

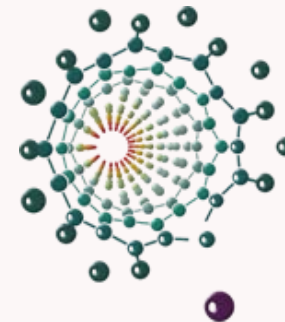


BioScope Labs

www.bioscope.ffh.bg.ac.rs

EPR

- primene u biologiji i medicini -



Miloš Mojović

Fakultet za fizičku hemiju
Univerzitet u Beogradu

milos@ffh.bg.ac.rs



EPR spin-trap ispitivanje slobodnih radikala u plazma membranama korena kukuruza

- Ispitivani sistem: izolovane, prečišćene plazma-membrane korena kukuruza (*Zea mays* L) sa i bez prisustva reduktanta NADH.
- Uzorci se snimaju u gas-propusnim teflonskim kapilarama. Spin-trap DEPMPO.
- Membrane bez NADH proizvode $\cdot\text{OH}$ i $\cdot\text{H}$ radikale (nezavisno od kiseonika).
- Membrane sa NADH proizvode dodatno i $\cdot\text{O}_2^-$ radikale (zavisno od kiseonika) dok se proizvodnja $\cdot\text{OH}$ radikala povećava.

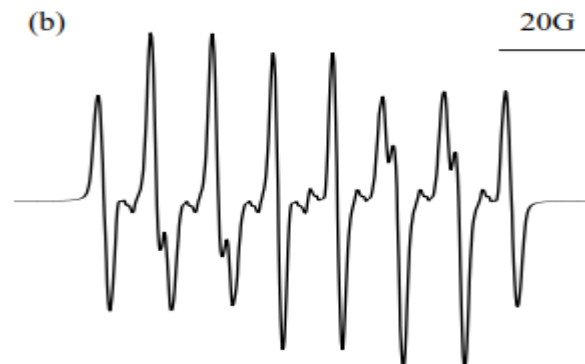
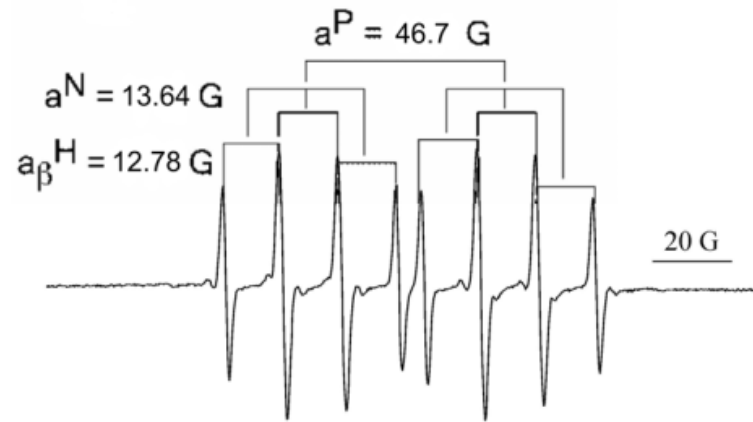
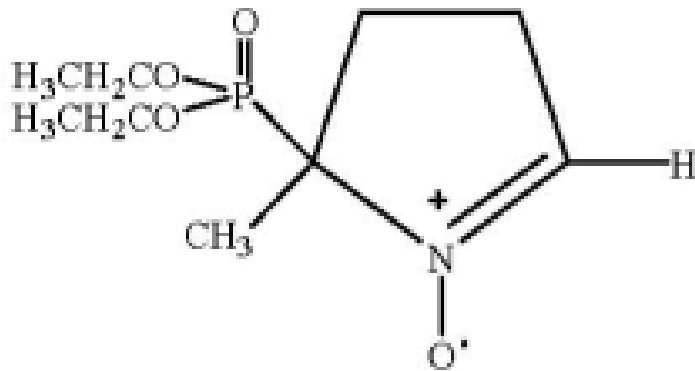


... ali, da li je povećano prisustvo $\cdot\text{OH}$ adukta u sistemu sa NADH rezultat transformacije $\cdot\text{OOH}$ u $\cdot\text{OH}$???



EPR spin-trap ispitivanje slobodnih radikala u plazma membranama korena kukuruza

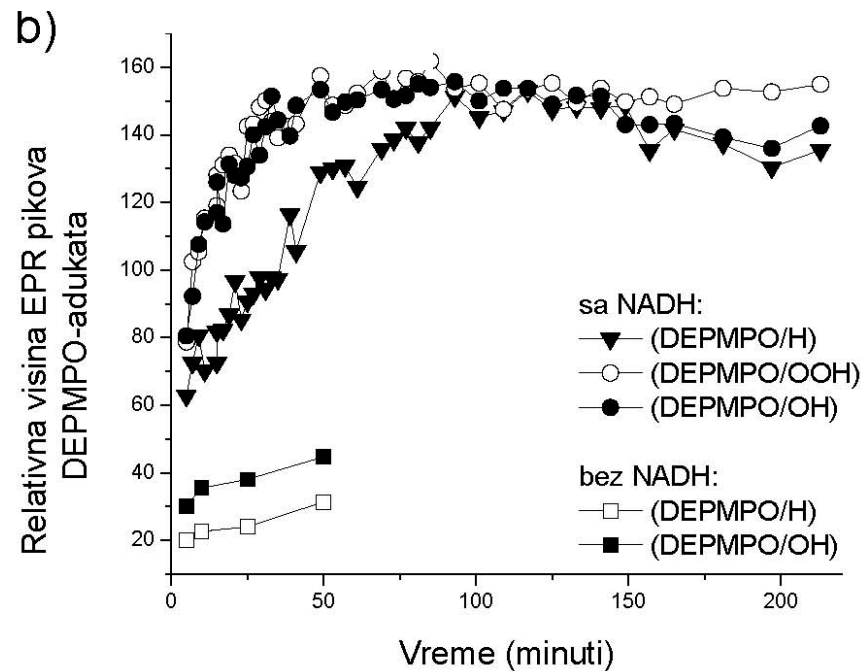
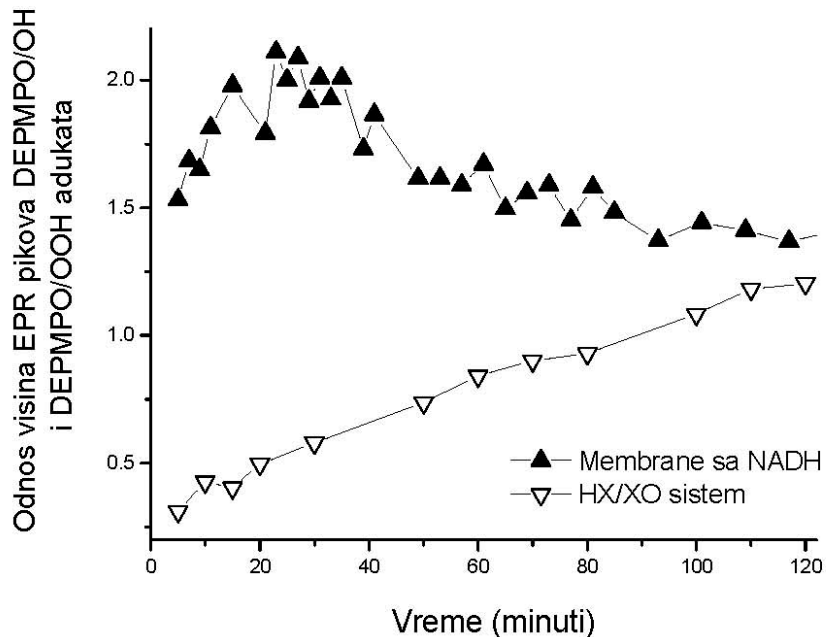
DEPMPO





EPR spin-trap ispitivanje slobodnih radikala u plazma-membranama korena kukuruza

- U sistemu sa plazma-membranama u prisustvu NADH postoji nezavisna proizvodnja hidroksilnih radikala (*odnos visina pikova /OOH i /OH*).
- U sistemu sa NADH se simultano proizvode sve tri radikalske vrste ($\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$ i $\cdot\text{H}$). (*kinetika proizvodnje $\cdot\text{OH}$ i $\cdot\text{O}_2^-$ radikala razlikuje se od $\cdot\text{H}$*).
- U sistemu bez NADH (postoji samo proizvodnja $\cdot\text{OH}$ i $\cdot\text{H}$ radikala), kinetike njihove proizvodnje veoma su slične i razlikuju se od sistema sa NADH.

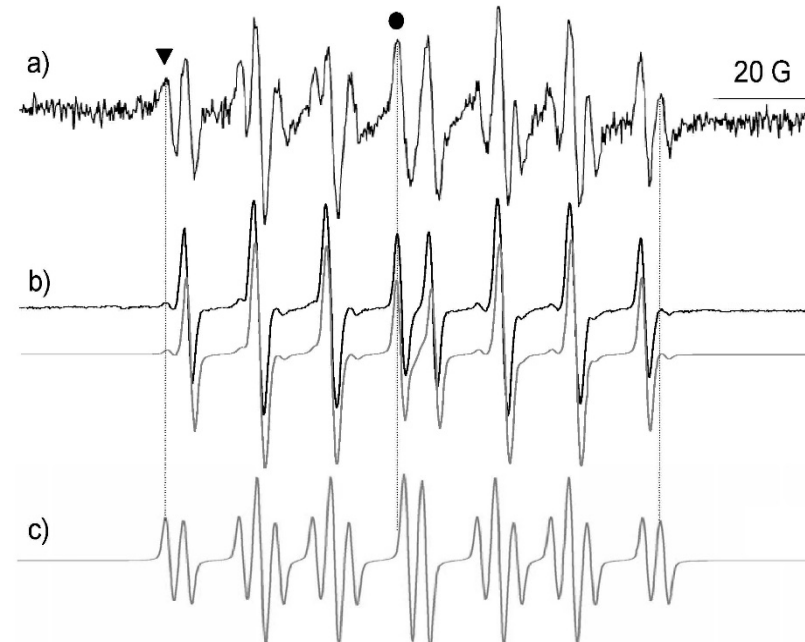
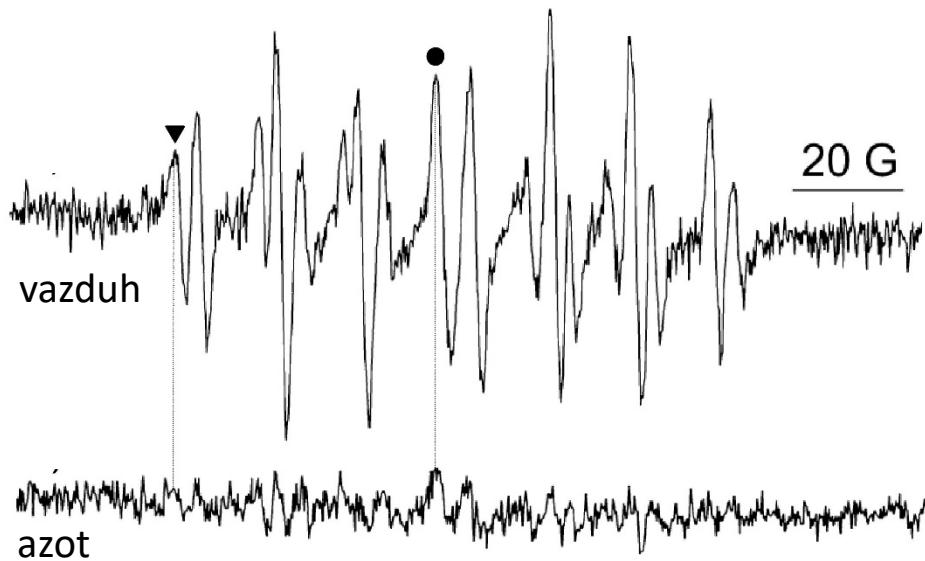


Proces proizvodnje redukujuće vrste, $\cdot\text{H}$ radikala, može služiti kao regulacioni mehanizam koji kontroliše prisustvo oksidujućih reaktivnih radikalskih vrsta u ovom sistemu.



EPR spin-trap ispitivanje slobodnih radikala u ćelijskom zidu graška

- Ispitivani sistem: ćelijski zid korena graška (*Pisum sativum* L).
- Sistem za snimanje: teflonski nosač sa gas-propusnom teflonskom folijom. Spin-trap DEPMPO.
- Ćelijski zid je sposoban da nezavisno proizvodi $\cdot\text{OH}$ i $\cdot\text{H}$ radikale bez prisustva reduktanata. U sistemu nisu prisutni $\cdot\text{O}_2^-$ radikali.
- Produkcija hidroksilnog i vodoničnog radikala je kiseonično-zavisna.

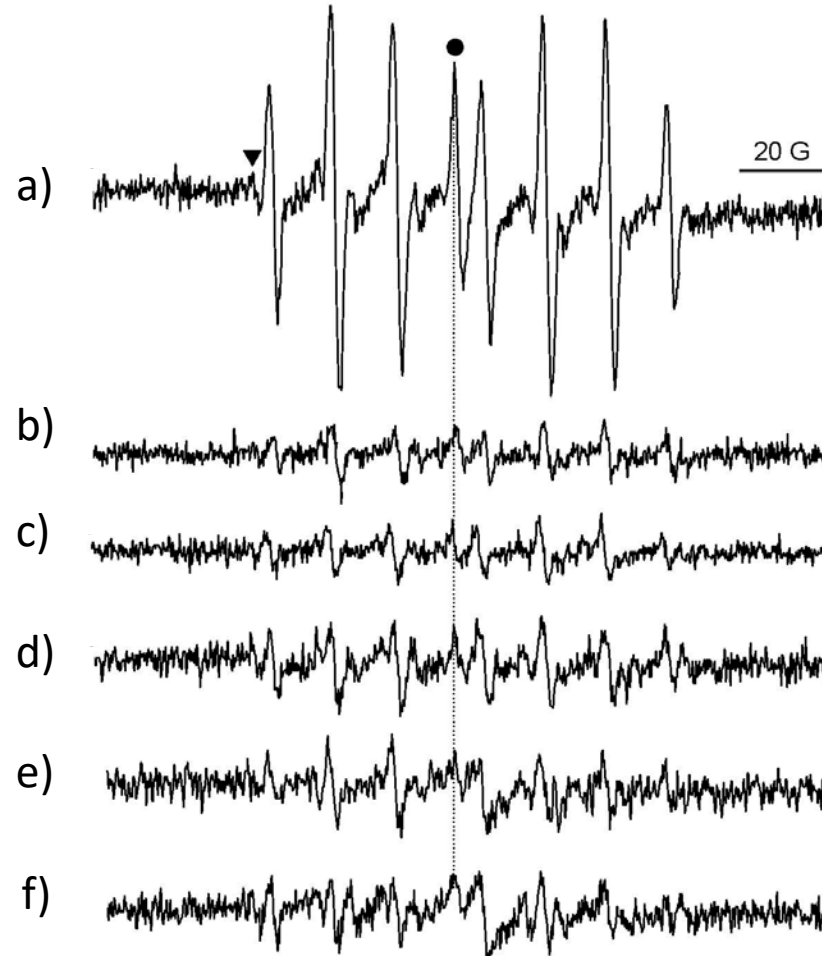




Ćelijski zid graška - inhibitori

Uloga peroksidaza i H_2O_2

- Dodavanje inhibitora peroksidaza: KCN, Na_3N , SHAM (b,c,d) dovodi do značajne redukcije EPR-signala DEPMPO adukata.
- **Proizvodnja $\cdot OH$ radikala u značajnoj meri rezultat peroksidazne aktivnosti.**
- Dodavanje supstancija koje zaklanjaju H_2O_2 (katalaza ili piruvat) takođe dovodi do smanjenja EPR signala DEPMPO adukata (e, f).
- **Za proizvodnju $\cdot OH$ radikala potrebno je prisustvo H_2O_2 .**

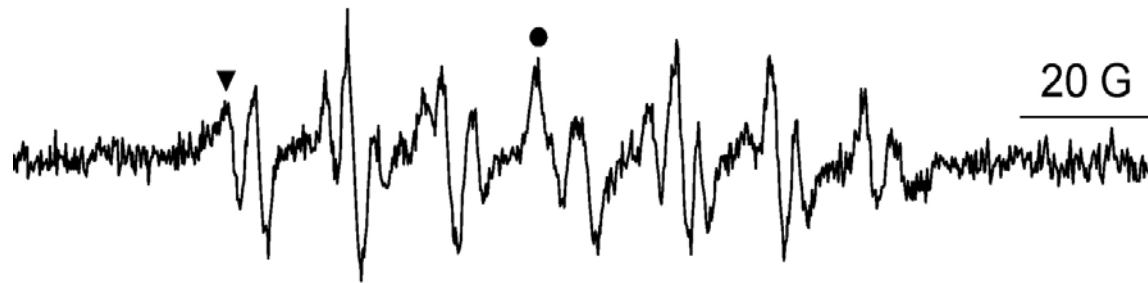


Inhibitori



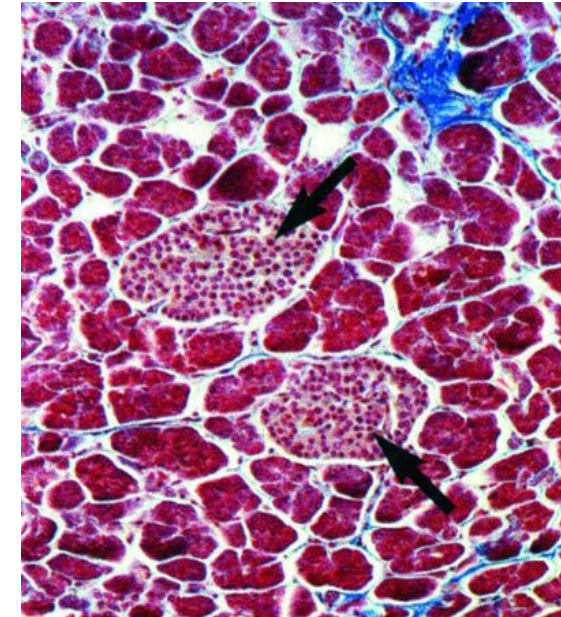
EPR spin-trap ispitivanje slobodnih radikala u sistemu sa Langerhansovim ostrvcima

- Metabolizam reaktivnih kiseoničnih vrsta igra važnu ulogu u normalnom funkcionisanju β -ćelija pankreasa. ROS mogu normalno biti povezane sa sekrecijom insulina (**pokazano je da insulin izaziva povećanje ROS u ciljnim tkivima**) i funkcijom pankreasa na različitim nivoima. ROS mogu igrati veoma važnu ulogu u dijabetisu (*diabetes mellitus*).



EPR spektar spin-adukata spin-trapa DEPMPO dobijenih iz izolata Langerhansovih ostrvaca sa pankreasa pacova (30 mg) na sobnoj temperaturi

Važnost postojanja $\cdot\text{H}$ radikala je i u ovom sistemu verovatno vezana za uspostavljanje kontrolnih mehanizama u procesima generacije i rekombinacije ROS, koji su potrebni za normalno funkcionisanje živih sistema.

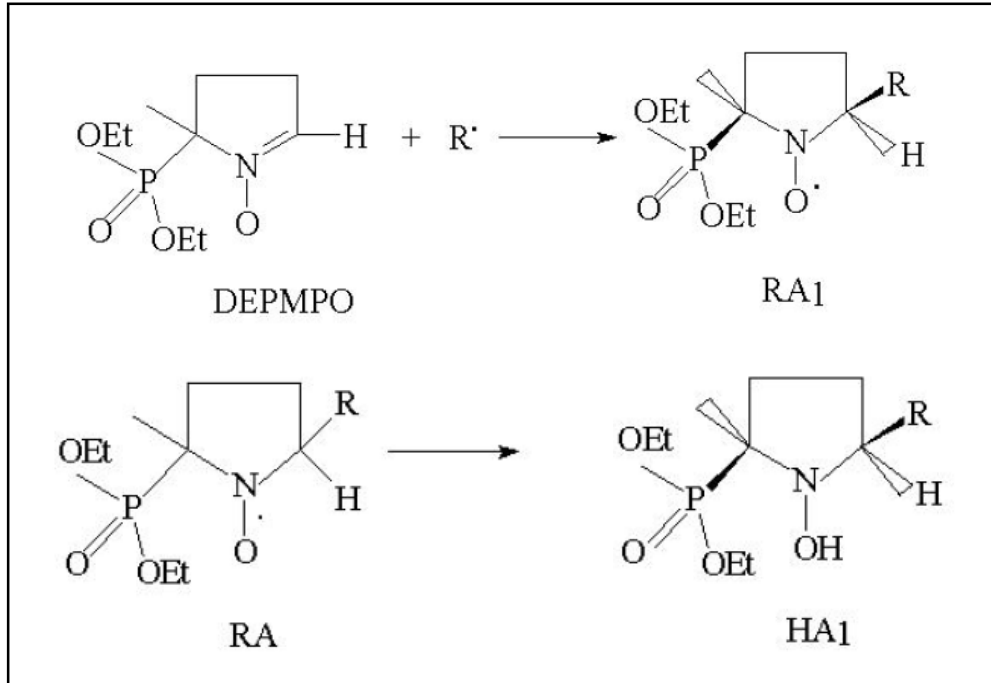


Poređenjem EPR spektara DEPMPO adukata dobijenih u Langerhansovom i Fentonovom sistemu, **prvi put je pokazana proizvodnja $\cdot\text{H}$ radikala u jednom animalnom sistemu.**

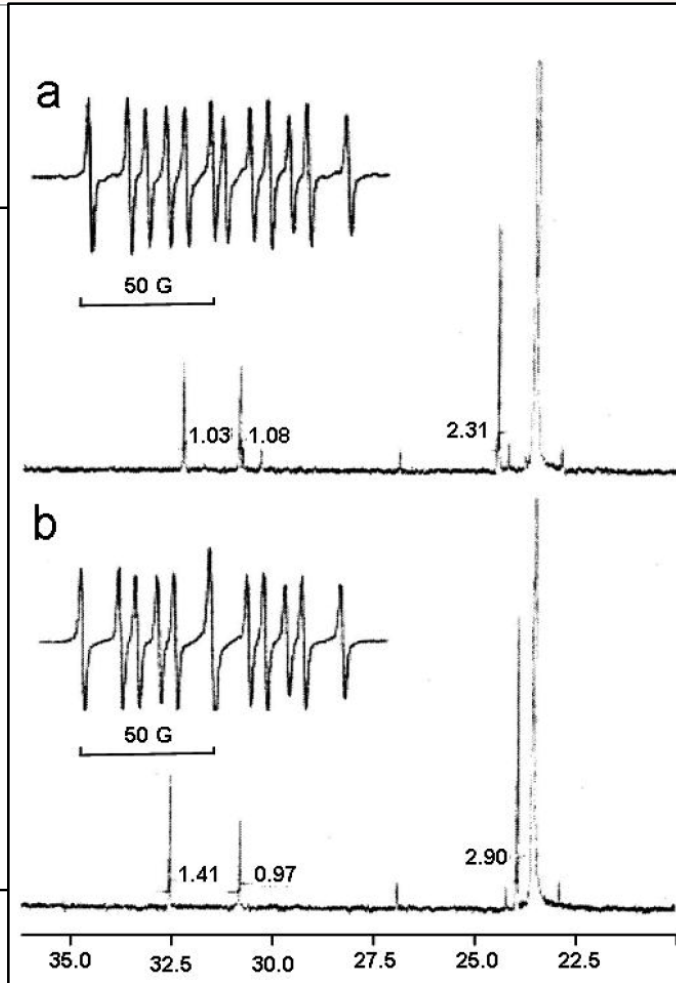


NMR spin-trapping

- Pored EPR-a, postoji i NMR spin-trapping.
- Korisno je detektovati HA iz telesnih tečnosti



Spin-trap ↔ Spin-adukt ↔ Hidroskilamin



EPR vidljiv, ali nestabilan spin-adukt.



NMR vidljiv, stabilan HA.

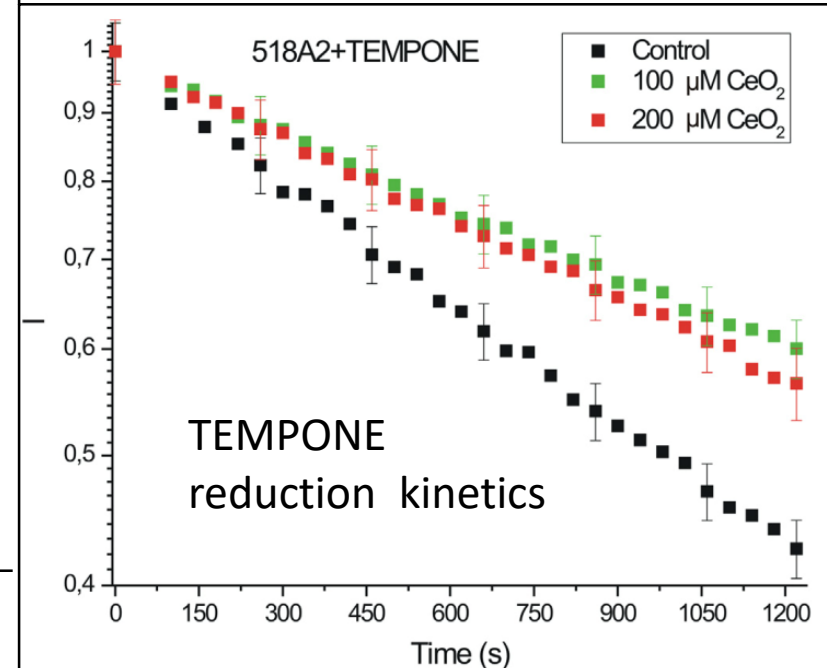
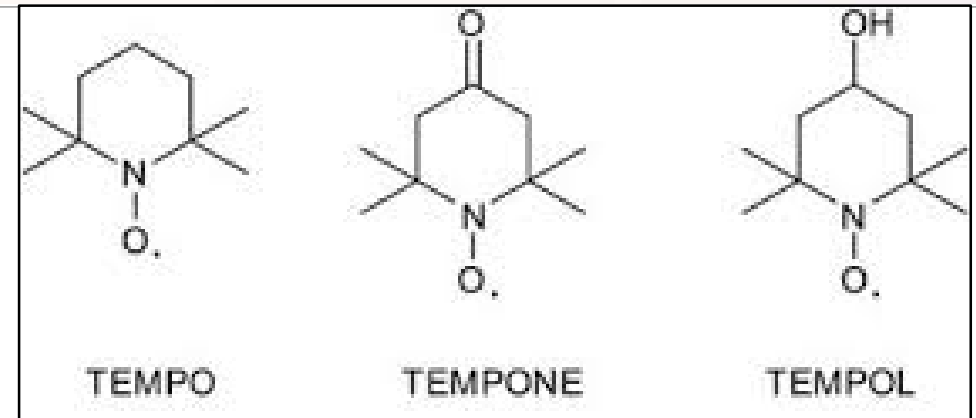
- Postoje pikovi na 24.54 ppm, i dodatni pikovi na 30.83 and 32.52 ppm.
- Veoma mali pik na 27.05 ppm potiče od spin-adukta DEPMPPO/•OH.

³¹P NMR spektar dijamagnetnih vrsta (HA); DEPMPPO/CH₃ (a) i DEPMPPO/CH₂OH (b)



Ispitivanje ćelja kancera

- Efekat leka na proizvodnju ROS od ćelijskih linija melanoma 518A2 i kolorektalnog adenocarcinoma HT-29.
- **EPR** metoda **spin-proba** pomoću TEMPONE.
- Kinetika redukcije spinske probe pokazuje povezuje se sa količinom slobodnih radikala u sistemu.
- Rezultati pokazuju potencijal novih lekova u smislu oštećenja antioksidativnog kapaciteta kancer ćelija.
- CONP (cerium oxide nanoparticles) pokazuju nisku inhibitorsku aktivnost za zdrave humane ćelije.





ROS i mikro-životinje

- Anhidrobioza - strategija koja se zasniva na preživljavanju putem gubljenja skoro kompletne telesne vode.
- **Tardigrade (vodeni medvedići).**
- Anhidrobioza dovodi do oksidativnog stresa.
- Do danas, metabolizam slobodnih radikala u tardigradama je još uvek nejasan.



Tardigrade (*Paramacrobiotus richtersi*)

Pokazali samo da rehidratirani primerci tardigrada proizvode čist $\cdot\text{O}_2^-$ radikal.





ROS i mikro-životinje

- Anhidrobioza - strategija koja se zasniva na preživljavanju putem gubljenja skoro kompletne telesne vode.
- **Tardigrade (vodeni medvedići).**
- Anhidrobioza dovodi do oksidativnog stresa.
- Do danas, metabolizam slobodnih radikala u tardigradama je još uvek nejasan.

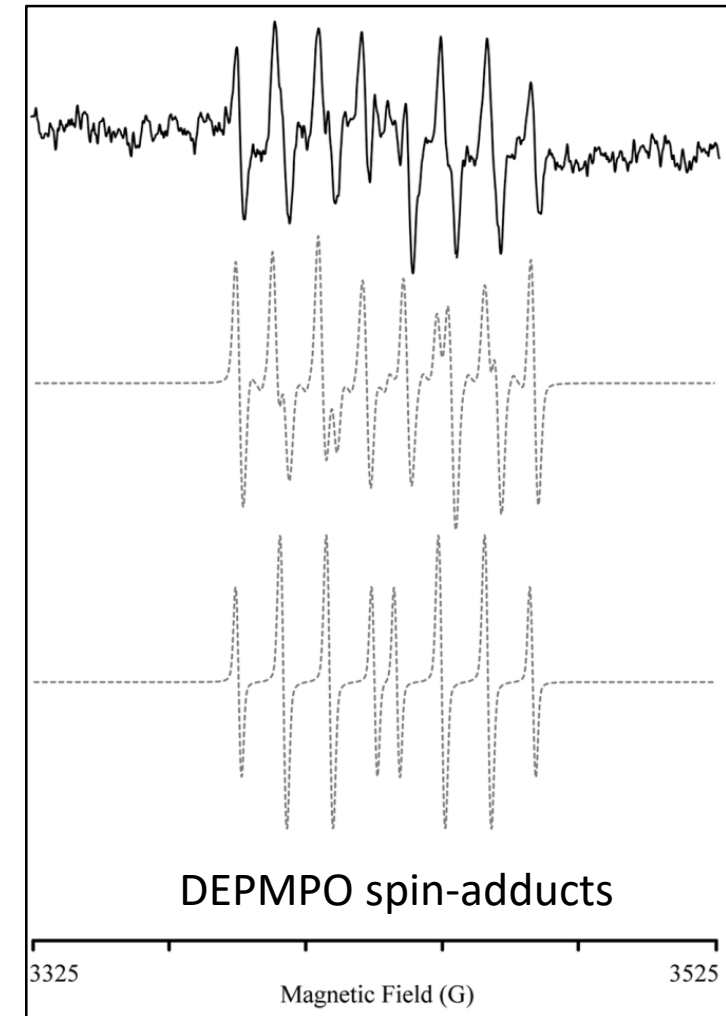


Tardigrade (*Paramacrobiotus richtersi*)

Pokazali samo da rehidratirani primerci tardigrada proizvode čist $\cdot\text{O}_2^-$ radikal.



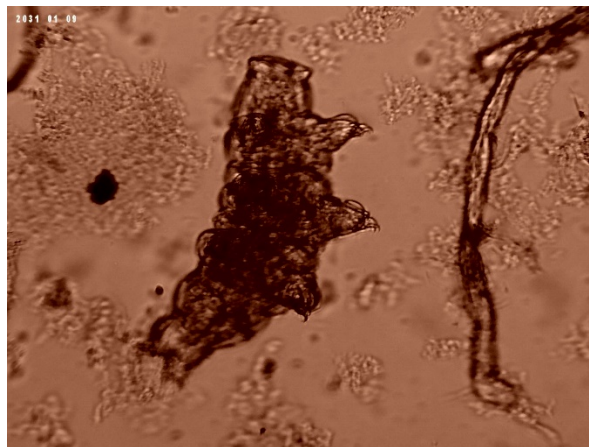
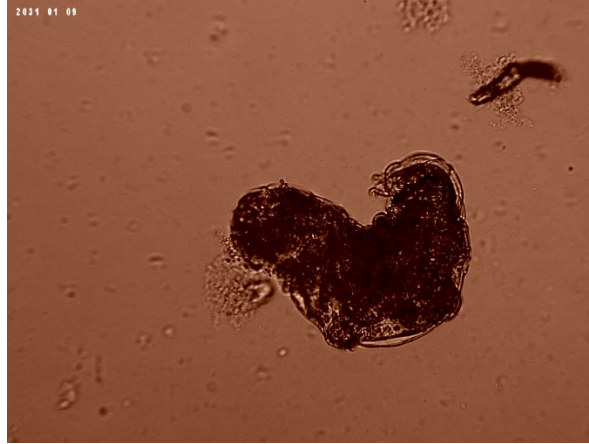
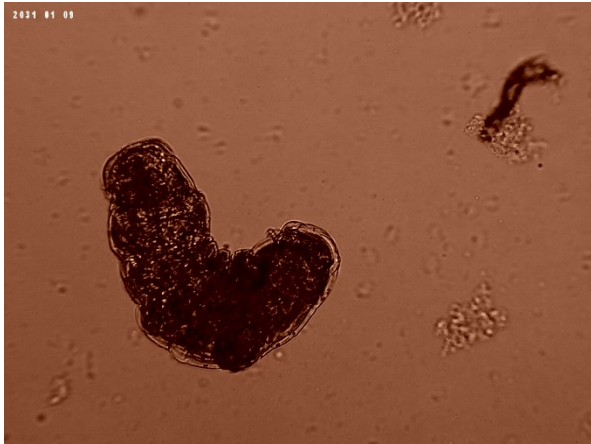
European corn borer larva (*Ostrinia nubilalis*) hibernation Semiquinone radicals from melanin and ROS (elevated H_2O_2 levels).





BioScope Labs
www.bioscope.ffh.bg.ac.rs

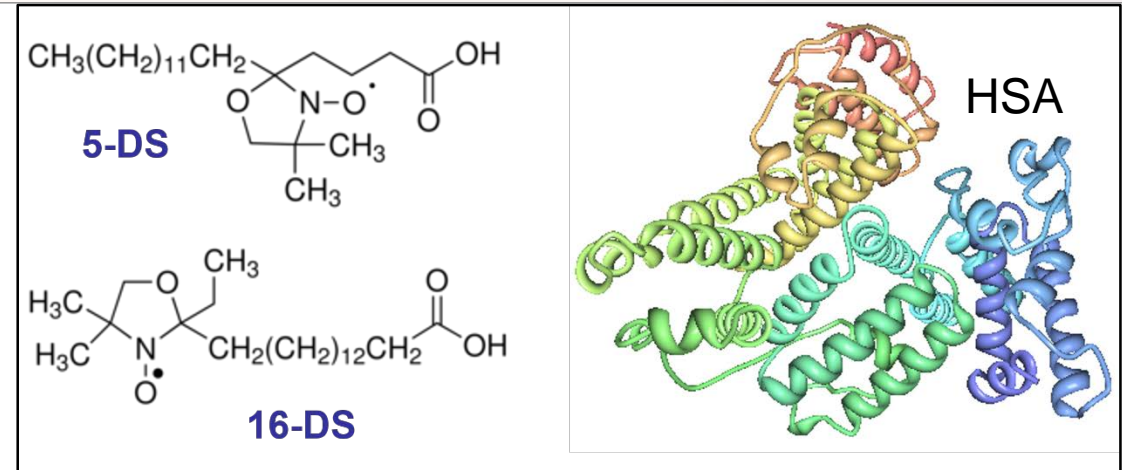
ROS i mikro-životinje



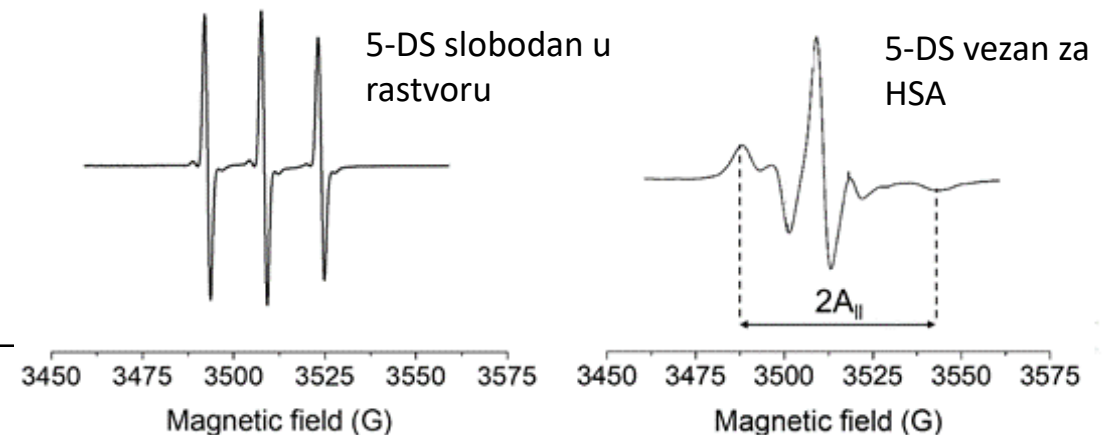


Spinsko obeležavanje HSA - biomarker tehnika

- Proteini, koje oslobađaju ćelije kancera, vezuju se za HSA, menjajući njegovu strukturu.
- Na taj način, HSA menja svoj kapacitet za vezivanje masnih kiselina.
- Konformacione promene proteina se mogu proučavati upotrebom metode **EPR spinskog obeležavanja**.
- Ova metoda se zasniva na efektu anizotropije (izmene rotacionog kretanja molekula usled anizotropije).
- Može se određivati količina vezane masne kiseline, kao i potencijalna oksidativna oštećenja HSA.



Spinske probe imaju nitroksidne grupe koje su vezane za različita mesta na lancu od masne kiseline



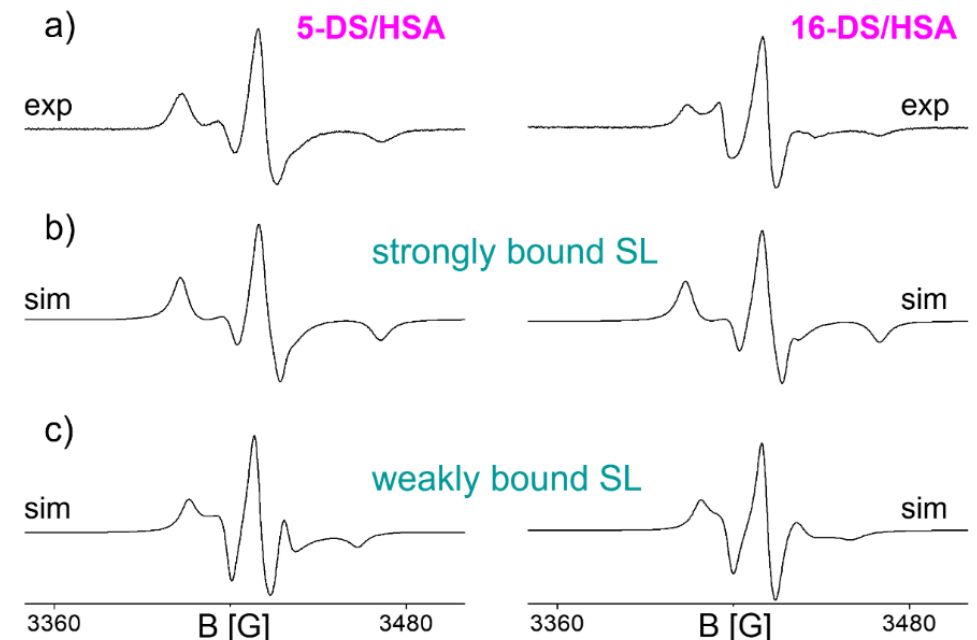


Spinsko obeležavanje HSA kao biomarker za LABC

- EPR spektri 5-DS i 16-DS vezani za HSA zdravnih tj. kontrolnih i LABC pacijenata.
- Spekti se moraju računarski **simulirati i razdvojiti**.
- Komponente: jako vezana (SB) i slabo vezana (WB) komponenta SL.
- Odnos **SB/WB** je značajno različit i može se koristiti kao biomarker za LABC.
- 5-DS spinska proba je osetljivija na ovu promenu.
- HSA može vezati do 7 ekvivalenata masne kisline.
- Ovako je veoma teško utvrditi koji deo molekula HSA doživljava konformacione promene.

	Strongly bound (SB)	Weakly bound (WB)	Ratio SB/WB
5-DS / control-HSA	0.79 ± 0.08*	0.15 ± 0.02	5.3 ± 0.5
16-DS / control-HSA	0.63 ± 0.06	0.33 ± 0.03	1.9 ± 0.2
5-DS / LABC-HSA	0.49 ± 0.05	0.44 ± 0.04	1.1 ± 0.1
16-DS / LABC-HSA	0.43 ± 0.04	0.39 ± 0.04	1.1 ± 0.1

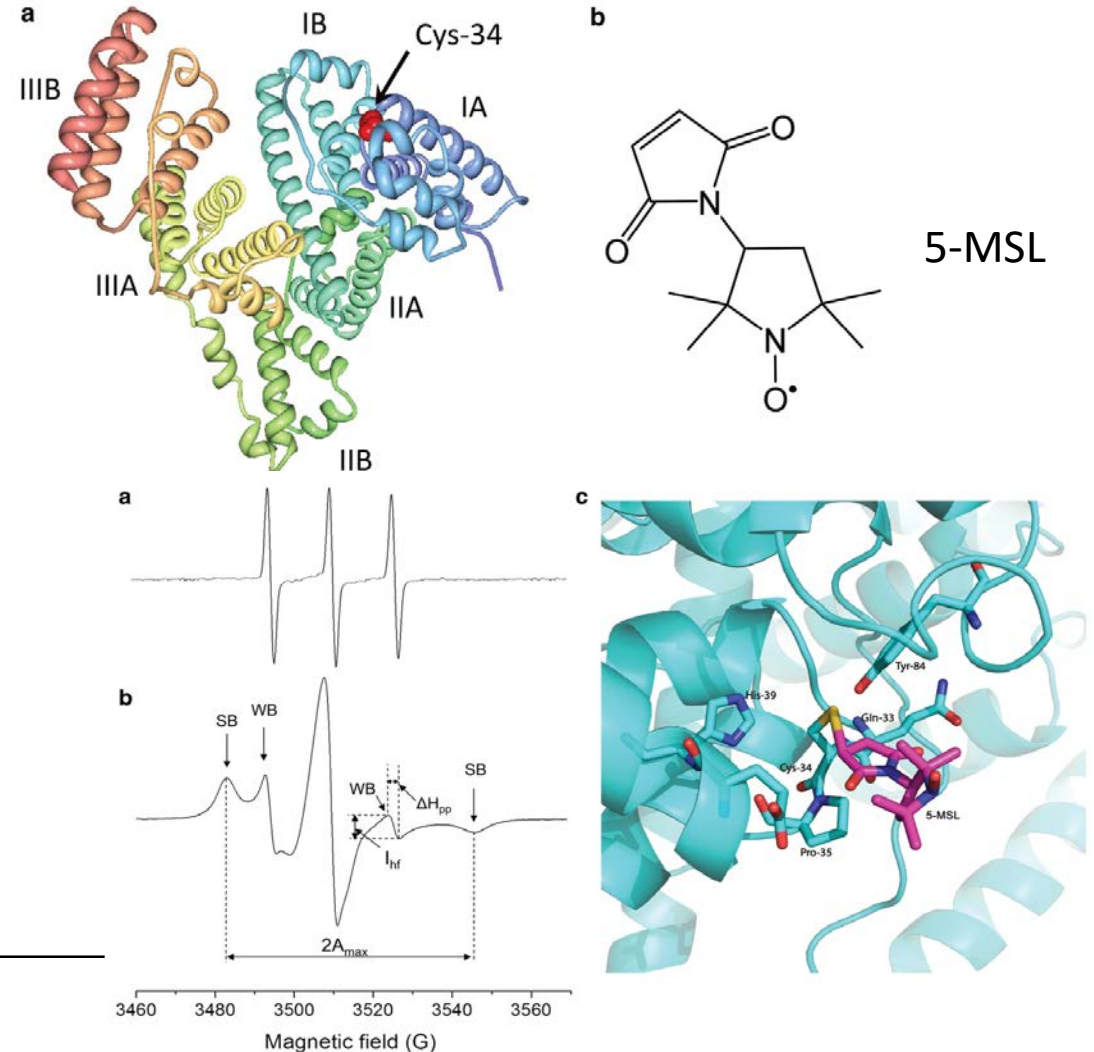
*The mean value of 15 simulations. The goodness of fits for all simulations was <5.





Spinsko obeležavanje HSA za ispitivanje farmakodinamike lekova

- Da li potrebna informacija o specifičnom mestu na proteinu? Koristiti spinske probe koji se vezuju za specifične cisteinske ostatke.
- 3-maleimido proxyl (5-MSL).
- Ovi čvrsto vezani maleimido-nitroksidi su veoma osetljivi na pokrete celog proteina.
- 5-MSL može dati informaciju kako o veživanju leka, tako i o uticaju ROS.
- Rezultati koji se dobijaju su esencijalni za bolje razumevanje mehanizama interakcije (vezivanja) albumin-lek i za farmakodinamiku lekova.
- Koristiti softver za molekularni doking.





SL PBMC u dijagnozi i praćenju terapije GD

- Poremećena funkcija β -glukocerebrozidaze, što rezultuje akumulacijom glukocerebrozida (GlcCer) u membrani.
- Povećana količina GlcCer uzrokuje rast **raftova** i promenu membranske fluidnosti.
- **Koristimo spinsko obeležavanje membrana** (takođe, možemo detektovati i lipidnu peroksidaciju prouzrokovanu delovanjem ROS).
- Cilj je izmeriti u PBMC membranama parametar reda (S) u GD i kontrolama.
- Brza metoda za dijagnozu i praćenje efekta terapije lekom Elelyso.

