu

- s PC-MLV byly pozorovány podobné, pouze méně výraznější, změny r_{DPH} jako s PC-LUV

Tabulka 3.9 Relativní změny anizotropie fluorescence sondy DPH v PC-LUV vyvolané různými koncentracemi psychotropních látek (imipramin (IMI), amitriptylin (AMI), dothiepin (PRO), citalopram (CIT), chlorpromazin (CPR), klozapin(KLO), anandamid (ANA))

Procento změny anizotropie fluorescence DPH v PC-LUV při různých koncentracích psychotropních látek							
konc. ($\mu\text{mol/l}$)	IMI	AMI	PRO	CIT	CPR	KLO	ANA
0,01	-0,09%	-0,09%	-1,05%	-1,00%	-1,25%	-1,20%	0,19%
0,1	-0,03%	-0,34%	0,70%	-3,70%	0,27%	1,19%	-2,27%
1	-0,32%	0,34%	-0,45%	-2,46%	2,16%	2,57%	-2,62%
10	0,94%	1,00%	-2,23%	-3,95%	9,13%	7,01%	-8,41%
100	6,86%	-1,91%	-1,22%	-2,64%	50,50%	57,69%	-29,21%

3.10.3. Vliv podávání antidepresiv

Byly měřeny změny v lipidovém složení plazmatických membrán izolovaných z mozku a změny v jejich mikroviskozitě po dlouhodobém podávání antidepresiv. Laboratorním potkanům byla podávána antidepresiva s různými primárními biochemickými účinky (desipramin, maprotilin, citalopram, moklobemid a lithium) po dobu 4 týdnů. Byly izolovány plazmatické membrány z mozku. Chromatografickou analýzou lipidů z mozkových membrán bylo zjištěno významné snížení relativního zastoupení jednotlivých fosfolipidů vzhledem k celkovým lipidům (fosfolipidy + cholesterol) především po podávání maprotilinu, citalopramu a lithia. Toto snížení bylo způsobeno zvýšením koncentrací cholesterolu. Zvýšení obsahu cholesterolu v mozkových membránách může vést ke změnám v serotonergní neurotransmisi. Naše výsledky podporují hypotézu, že dlouhodobé podávání antidepresiv může způsobit změny v lipidovém složení buněčných membrán, které se mohou transformovat do procesů přímo ovlivňujících serotonergní neurotransmisi v mozku.

Biofyzikální vlastnosti synaptických membrán (strukturu, uspořádání, mikroviskozitu) určují do značné míry esenciální nenasycené mastné kyseliny, cholesterol a glykolipidy. Poměrně malé změny ve struktuře membrán způsobené cholesterolem a zastoupením ω -3, ω -6 a dalších nenasycených mastných kyselin potom mohou modulovat nejen metabolismus biogenních aminů, jejich vazbu nebo zpětné vychytávání, ale i transdukcii signálu, např. vlivem na aktivitu adenylátcykláz a jiných membránových enzymů. V tzv. biofyzikální hypotéze afektivních poruch se uvažuje především o úloze dokosahexaenové kyseliny (22:6 ω -3) a arachidonové kyseliny (20:4 ω -6) ve funkci neuronálních membrán. Byla formulována také hypotéza o vztahu mezi sérovými lipidy, depresí a aterosklerosou. Podle hypotézy o optimální fluiditě membrán závisí maximální receptorová odezva nejen na hustotě receptorových vazebných míst, ale i na jejich přístupnosti pro agonisty rozpuštěné ve vodné fázi a na difúzně kontrolované rychlosti, s níž může docházet ke vzájemným interakcím mezi jednotlivými membránovými složkami podílejícími se na přenosu signálu. Jak dostupnost, tak pohyblivost membránových proteinů přitom závisí na mikroviskozitě lipidové dvojvrstvy. Hypotéza o měnitelné afinitě receptorů vychází z pozorování, že k výrazným změnám v afinitě receptorů vedou rozdíly nejen v chemické struktuře receptoru, ale i v lokálním membránovém mikrookolí a v různých nitrobuněčných procesech. Změny v lipidovém složení plazmatických membrán tedy mohou ovlivňovat přenos signálu a podílet se na terapeutických účincích antidepresiv.

Změna lipidového složení membrán ovlivňuje také aktivitu membránového serotoninového přenašeče (SERT). Tomuto přenašeči je v serotoninových hypotézách afektivních poruch věnována značná pozornost, neboť primárním biochemickým účinkem dnes nejčastěji podávaných antidepresiv, selektivních inhibitorů reuptake serotoninu (SSRI), je inhibice jeho funkce. Bylo popsáno snížení aktivity, denzity a dostupnosti SERT při depresi, nicméně snížení počtu uptake míst pro 5-HT nelze považovat za prokázané. Obvykle jsou měřeny parametry kinetiky transportu 5-HT do trombocytů, o nichž se předpokládá, že odrážejí změny funkce serotonergního systému v mozku. Významným modulátorem funkce SERT je především membránový cholesterol, jehož nižší koncentrace vedou ke snížení aktivity SERT. Propojení změn vlastností buněčných membrán způsobených různým obsahem cholesterolu s aktivitou serotonergního systému by mohlo být mechanismem podílejícím se na zvýšení rizika vzniku deprese spojené se suicidálním chováním při nízkých hladinách sérového cholesterolu. Rovněž snížená spotřeba ω -3 nenasycených mastných kyselin koreluje se zvýšením rizika vzniku deprese.

Metody:

Desipramin, maprotilin, citalopram, moklobemid a lithium byly podávány žaludeční sondou v dávkách 10, 10, 5, 25 a 50 mg/kg den po dobu 4 týdnů. Poté byla zvířata usmrcena a z mozku byly izolovány plazmatické membrány metodou dle Scottové a kol. (1993) s naší modifikací; obohacení vzorků plazmatickými membránami bylo kontrolováno stanovováním aktivity ekto-5'-nukleotidázy (Mitchell a Hawthorne 1965). Relativní změny fluidity membrán byly měřeny metodou fluorescenčních sond. Lipidová část membrán byla izolována modifikovanou Folchovou metodou (Folch et al. 1957; Koul a Prasad 1996). Lipidy byly analyzovány tenkovrstevnou chromatografií s plamenoionizační detekcí (TLC-FID) na zařízení Iatrosan TH10 nebo dvourozměrnou tenkovrstevnou chromatografií na deskách s následným stanovením fosforu a cholesterolu.

Chemikálie a roztoky:

- pufr STM s inhibitory proteáz pro izolaci plazmatických membrán: 0,32 M sacharóza, 10 mmol/l TRIS-HCl, 1 mmol/l MgCl₂, 0,5 mmol/l PMSF, 0,5 mmol/l benzamidin HCl, 1 mmol/l EDTA, 2 mmol/l DTT (dithiothreitol), pH 7,4. Pufr byl připraven den předem, po úpravě pH filtrován přes 0,45 μM filtr a uložen ve 4°C.
- pufr A (120 mmol/l NaCl, 10 mmol/l KCl, 30 mmol/l Tris HCl, pH 7,4).

Metoda fluorescenčních sond

Pro měření relativních změn fluidity plazmatických membrán byla použita metoda fluorescenčních sond s hydrofobní membránovou sondou 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH, Sigma) a se sondou 1-(4-trimetylamonium-fenyl)-6-fenyl-1,3,5-hexatrien (TMA-DPH, Molecular Probes). DPH byl rozpuštěn v acetonu v koncentraci 6 mmol/l a TMA-DPH v metanolu v koncentraci 3 mmol/l a tyto zásobní roztoky byly uloženy v mrazničce. Pro měření byly připraveny vždy čerstvé roztoky sond v pufru A v koncentraci 6 μM (injektováním pomocí Hamiltonovy stříkačky 10 μl za intenzivního míchání). Tyto roztoky byl smíchány s pufrém A a suspenzí liposomů nebo membrán tak, aby výsledná koncentrace sondy byla 2 μM a koncentrace fosfolipidů cca 100 μmol/l. Po 60 minutách inkubace v 37°C byla měřena polarizovaná fluorescence (anizotropie fluorescence) při excitační vlnové délce 350 nm a emisní vlnové délce 450 nm na spektrofluorimetru FluoroMax-3 (Jobin Yvon, Horiba) s polarizačním příslušenstvím. Měření daného vzorku bylo opakováno alespoň 10x a hodnoty byly zprůměrnovány.

Polarizovaná fluorescence roztoků se měří ve směru kolmém ke směru budícího paprsku, který je polarizován ve svislém směru. Je přitom nutno provádět korekci na vliv emisního monochromátoru spektrofluorimetru na polarizaci jím procházejícího záření. **Anizotropie fluorescence** se určuje ze vztahu

$$(1.21) \quad r = (I_{\parallel}^V - G I_{\perp}^V) / ((I_{\parallel}^V + 2 G I_{\perp}^V))$$

kde I_{\parallel}^V a I_{\perp}^V jsou složky světelné intenzity rovnoběžné nebo kolmé k směru (vertikálnímu) polarizace budícího záření a G je korekční faktor, který lze změřit při excitačním záření polarizovaném vodorovně jako poměr $I_{\perp}^H / I_{\parallel}^H$.

Izolace membránových lipidů

Pro izolaci membránových lipidů byla použita modifikovaná metoda podle Folch a kol. (1957) a Koul a Prasad (1996). Stručný postup: vzorky byly turaxovány a po odebrání částí na stanovení koncentrace fosforu (Bartlett 1959, Wagner a kol. 1962) a proteinů (Lowryho et al. 1951) byly centrifugovány 10 min., 20000 g. Supernatant byl odstraněn a pelet roztrpán ve

20 objemech směsi dichlormetan:metanol (2:1, v/v) okyselené 0,25% HCl. V dusíkové atmosféře byly zkumavky jemně míchány v suché lázni při pokojové teplotě po dobu 15-30 min. Denaturované proteiny byly odstraněny filtrací přes gázu a filtrát (cca 5 ml) byl převeden do kalibrované zkumavky, přidány 0,2 objemu vody (cca 1 ml) a promícháno. Centrifugací 5 min. při 1000 g se oddělily fáze. Horní vrstva byla pečlivě odstraněna, čistá dolní fáze přenesena do předvážené očišované lahvičky a odpařena pod dusíkem. Lahvičku se vzorkem byla zvážena a dána do mrazničky pod dusíkem. V celém postupu je nutno se vyhnout použití umělých hmot a minimalizovat přístup kyslíku (probublávat dusíkem).

Analýza membránových lipidů

Pro analýzu membránových lipidů byla použita tenkovrstevná chromatografie, a to buď dvourozměrná chromatografie na skleněných deskách s následným stanovením fosforu a cholesterolu, nebo chromatografie na tyčinkách Chromarods 3 s plamenoionizační detekcí (TLC-FID) na zařízení Iatroscan TH10 (Iatron Laboratories).

Pro dvourozměrnou chromatografii byly použity tyto vyvíjecí směsi: a) pro 1. směr – chloroform : metanol : NH₄OH : H₂O v poměru 70 : 25 : 4 : 1; b) pro 2. směr – chloroform : metanol : aceton : kyselina octová : H₂O v poměru 70 : 12,5 : 17,5 : 10 : 4,5.

Chromatografické desky byly připraveny nanesením 0,5 mm vrstvy směsi 45 g silikagelu H + 5 g magnonu + 126 ml vody. Desky byly vyvíjeny v prvním směru po dobu 1 hod. 20 min. a poté ve druhém směru po dobu 1 hod. 30 min. Detekce byla provedena v parách jódu, skvrny označeny a poté vyškrábány do zkumavek pro stanovení fosforu a cholesterolu.

Pro chromatografii s plamenoionizační detekcí byly použity tyto vyvíjecí směsi: a) pro neutrální lipidy - hexan : éter : kys. mravenčí v poměru 45 : 15 : 0,3; b) pro fosfolipidy I - chloroform : metanol : izopropanol : voda : etylacetát v poměru 20 : 6 : 17 : 4 : 12; c) pro fosfolipidy II - chloroform : metanol : 7 N NH₄OH v poměru 40 : 20 : 3. Po nanesení 1 µl vzorku byly vyvíjeny tyčinky nejprve v soustavě pro neutrální lipidy po dobu 2 x 20 minut a po vyvinutí spáleny na zařízení Iatroscan asi 0,75 cm od startu; byly tak získány píky pro cholesterol; poté byly tyčinky dále vyvíjeny v soustavě pro fosfolipidy I po dobu 2 x 60 minut a potom v soustavě pro fosfolipidy II po dobu 30 minut. Po vysušení byly tyčinky spáleny na zařízení Iatroscan a vyhodnoceny píky pro jednotlivé fosfolipidy.

Výsledky:

Vybrané výsledky jsou uvedeny v Tabulkách 3.10 a 3.11. Jejich podrobnější analýza je předmětem diskuze v připravené publikaci.

Tabulka 3.10 Relativní zastoupení molárních koncentrací jednotlivých fosfolipidů nebo cholesterolu v plazmatických membránách izolovaných z mozku laboratorních potkanů po 4-týdenním podávání různých antidepresiv (vztaženo k celkové molární koncentraci fosfolipidů a cholesterolu).

skupina	PC	PE	SM	PI	PS	SUM	CH
KONTROLY	0.208	0.042	0.075	0.044	0.043	0.412	0.369
DESIPRAMIN	0.202	0.036	0.076	0.038	0.033	0.386	0.331
MAPROTILIN	0.167	**0.019	0.065	0.036	*0.023	*0.311	0.373
CITALOPRAM	0.181	*0.024	0.061	0.041	0.047	0.353	0.402
MOCLOBEMID	0.186	*0.024	0.068	0.039	0.048	0.364	0.374
LiCO ₃	0.166	0.031	0.063	0.033	0.040	0.333	0.419

Průměry byly spočteny z 15 hodnot pro kontrolní skupinu a z 6 hodnot pro každou další skupinu. PC - fosfatidylcholin; PE - fosfatidyletanolamin; SM - sfingomyelin; PI - fosfatidylinositol; PS - fosfatidylserin; SUM - suma molárních koncentrací

(PC+PE+SM+PI+PS); CH - cholesterol. Suma cholesterolu a celkových fosfolipidů (CH+PL) byla použita jako 100%. Jsou označeny hodnoty statisticky významně odlišné od kontrol (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; Mannův-Whitneyův U test)

Tabulka 3.11 Anizotropie fluorescence DPH a TMA-DPH v plazmatických membránách izolovaných z mozků laboratorních potkanů po 4-týdenním podávání různých antidepresiv.

skupina	Γ_{DPH}	$\Gamma_{TMA-DPH}$
KONTROLY	0.2074	0.2547
DESIPRAMIN	*0.2043	0.2529
MAPROTILIN	0.2055	0.2540
CITALOPRAM	0.2090	0.2570
MOCLOBEMID	0.2079	0.2560
LiCO₃	0.2054	0.2534

Průměry byly spočteny z 15 hodnot pro kontrolní skupinu a z 6 hodnot pro každou další skupinu. DPH - 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien; TMA-DPH - 1-(4-trimetylamoniumfenyl)-6-fenyl-1,3,5-hexatrien. Je označena hodnota statisticky významně odlišná od kontroly (* $p < 0.05$; Mannův-Whitneyův U test)

Literatura:

- Bartlett, G.R., 1959. Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* 234, 466-468.
- Folch J.L.M., Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Koul, A., Prasad, R., 1996. Extraction of membrane lipids. In: *Manual on membrane lipids*, Prasad, R. (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 37-51.
- Lowry, O.H., Rosbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Mitchell, R.H., Hawthorne, J.N., 1965. The site of diphosphoinositide synthesis in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 21, 333-338.
- Scott, L., Schell, M.J., Hubbard, A.L., 1993. In: *Graham, J.M., Higgins, J.A. (Eds.), Methods in Molecular Biology, Vol. 19, Biomembrane Protocols: I. Isolation and Analysis*. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Wagner, H., Lissau, A., Holzi, J., Horammer, L., 1962. The incorporation of ³²P into inositolphosphatides of the rat brain. *J. Lipid Res.* 3, 177-180.