

BIOCHEMICKÉ ANALÝZY KRVE PRO STANOVENÍ OXIDAČNÍHO STRESU SKOTU



Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.¹

Mgr. Martina Janků, Ph.D.¹

doc. Ing. Jiří Bezdíček, Ph.D.²

Ing. Jaromír Ducháček, Ph.D.³

prof. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.¹

doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.¹

doc. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.³

¹ Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

² Katedra zoologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

³ Katedra chovu hospodářských zvířat, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze

Certifikovaná metodika

Tato metodika vznikla v rámci výzkumného projektu Optimalizace řízení reprodukční výkonnosti dojeného skotu (NAZV - QK22010270) financovaného z Programu aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství České republiky.

Metodika je určena vědeckým pracovníkům, studentům, pracovníkům v oblasti biochemie a dalším, kteří se zajímají o problematiku oxidačního stresu a jeho laboratorním stanovením ze vzorků krve.

Abstrakt

Oxidační stres je stav, ke kterému dochází v důsledku nedostatečné eliminace nadměrně vznikajících reaktivních forem kyslíku. V současné době je velice aktuálním tématem v řadě oblastí, včetně chovu hospodářských zvířat. Užiteklost zvířat (chovného skotu) je velmi vysoká, a to nejen v oblasti produkční. Snaha je také o velmi úspěšnou reprodukci, nebo udržení dobrého zdravotního stavu atd. Užiteklost však může být negativně ovlivněna řadou faktorů, včetně různých forem stresu. Obecně je snahou, vytvořit pro chovaná zvířata co nejlepší podmínky, tak aby byly co nejméně vystaveny stresovým situacím. K tomu je důležité dokonale znát jejich fyziologii, a tedy i to, jak reagují na změny prostředí, např. měnící se klima, nebo na změny ve složení krmiva. Jedním z velmi výhodných nástrojů, jak zjistit a vyhodnotit celkový fyziologický stav zvířete, je vyšetření oxidačního stresu z krve. Předkládaná metodika detailně popisuje proces odběrů krve skotu, jejich zpracování a vybrané biochemické analýzy, např. stanovení aktivity antioxidantních enzymů, celkové antioxidantní kapacity, celkového oxidačního statusu nebo proteinů teplotního šoku. Součástí metodiky jsou principy použitých metod, podrobné pracovní postupy i vyhodnocení výsledků. Všechna stanovení jsou z původně publikovaných metodik přepracována pro stanovení v 96-jamkových mikrotitračních destičkách s využitím mikrodestičkového spektrofotometru. To přináší výhodu v potřebě menšího množství vzorku, menší spotřeby chemikálií a dále možnosti souběžné analýzy řady vzorků najednou. Na základě získaných výsledků biochemických analýz lze získat přehled o oxidačním stavu (nebo stresu) u sledovaného zvířete.

Klíčová slova: biochemické analýzy krve, oxidační stres, skot, proteiny teplotního šoku, peroxidace lipidů, antioxidantní enzymy, celková antioxidantní kapacita, celkový oxidační status

Obsah

I. CÍL METODIKY	1
II. POPIS METODIKY	2
1. Úvod	2
1.1 Oxidační stres	2
1.1.1. Parametry oxidačního stresu stanovené z krve	3
2. Vlastní metodika	6
2.1. Odběr a zpracování krve pro biochemickou analýzu	6
2.1.1 Odběry krve	6
2.1.2 Zpracování odebrané krve	7
2.1.2.1 Zpracování srážlivé krve pro získání krevního séra	7
2.1.2.2 Zpracování nesrážlivé krve pro získání krevní plazmy a lyzátu erytrocytů	7
2.2. Vybrané biochemické analýzy pro stanovení oxidačního stresu	8
2.2.1 Metody pro stanovení oxidačních biomarkerů	10
2.2.1.1 Celkový oxidační status	10
2.2.1.2 Peroxidace lipidů - koncentrace MDA	11
2.2.2 Metody pro stanovení antioxidačních biomarkerů	12
2.2.2.1 Celková antioxidační kapacita	12
2.2.2.2 Aktivita katalasy	13
2.2.2.3 Aktivita superoxiddismutasy	15
2.2.2.4 Aktivita glutathionperoxidasy	16
2.2.2.5 Aktivita glutathionreduktasy	17
2.2.3 Kvantifikace Hsp70	19
2.2.4 Další parametry	20
2.2.4.2 Koncentrace hemoglobinu	20
3. Závěr	21
4. Doporučení pro praxi	22
III. STANOVENÍ NOVOSTI POSTUPŮ	23
IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	24
V. EKONOMICKÉ ASPEKTY METODIKY	25
VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	26
VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	29

I. Cíl metodiky

Primárním záměrem metodiky bylo vytvořit manuál vhodný pro pravidelné sledování oxidačního stresu skotu, tj. parametru, kterým lze hodnotit celkové zdraví a pohodu zvířat v daných podmínkách. Nejjednodušším způsobem, jak zjistit, zda se zvíře nachází ve stavu oxidačního stresu je vyšetření tzv. biomarkerů oxidačního stresu z odebrané krve zvířat. Cílem této metodiky je tedy navrhnout standardizovaný protokol pro odběr, zpracování a analýzu vzorků krve skotu, který je nezbytný pro zajištění reprodukovatelnosti výsledků. Vybranými parametry sledujícími oxidační stres jsou hladiny antioxidantů, produkty peroxidace lipidů a aktivity antioxidantních enzymů. Mezi parametry hodnotící stresové podmínky dále patří zvýšená hladina tzv. proteinů teplotního šoku. Součástí metodiky je optimalizace spektrofotometrických metod pro stanovení parametrů oxidačního stresu s využitím mikrodestičkového spektrofotometru pro jednoduché, rychlé a úsporné otestování většího množství vzorků. Pomocí výsledků stanovení oxidačního stresu je následně možné identifikovat faktory, které přispívají k jeho zvýšení, jako jsou např. výživové nedostatky, stresové podmínky nebo onemocnění. V návaznosti na tento metodický postup by mohla být pro odborníky a chovatele realizována školení o významu oxidačního stresu, jeho příčinách a důsledcích, a možnostech jeho stanovení. Dalším užitečným nástrojem by mohlo být vytvoření platformy pro sdílení dat a výsledků mezi výzkumníky, veterináři a samotnými chovateli pro podporu kolektivního pokroku v oblasti zdraví skotu.

II. Popis metodiky

1. Úvod

1.1 Oxidační stres

Reaktivní formy kyslíku (ROS) a reaktivní formy dusíku (RNS) jsou zapojeny do fyziologických a patofyziologických procesů v organismu. Často jsou společně označovány jako reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS). Přehled RONS shrnuje Tab. 1.

Tab. 1 Reaktivní formy kyslíku a dusíku (upraveno podle Smith et al., 2019).

Reaktivní formy kyslíku		
Radikálové povahy:	Superoxidový anion radikál	$O_2^{\cdot-}$
	Hydroxyl	OH^{\cdot}
	Peroxyl	RO_2^{\cdot}
	Alkoxyl	RO^{\cdot}
	Hydroperoxyl	HO_2^{\cdot}
Neradikálové povahy:	Peroxid vodíku	H_2O_2
	Kyselina chlorná	$HOCl^{\cdot}$
	Ozon	O_3
	Singletový kyslík	1O_2
	Peroxydusitan	$ONOO^{\cdot}$
Reaktivní formy dusíku		
Radikálové povahy:	Oxid dusnatý	NO^{\cdot}
	Oxid dusičitý	NO_2^{\cdot}
Neradikálové povahy:	Peroxydusitan	$ONOO^{\cdot}$
	Alkylperoxydusitan	$ROONO$
	Oxid dusitý	N_2O_3
	Tetraoxid dusíku	N_2O_4
	Kyselina dusitá	HNO_2
	Nitrylový kation	NO_2^+
	Nitrosioniový anion	NO^-
	Nitrosioniový kation	NO^+
Nitrylchlorid	NO_2Cl	

Obecně jsou RONS považovány za škodlivé pro organismus. Jejich zvýšená koncentrace je spojena např. s 1) poškozením nukleových kyselin (velmi citlivá je v tomto směru mitochondriální DNA); 2) poškozením buněčných membrán vedoucí k peroxidaci lipidů; 3) modifikací proteinů atd. Avšak RONS mají významnou roli v procesu apoptózy buněk či imunitní odpovědi. Organismus (buňky) se brání vůči působení RONS antioxidanty, které mohou být enzymové nebo neenzymové povahy (Tab. 2). RONS hrají roli v řadě běžných fyziologických procesů, které by bez jejich přítomnosti nemohly proběhnout. Příkladem může být zapojení volných radikálů do cyklicky se opakujících reprodukčních mechanismů, jako jsou ovulace, maturace oocytů, vznik a zánik žlutého tělíska atd. Dalším příkladem zapojení volných radikálů do fyziologických procesů může být angiogeneze a to např. v rámci vznikajícího žlutého tělíska. Hlavními angiogenními faktory jsou VEGF α (vaskulární endotelový růstový faktor); FGF2 (fibroblastový růstový faktor), HIF faktor (transkripční faktor indukovaný hypoxií) a další. Přítom faktor VEGF je aktivován právě volnými radikály a mírným oxidačním stresem,

vyvolaným v tomto případě H_2O_2 (Kim et al., 2017; Gonzalez-Pacheco et al., 2006). Zvýšená koncentrace volných radikálů v různých a v určitých lokálních procesech je tedy nezbytná.

Tab. 2 Přehled nejznámějších antioxidantů (upraveno podle Da Costa et al., 2012).

Neenzymové antioxidanty:	Vitamin C		
	Vitamin E		
	Karotenoidy		
	Glutathion		
	Flavonoidy		
	Polyaminy		
Enzymové antioxidanty:	Superoxiddismutasa	SOD	EC 1.15.1.1
	Katalasa	CAT	EC 1.11.1.6
	Glutathionperoxidasa	GPx	EC 1.11.1.9
	Glutathionreduktasa	GR	EC 1.6.4.2
	Thioredoxinreduktasa	TrxR	EC 1.8.1.9

Obecná definice oxidačního stresu je formulována jako narušení rovnováhy mezi tvorbou RONS a jejich odstraňováním pomocí antioxidačního systému. Míra vznikajícího oxidačního stresu může být vyjádřena také indexem oxidačního stresu, který se vypočítá jako poměr oxidantů/antioxidantů. Na určité lokální (buněčné) úrovni může být mírný oxidační stres spojený s běžnými fyziologickými procesy, avšak výrazné zvýšení oxidačního stresu naopak přináší zhoršení produkčních a reprodukčních procesů. Příkladem negativního důsledku oxidačního stresu je např. v chovu skotu snížení mléčné produkce nebo zhoršení reprodukce (Jóźwik et al., 2012; Hejel et al., 2021; Zhao et al., 2015).

Stanovení oxidačního stresu v rámci biochemických analýz krve je velmi dobrým nástrojem nejen pro předcházení a řešení produkčních a reprodukčních problémů, ale také pro pochopení fyziologických procesů.

1.1.1. Parametry oxidačního stresu stanovené z krve

Pro biochemické analýzy krve jsou základními složkami krevní plazma, krevní sérum, případně lyzáty erytrocytů. Krevní plazma se získá zcentrifugováním krve s přítomnou antikoagulační látkou, která zabrání jejímu srážení. Oproti tomu, v případě absence protisrážlivého činidla, dochází ke srážení krve a vytvoření krevní sraženiny (koagulum). Po jejím odstranění zůstává krevní sérum, které má totožné složení jako plazma a liší se pouze tím, že sérum neobsahuje koagulační faktory, včetně fibrinogenu, což je pro některé analýzy výhodné.

V krvi, konkrétně v jejích složkách: krevní plazmě, séru nebo v lyzátech erytrocytů, lze stanovit následující parametry:

- celkovou antioxidační kapacitu
- celkový oxidační status
- aktivity antioxidačních enzymů,
- produkty peroxidace lipidů
- množství proteinů teplotního šoku
- a další parametry, kterými se v této metodice nezabýváme.

Celkový oxidační status a celková antioxidační kapacita

Množství jednotlivých oxidačních (Tab. 1) nebo antioxidačních látek (Tab. 2) lze měřit v laboratořích samostatně, měření jsou však časově náročná, pracná a nákladná. Proto byly vyvinuty metody pro stanovení souhrnu všech přítomných oxidantů nebo antioxidantů ve vzorku, které nazýváme **celkový oxidační status (TOS z angl. „Total Oxidant Status“)** nebo **celková antioxidační kapacita (TAC z angl. „Total Antioxidant Capacity“)** (Erel, 2004; Erel, 2005). Míru oxidačního stresu vyjadřuje **index oxidačního stresu (OSI)**, který se vypočítá jako poměr TOS ku TAC.

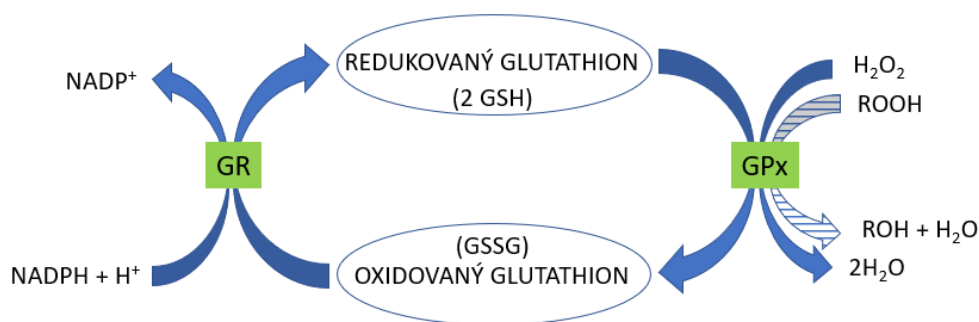
Antioxidační enzymy

Superoxiddismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) je jedním z nejdůležitějších enzymů, který se uplatňuje v aerobních organismech v ochraně proti reaktivnímu superoxidovému radikálu. Vyskytuje se v buňkách prakticky všech živých organismů: u zvířat, rostlin, hub, prokaryot (Bařana et al., 2011). Jeho enzymová aktivita byla prokázána v roce 1969 (McCord & Fridovich, 1969). V aktivním centru se nacházejí různé kovy, podle kterých se SOD dělí na isoformy obsahující Cu/Zn, Fe, Mn nebo Ni. U savců jsou popsány tři isoformy SOD: SOD1 (Cu/Zn-SOD) lokalizovaná v cytosolu; mitochondriální SOD2 (Mn-SOD) a extracelulární SOD3 (Cu/Zn-SOD). Jejich geny jsou u člověka umístěny na chromozomech 21 (SOD1), 6 (SOD2) a 4 (SOD3). Všechny tři isoformy katalyzují přeměnu velmi reaktivního superoxidového radikálu na molekulární kyslík a H_2O_2 a tím zabrání oxidačnímu poškození buněčných složek působením superoxidu. Jedná se o dismutační reakci, kdy jeden superoxidový radikál je oxidován a současně druhý redukován. Významně je v organismech studována nejen nedostatečná produkce, ale také nadprodukce superoxiddismutas. Např. defekty genu *SOD* jsou spojovány s onemocněním amyotrofickou laterální sklerózou (Mondola et al., 2016; Martinelli et al., 2023). Naopak nadprodukce SOD vlivem trizomie 21. chromozomu, je spojena s Downovým syndromem (Epstein et al., 1987).

Katalasa (CAT, EC 1.11.1.6), podobně jako SOD, je zásadním antioxidačním enzymem u aerobních živočichů (vyskytuje se i u některých anaerobních). Tento enzym byl intenzivně studován již v průběhu 19. století a byl základem pro výzkum působení enzymů (Zámocký & Koller, 1999). Primární funkcí tohoto enzymu je regulace hladiny reaktivního peroxidu vodíku. Katalasa katalyzuje štěpení dvou molekul H_2O_2 za vzniku molekuly kyslíku a dvou molekul vody (podobně jako u SOD se zde také v podstatě jedná o dismutaci, v tomto případě H_2O_2). Tato reakce je důležitá především pro eliminaci H_2O_2 z důvodu jeho možné rychlé přeměny na velmi reaktivní hydroxylový radikál v průběhu Fentonovy reakce, případně Haber-Weissovy reakce. U člověka je aktivní katalasa tetramer obsahující hemové skupiny (s Fe^{3+}). Gen kódující katalasu se nachází na 11 chromozomu. Katalasa je přítomna v řadě orgánů, nejvyšší koncentrace je ale v játrech. Katalasy jsou v buňkách přítomny většinou v peroxizomech (společně s dalšími enzymy, např. s peroxidasou); vyskytují se také v cytosolu savčích erytrocytů. Popsány byly také nehemové katalasy, obsahující mangan, které se vyskytují u bakterií a archeí (Glorieux & Calderon, 2017; Yuan et al., 2021).

Do antioxidační ochrany patří i tzv. glutathionový systém (Obr. 1). Jeho součástí je **glutathionperoxidasa (GPx, EC 1.11.1.9)**, která zajišťuje detoxikaci organických a anorganických peroxidů pomocí redukováného glutathionu (GSH). Regeneraci oxidovaného glutathionu (GSSG) na redukováný GSH zajišťuje enzym **glutathionreduktasa (GR, EC 1.6.4.2)**, který využívá NADPH jako redukční činidlo. Přítomnost GPx byla prokázána ve všech savčích tkáních. Byly nalezeny dva hlavní typy GPx. První se vyznačuje přítomností selenu ve formě

kovalentně vázaného selenocysteinu v aktivním místě a reaktivitou s organickými hydroperoxydy a peroxidem vodíku (Rotruck et al., 1973). Druhý typ GPx nevyžaduje selen pro katalýzu a jen velmi málo reaguje s peroxidem vodíku (Mannervik, 1985). U savců bylo identifikováno zatím 8 různých forem glutathionperoxidasy, z nichž GPx obsahující v aktivním centru aminokyselinu selenocystein jsou GPx1; GPx2; GPx3 a GPx4 a obsahující jen cystein jsou GPx5; GPx7 a GPx8. V případě GPx6 je u člověka v aktivním místě selenocystein, zatímco u hlodavců cystein. První savčí selenoprotein (GPx1) identifikoval Mills v roce 1957, vyskytuje se především v cytosolu a mitochondriích (Mills, 1957). GPx2 je exprimována především v gastrointestinálním traktu. GPx3 je označována jako plazmatická nebo také extracelulární glutathionperoxidasa a je produkována především ledvinami a placentou. Její funkce v ochraně před oxidačním stresem se vztahuje především k extracelulárnímu prostředí. GPx4 je zapojena do spermatogeneze. Nedostatek GPx4 je spojený u samců s neplodností (Flohé et al., 2022). GPx5 jsou produkovány v hlavě nadvarlete a chrání spermie proti oxidačnímu poškození. S narůstajícím věkem může být produkce GPx5 snížena, což může souviset se zvýšeným počtem abnormálních spermií ve vyšším věku (O'Flaherty, 2019). GPx6 je exprimována především v čichovém epitelu u isoform GPx7 a GPx8 je jejich význam stále studován (Flohé et al., 2022).



Obr. 1 Glutathionový systém (upraveno podle Alamu et al., 2020). GR – glutathionreduktasa, GPx – glutathionperoxidasa.

Proteiny teplotního šoku

Jak bylo výše uvedeno, oxidační stres je velmi významným fenoménem na buněčné, tkáňové i celoorganové úrovni. Mimo již uvedené enzymové nebo neenzymové antioxidanty se v tomto směru významně uplatňují také **proteiny teplotního šoku („Heat shock proteins“, Hsp)**. Tyto proteiny byly původně spojovány s tepelným stresem, odkud dostaly také svůj název. Byly objeveny v roce 1962 u *Drosophily melanogaster* italským genetikem F. Ritossou. Zvýšení jejich množství však nastává nejen vlivem zvýšených teplot, ale i při dalších stresových situacích, vyvolaných např. UV zářením, vlivem infekce, chemickými látkami atd. Hsp jsou charakterizovány jako chaperony, které chrání ostatní proteiny před jejich degradací (Taherkhani et al., 2020; Kalmar & Greensmith, 2009). Hsp byly identifikovány jak u eukaryot, tak i prokaryot. Rozdělujeme je podle molekulové hmotnosti na Hsp40 (16-30 kDa; malé Hsp) a dále Hsp60, Hsp 70, Hsp 90 a Hsp 110. Hsp s vysokou molekulovou hmotností (60-110 kDa) jsou většinou závislé na ATP (Taherkhani et al., 2020; Kalmar & Greensmith, 2009; Dahiya & Buchner, 2019). Hsp se účastní také dalších procesů v buňce, jako je např. apoptóza, zánětlivé procesy a odstraňování poškozených proteinů.

Peroxidace lipidů

Negativní působení volných radikálů se může projevat poškozením organických molekul: proteinů, nukleových kyselin a lipidů. Zvláště hydroxylový radikál dokáže reagovat se všemi těmito molekulami. Významným procesem v této oblasti je **peroxidace lipidů**, kdy volné radikály způsobují oxidační poškození nenasycených mastných kyselin. Pokud se jedná o nenasycené mastné kyseliny fosfolipidů buněčné membrány, tak je toto oxidační poškození velmi nebezpečné, neboť samotné oxidačně poškozené molekuly mají radikálovou povahu, což vyvolá řetězovou reakci. Zásadní roli v peroxidaci lipidů hrají také některé ionty, především Fe^{2+} . V přítomnosti iontů železa se H_2O_2 může přeměnit na velmi reaktivní hydroxylový radikál (Fentonova reakce). Proto je snaha buňky minimalizovat koncentraci volných iontů železa a to např. jeho ukládáním do feritinu. Peroxidace lipidů přitom může být vyvolána nejen volnými radikály (hydroxylový radikál; superoxidový radikál; atd.), ale také působením UV, ionizujícím zářením nebo chemických látek. Finálními produkty oxidačního rozpadu mastných kyselin jsou pak reaktivní látky karbonylové povahy (malondialdehyd, 8-hydroxynonenal), které prokazují vysokou reaktivitu vůči proteinům a podílí se tak na dalším poškození buněčných složek. V současné době je peroxidace lipidů studována také v souvislosti s řadou onemocnění, jako jsou např. rakovina, cukrovka, neurodegenerativní onemocnění (Yin et al., 2011; Reed, 2011; Niki, 2009), a dále také s některými formami buněčné smrti, např. ferroptóza (Wang et al., 2023; Ursini & Maiorino, 2020).

2. Vlastní metodika

2.1. Odběr a zpracování krve pro biochemickou analýzu

Odběr krve a její zpracování musí probíhat v souladu s hygienickými, etickými a dalšími platnými předpisy. Vzorky biologického materiálu v odběrových nádobkách/zkumavkách musí být řádně označeny, musí být jednoznačně uvedeno, o jaký materiál se jedná (plazma, sérum a lyzát erytrocytů), čísla zvířete, a data odběru, eventuálně dalších údajů. Ke každému vzorku je vyhotovena/připravena dokumentace, která upřesňuje údaje o vzorcích, tedy např. místo a hodina odběru, kdo odběr prováděl, umístění vzorků při skladování nebo transportu atd.

2.1.1 Odběry krve

Odběr krve zvířatům musí být prováděn za dodržení hygienických a etických pravidel a v souladu se zákonnou legislativou, např. v souladu se zákonem na ochranu zvířat proti týrání č. 246/1992 Sb. ve znění pozdějších novelizací a navazujících právních předpisů. Odběr krve probíhá u skotu z *vena jugularis externa* (podobně jako u malých přežvýkavců a koní) nebo z *vena caudalis mediana* za pomoci standardních odběrek HEMOS pro skot s jehlou 1,2 x 27 mm, ze kterých se krev ihned přelije po vyznačenou rysku do odběrových zkumavek s antikoagulačním činidlem nebo gelem (musí být zachován správný poměr objemu krve a antikoagulantu). Odběr krve může být proveden do odběrových zkumavek i rovnou, bez použití odběrek HEMOS.

Ideální doba odběru je ráno. Zvířata by neměla být stresována. Stres se může projevit zvýšením stresových hormonů a glukosy v krvi. Krev musí být odebírána za stejných podmínek, stejné polohy (pozice/postavení) zvířat a ze stejného místa na těle.

Analýzy parametrů oxidačního stresu jsou stanovovány jak v séru a plazmě, tak i v lyzátech erytrocytů. Proto se krev odebírá do dvou typů zkumavek: 1. zkumavky obsahující

antikoagulační činidlo heparin pro získání nesrážlivé krve a následně po centrifugaci plazmy a erytrocytů a 2. zkumavky obsahující gel, který po centrifugaci oddělí ze srážlivé krve sérum od zbytku krevních elementů.

2.1.2 Zpracování odebrané krve

Po samotném odběru krve, a i během jejího následného zpracování je nutné uchovávat vzorky při nízké teplotě kolem 4 °C, aby nedocházelo k denaturaci proteinů, a tak ke ztrátě enzymové aktivity, která je stanovována následnými biochemickými analýzami.

2.1.2.1 Zpracování srážlivé krve pro získání krevního séra

Pro získání krevního séra se nechá krev odebraná do zkumavek obsahujících gel nejprve srazit. Po následné centrifugaci dojde k oddělení krevního séra od zbytku krevních částí, kdy na rozhraní obou vrstev brání jejich opětovnému promíchání gel.

Detailní pracovní postup je následující:

1. Zkumavky s odebranou krví uchovávejte po dobu dvou hodin v lednici, nebo při teplotě 4 °C, kdy dojde k potřebnému srážení krve a současně nízká teplota zajistí vhodné podmínky pro následující biochemické analýzy.
2. Po dvou hodinách zkumavky s krví zcentrifugujte po dobu 10ti minut při 600 g a teplotě 4 °C. Během centrifugace dojde k oddělení krevního séra.
3. Sérum přeneste do nové zkumavky a následně rozdělte na alikvoty v příslušných objemech dle počtu a požadavků následných biochemických analýz.
4. Alikvoty krevního séra skladujte před dalším zpracováním v mrazáku při teplotě - 60 °C.

2.1.2.2 Zpracování nesrážlivé krve pro získání krevní plazmy a lyzátu erytrocytů

Pro získání plazmy a erytrocytů, pro následné analýzy oxidačního stresu, se používá nesrážlivá krev odebraná do zkumavek obsahujících heparin, neboť přítomnost antikoagulačního činidla EDTA může rušit stanovení enzymových aktivit.

Detailní pracovní postup pro získání krevní plazmy je následující:

1. Po odběru uchovávejte zkumavky s krví maximálně po dobu dvou hodin v lednici, nebo při teplotě 4 °C.
2. Následně zkumavky s nesraženou krví zcentrifugujte po dobu 15ti minut při 600 g a teplotě 4 °C. Během centrifugace dojde k oddělení krevní plazmy od zbytku krevních buněk (erytrocyty, leukocyty a krevní destičky).
3. Plazmu přeneste do nové zkumavky a poté rozdělte na alikvoty v příslušných objemech dle počtu a požadavků následných biochemických analýz. Zbytek ve zkumavce – krevní buňky dále zpracujte pro přípravu lyzátů, viz níže.
4. Alikvoty krevní plazmy skladujte před dalším zpracováním v mrazáku při teplotě - 60 °C.

Detailní pracovní postup pro přípravu lyzátu erytrocytů je následující:

1. Po odebrání veškeré krevní plazmy zůstanou ve zkumavce, erytrocyty s minimálním množstvím leukocytů a krevních destiček. Supenzi promíchejte a odeberte 100 µl buněk (dále jen erytrocytů) do nové mikrozkušavky, do které následně přidejte 900 µl vychlazené destilované vody.

2. Obsah mikrozkuvek zvortexujte a mikrozkuvky ponechte 15 min v lednici nebo při teplotě 4 °C.
3. Poté mikrozkuvky zcentrifugujte po dobu 10ti minut při 10 000 g a 4 °C.
4. Supernatant po centrifugaci = lyzát erytrocytů rozdělte na alikvoty v příslušných objemech dle počtu a požadavků následných biochemických analýz.
5. Alikvoty lyzátů erytrocytů skladujte před dalším zpracováním v mrazáku při teplotě - 60 °C.

2.2. Vybrané biochemické analýzy pro stanovení oxidačního stresu

Přístrojové vybavení:

- Mikrodestičkový spektrofotometr s možností měření fluorescence
- Chlazená centrifuga
- Termoblok

Materiál:

- 96-jamková mikrotitrační destička pro měření ve VIS oblasti
- 96-jamková mikrotitrační destička pro měření v UV oblasti
- 96-jamková mikrotitrační destička pro měření fluorescence

Roztoky:

- PBS pufr (PBS z angl. „Phosphate Buffered Saline“): 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,4 g Na₂HPO₄ a 0,24 g KH₂PO₄ rozpustíte v 800 ml destilované vody. Upravte pH na hodnotu 7,4 a doplňte objem do 1 litru.
- TOS činidlo I: 0,0285 g xylenolové oranže a 2,05 g NaCl rozpustíte v 225 ml 25 mmol/l kyseliny sírové a 25 ml glycerolu. Upravte pH na hodnotu 1,75. Roztok lze skladovat v lednici až 6 měsíců.
- TOS činidlo II: 0,245 g Fe^{II}NH₄SO₄ a 0,396 g *o*-dianisidinu rozpustíte v 125 ml 25 mmol/l kyseliny sírové.
- ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) s APS (persíran amonný) (7 mmol/l ABTS s 2,45 mmol/l APS):
0,038 g ABTS a 0,0056 g APS rozpustíte v 10 ml PBS. Roztok nechejte ustálit (tvorbu kationtu) do druhého dne ve tmě při laboratorní teplotě.
- Pracovní roztok ABTS s APS:
Druhý den, po ustálení tvorby kationtu ABTS⁺, roztok naředíte PBS pufrům tak, aby absorbance při 734 nm byla kolem hodnoty 0,7 ($A_{734} = 0,7$).
- 100 mmol/l K-fosfátový pufr pH 7:
Ve 100 ml destilované vody rozpustíte 17,42 g K₂HPO₄, vznikne 1 mol/l roztok. Ve 100 ml destilované vody rozpustíte 13,61 g KH₂PO₄, vznikne 1 mol/l roztok. Pro přípravu

100 mmol/l pufru o pH 7 smíchejte 61,5 ml 1 mol/l K_2HPO_4 a 38,5 ml 1 mol/l KH_2PO_4 . roztok doplňte do objemu 1 l.

- 50 mmol/l K-fosfátový pufr pH 7:
50 mmol/l pufr připravte ředěním 100 mmol/l pufru, tj v poměru 1:1 s destilovanou vodou.
- 250 mmol/l peroxid vodíku:
- Podle aktuální koncentrace 30% roztoku peroxidu vodíku jej vhodně naředte vodou tak, abyste získali roztok o koncentraci 250 mmol/l. Delším skladováním dochází ke změně koncentrace peroxidu vodíku, proto je vhodné vždy před měřením zjistit jeho aktuální koncentraci: 30% roztok peroxidu vodíku 500x naředte vodou, vzorek připravte v 5 opakováních. 3x proměřte absorbanci každého vzorku v křemenné kyvetě při 240 nm. Z průměrných naměřených hodnot absorbance vypočítejte aktuální koncentraci dle vztahu: $c \text{ (mol/l)} = A_{240}/\epsilon \times \text{faktor ředění}$ ($\epsilon = 43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} = 1 \text{ mM}$ roztok peroxidu vodíku má $A = 0,0436$ ($l = 1 \text{ cm}$) při 240 nm).
- 15 mmol/l GSH:
46,1 mg GSH rozpustíte v 10 ml destilované vody.
- 4,5 mmol/l kumenhydroperoxid:
6,6 μl roztoku kumenhydroperoxidu doplňte do 10 ml destilovanou vodou.
- 5 U/ml glutathionreduktasa:
K 5 μl roztoku glutathionreduktasy o aktivitě 500 U přidejte 495 μl 100 mmol/l K-fosfátového pufru pH 7.
- 0,75 mmol/l NADPH:
6,3 mg NADPH rozpustíte v 10 ml 100 mmol/l K-fosfátového pufru pH 7.
- Bradfordovo činidlo:
50 mg Coomassie Blue rozpustíte ve 25 ml methanolu a 50 ml 85% kyseliny fosforečné. Objem doplňte destilovanou vodou do 100 ml. Roztok uchovávejte ve tmě při 4 °C.
- Pracovní roztok Bradfordova činidla:
Bradfordovo činidlo naředte těsně před měřením destilovanou vodou v poměru 1:4 (činidlo:voda).
- Reakční pufr pro GR:
3 mg EDTA - Na_2 rozpustíte v 10 ml 100 mmol/l K-fosfátového pufru pH 7.
- 12 mmol/l NADPH:
10 mg NADPH rozpustíte v 10 ml reakčního pufru pro GR.
- 3,25 mmol/l GSSG:
1,9 mg GSSG rozpustíte v 10 ml reakčního pufru pro GR.
- 0,1 mmol/l DTNB:
0,4 mg DTNB rozpustíte v 10 ml reakčního pufru pro GR.
- TBARS činidlo A:
Připravte roztok 20% kyseliny trichloroctové (TCA) a 0,01% butylhydroxytoluenu, tj. v destilované vodě rozpustíte 20 g TCA a 0,01 g BHT, doplňte do objemu 100 ml.

- **TBARS činidlo B:**
Připravte roztok 20% kyseliny trichloroctové, 0,01% butylhydroxytoluenu a 0,65% kyseliny thiobarbiturové, tj. v destilované vodě rozpustíte 20 g TCA, 0,01 g BHT a 0,65 g kyseliny thiobarbiturové, doplňte do objemu 100 ml.
- **23,5 mmol/l Tris-HCl pufr s 3,8 mmol/l EDTA, pH 8,2 (dále jen Tris-EDTA pufr o pH 8,2)**
V 800 ml destilované vody rozpustíte 2,85 g TRIS báze a 1,41 g EDTA-Na₂. Upravte pH na hodnotu 8,2 a doplňte do objemu 1000 ml.
- **2 mmol/l pyrogallol**
Nejprve připravte roztok 0,021% HCl v destilované vodě tak, že smícháte 60 µl 35% HCl a 99,94 ml destilované vody. Následně rozpustíte 2,52 mg pyrogalolu v 10 ml vodného roztoku 0,021% HCl.

Komerční kity:

- Hemoglobin Assay Kit (Sigma-Aldrich, MAK115)
- Bovine Hsp70 ELISA Kit (FineTest)

Chemikálie:

- 30% peroxid vodíku
- 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina (Trolox)
- hovězí sérový albumin (BSA)
- 1,1,3,3-tetraethoxypropan (TEP)
- 80% ethanol (EtOH)

2.2.1 Metody pro stanovení oxidačních biomarkerů

2.2.1.1 Celkový oxidační status

Oxidační látky přítomné ve vzorku oxidují komplex železnatý ion s *o*-dianisidinem na ion železitý (Erel, 2005). Oxidační reakce je zesilována molekulami glycerolu, které jsou v reakčním médiu hojně přítomny. Železitý ion vytváří barevný komplex s xylenolovou oranží v kyselém prostředí. Intenzita zbarvení, které lze měřit spektrofotometricky, souvisí s celkovým množstvím molekul oxidantů přítomných ve vzorku. Výsledky (množství oxidačních látek ve vzorku) jsou vyjádřeny v koncentračních ekvivalentech peroxidu vodíku na objem vzorku (většinou µmol ekviv. H₂O₂/l). Tato metoda byla optimalizována pro stanovení celkového oxidačního statusu v plazmě, séru i lyzátech erytrocytů.

Pracovní postup:

1. Připravte si kalibrační sadu roztoků peroxidu vodíku v PBS pufru o koncentracích 1-2,5-5-10-20-40-80 µmol/l.

2. Alikvoty séra, plazmy a lyzátů erytrocytů rozmrazte a následně zcentrifugujte (3 minuty, 10 000 g, 4 °C).
3. Vzorky dále uchovávejte na ledu, nebo při 4 °C.
4. Lyzáty erytrocytů 20x naředte PBS puforem. Plazmu a sérum použijte pro měření neředěné.
5. Do jamky 96-jamkové mikrotitrační destičky pro měření ve VIS oblasti napipetujte 35 μ l PBS pufru (blank), standardu nebo vzorku minimálně v technickém duplikátu.
6. Do jamek přidejte 225 μ l TOS činidla I a změřte absorbanci při 560 nm (= A_{560} v čase 0).
7. Poté přidejte 11 μ l TOS činidla II.
8. Destičku mírně promíchejte a nechte inkubovat 3 minuty při laboratorní teplotě.
9. Po ukončení inkubace mikrotitrační destičku protřepejte a měřte absorbanci při vlnové délce 560 nm (= A_{560} po 3 min).

Vyhodnocení výsledků:

1. Od absorbancí standardů/vzorků odečtete průměrnou absorbanci blanku.
2. Vypočítejte rozdíl absorbancí standardů/vzorků naměřených při 560 nm po tři minutové inkubaci a po přidání TOS činidla I (= A_{560} po 3 min - A_{560} v čase 0).
3. Sestrojte kalibrační graf s využitím standardních roztoků a zjistěte rovnici přímky. Tu následně použijte pro výpočet TOS vyjádřeného jako ekvivalent koncentrace H_2O_2 na jednotku objemu analyzovaného vzorku (TOS = μ mol ekviv. H_2O_2 /l). Při výpočtech je nutné zohlednit faktor ředění vzorku. Výsledné hodnoty TOS lze v případě stanovení v lyzátech erytrocytů vztáhnout na 1 mg hemoglobinu (2.2.4.2 Koncentrace hemoglobinu).

2.2.1.2 Peroxidace lipidů - koncentrace MDA

Ke stanovení peroxidace lipidů se nejčastěji využívá reakce malondialdehydu (MDA) s kyselinou thiobarbiturovou (TBA), kterou vzniká červeně zbarvený komplex MDA:TBA v poměru 1:2. Adukty MDA a TBA jsou kvantifikovány spektrofotometricky při vlnových délkách v rozmezí 532–535 nm. Tento produkt je možné stanovit také fluorescenčně. Pro vlastní metodu lze použít kalibraci se standardem 1,1,3,3-tetraethoxypropan (TEP), který ve vodném prostředí a nízkém pH hydrolyzuje na MDA, případně lze využít molární extinkční koeficient MDA v dané vlnové délce. Tato metoda byla optimalizována pro stanovení peroxidace lipidů v lyzátech erytrocytů.

Pracovní postup:

1. Připravte si sadu standardů TEP (odpovídá MDA) pro sestavení kalibrační křivky. Pro přípravu standardů využijte 1 mol/l zásobní roztok TEP, který připravíte smícháním 10 ml 80% ethanolu (EtOH) s 2,5 μ l TEP (komerční roztok TEP o molekulové hmotnosti 220,31 g/mol, hustotě 0,919 g/ml a čistotě 97 %).

2. Zásobní roztok TEP (1 mol/l) naředíte 80% EtOH na koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ a připravte kalibrační řadu v rozsahu 0,025-50 $\mu\text{mol/l}$.
3. Přejděte ke stanovení peroxidace lipidů.
4. Do 1,5ml mikrozkušavek Eppendorf Safe lock (při vysokých teplotách následné inkubace se neotevírají a nedochází tak k odpařování roztoku) napipetujte 100 μl standardu/lyzátu erytrocytů a přidejte 100 μl 80% EtOH, a to ve dvojnásobném opakování.
5. Pro každý vzorek probíhá reakce ve dvou variantách, buď s přidavkem TBARS činidla A nebo B. Do mikrozkušavek tedy přidejte 200 μl TBARS činidla A nebo B.
6. Blank připravte smícháním 100 μl PBS, 100 μl 80% EtOH a 200 μl TBARS činidla A nebo B.
7. Inkubujte po dobu 45 min, při 90 °C v termobloku za tmy.
8. Po skončení inkubace a ochlazení vzorků na laboratorní teplotu je zcentrifugujte po dobu 10 min při 16 000 g a laboratorní teplotě.
9. Supernatanty pipetujte po 100 μl (v triplicátu) přímo do jamek mikrotitrační destičky pro měření fluorescence.
10. Změřte fluorescenci při vlnové délce excitace = 525 nm a emise = 560 nm při laboratorní teplotě.

Vyhodnocení výsledků:

1. Od fluorescence standardů/vzorků odečtete průměrnou fluorescenci blanku.
2. Pro každý vzorek/standard odečtete hodnoty fluorescence v reakci s činidlem A od hodnoty fluorescence v reakci s činidlem B.
3. Sestrojte kalibrační graf s využitím standardních roztoků a zjistěte rovnici přímky. Tu následně použijte pro výpočet koncentrace MDA ve vzorku lyzátu erytrocytů ($\mu\text{mol/l}$).
4. Získané hodnoty vztáhněte na 1 mg hemoglobinu (2.2.4.2 Koncentrace hemoglobinu).

2.2.2 Metody pro stanovení antioxidantních biomarkerů

Množství antioxidantů lze stanovit na základě měření vybraných biochemických parametrů jako jsou například stanovení celkového oxidačního stavu anebo jednotlivých aktivit oxidačních enzymů, jako např. katalasy, superoxiddismutasy, glutathionperoxidasy nebo glutathionreduktasy.

2.2.2.1 Celková antioxidantní kapacita

Celková antioxidantní kapacita (TAC) se stanovuje pomocí metody vyvinuté Erelem (Erel, 2004). Při této metodě je charakteristicky zeleně zbarvený stabilní radikál ABTS⁺ redukován antioxidanty ve vzorku, což se projeví snížením intenzity zbarvení roztoku. Tato reakce je monitorována spektrofotometricky a rychlost úbytku zbarvení je přímo úměrná TAC vzorku. Výsledky stanovení TAC jsou vyjadřovány jako ekvivalenty standardu troloxu (ve vodě rozpustný derivát vitamínu E) na jednotku objemu analyzovaného vzorku (mmol ekv.

troloxu/l). Tato metoda byla optimalizována pro stanovení celkové antioxidační kapacity v plazmě, séru i lyzátech erytrocytů.

Z hodnot získaných stanovením TAC a TOS (2.2.1.1) lze vypočítat index oxidačního stresu dle následujícího vztahu: $OSI (\%) = (TOS, \text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{ ekvivalent/l}) / (TAC, \text{mmol trolox ekvivalent./l}) \times 100$.

Pracovní postup:

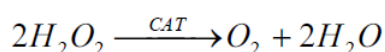
1. Připravte si kalibrační sadu roztoků troloxu v PBS pufru o koncentracích 10-20-40-60-80-100 $\mu\text{mol/l}$.
2. Alikvoty séra, plazmy a lyzátů erytrocytů rozmrazte a následně zcentrifugujte (3 minuty, 10 000 g , 4 °C).
3. Vzorky dále uchovávejte na ledu, nebo při 4 °C.
4. Vzorky (plazmu, sérum i lyzáty erytrocytů) 50x nařeďte PBS pufrem.
5. Do jamky 96-jamkové mikrotitrační destičky pro měření ve VIS oblasti napipetujte 50 μl PBS pufru (blank), standardu nebo vzorku minimálně v technickém duplikátu.
6. Do jamek přidejte 150 μl pracovního roztoku ABTS s APS.
7. Destičku mírně promíchejte a nechte inkubovat 6 minut při laboratorní teplotě.
8. Po ukončení inkubace mikrotitrační destičku protřepejte a měřte absorbanci při vlnové délce 734 nm.

Vyhodnocení výsledků:

1. Od absorbancí standardů/vzorků odečtěte průměrnou absorbanci blanku.
2. Sestrojte kalibrační graf s využitím standardních roztoků, zjistěte rovnici přímky a tu použijte pro výpočet TAC vyjádřeného jako ekvivalent koncentrace troloxu na jednotku objemu analyzovaného vzorku ($TAC = \text{mmol ekviv. troloxu/l}$). Při výpočtech je nutné zohlednit faktor ředění vzorku. Výsledné hodnoty TAC lze v případě stanovení v lyzátech erytrocytů vztáhnout na 1 mg hemoglobinu (2.2.4.2 Koncentrace hemoglobinu).

2.2.2.2 Aktivita katalasy

Aktivita katalasy (CAT, EC 1.11.1.6) se stanovuje upravenou spektrofotometrickou metodou podle Gótha (1991). Katalasa katalyzuje rozklad peroxidu vodíku na vodu a kyslík:



Rozklad peroxidu vodíku katalytickým působením enzymu se měří spektrofotometricky v UV oblasti, sledováním poklesu absorbance v čase při vlnové délce 240 nm. Tato metoda byla optimalizována pro stanovení aktivity katalasy v lyzátech erytrocytů.

Pracovní postup:

1. Alikvoty lyzátů erytrocytů rozmrazte a následně zcentrifugujte (3 minuty, 10 000 g, 4 °C).
2. Vzorky dále uchovávejte na ledu nebo při 4 °C.
3. Lyzáty erytrocytů 100x nařeďte PBS puftrem.
4. Do jamky 96-jamkové mikrotitrační destičky pro měření v UV oblasti napipetujte 200 μl 50 mmol/l K-fosfátového pufru pH 7.
5. Do jamek přidejte 50 μl naředěných lyzátů erytrocytů.
6. Reakci startujte přídávkem 20 μl 250 mmol/l peroxidu vodíku. Do blanků přidejte místo peroxidu vodíku stejné množství vody. Každý vzorek má svůj blank pro odečtení spontánních změn absorbance v samotném vzorku.
7. Každý vzorek měřte alespoň v technickém triplikátu.
8. Po zahájení reakce (přídavku peroxidu vodíku) destičku ihned vložte do mikrodestičkového spektrofotometru a měřte změnu (pokles) absorbance při 240 nm dle nastaveného protokolu s následujícími parametry:
 - teplota reakce: 25 °C
 - doba měření: 5 minut
 - interval měření: 1 minuta
 - vlnová délka: 240 nm
 - před každým změřením absorbance v daných intervalech destičku promíchat
 - na závěr proměřit absorbanci při 900 a 977 nm pro výpočet délky optické dráhy.

Vyhodnocení výsledků:

1. Od absorbancí vzorků odečtete průměrnou absorbanci blanku.
2. Pro výpočet aktivity katalasy v objemu vzorku pipetovaného do reakce (a, katal) použijte následující vztah:

$$a = \Delta A \times V_c / \epsilon \times l \times t$$
 kde ΔA označuje změnu absorbance ve sledovaném časovém úseku (změna absorbance za 5 min), V_c je celkový reakční objem v jamce mikrotitrační destičky (0,00027 l), ϵ je molární absorpční koeficient peroxidu vodíku (39,4 l/mol.cm), l je délka optické dráhy, t je celková doba měření v sekundách (300 s).
 Délka optické dráhy se vypočítá podle vzorce: $l [\text{cm}] = (A_{977} - A_{900}) / 0,18$. Vypočítaná hodnota je při dodržení pipetovaných objemů do reakce kolem 0,7 cm.
3. Pro vyhodnocení použijte lineární část závislosti absorbance na čase. Aktivitu katalasy (v objemu vzorku pipetovaného do reakce) vypočítanou dle vzorce výše je vhodné převést na menší jednotky μkat/nkat/pkat a vztáhnout buď na 1 ml analyzovaného vzorku, na 1 mg proteinů (2.2.4.1 Koncentrace proteinů) nebo 1 mg hemoglobinu (2.2.4.2 Koncentrace hemoglobinu). Při výpočtech je nutné zohlednit faktor ředění vzorku.

2.2.2.3 Aktivita superoxidodismutasy

Měření aktivity superoxidodismutasy (SOD) podle Marklund & Marklund (1974) je založeno na schopnosti tohoto enzymu inhibovat autooxidaci pyrogallolu. Jednotka aktivity SOD (AU – „arbitrary units“) je definována jako množství enzymu, které inhibuje reakci autooxidace pyrogallolu o 50 %. Pyrogallol ve vodném roztoku rychle oxiduje, a to tím rychleji, čím je vyšší pH roztoku. Vzniká oxidační produkt žluto-hnědé barvy, který vykazuje absorpční maximum při 320 nm. Tato metoda byla optimalizována pro stanovení aktivity SOD v lyzátech erytrocytů.

Pracovní postup:

1. Alikvoty lyzátů erytrocytů rozmrazte a následně zcentrifugujte (3 minuty, 10 000 g, 4 °C).
2. Vzorky dále uchovávejte na ledu nebo při 4 °C.
3. Lyzáty erytrocytů 25x naředte PBS puforem, pH = 7,4.
4. Do 96-jamkové destičky pro měření v UV oblasti napipetujte 220 µl Tris-EDTA pufru (pH8,2) a 20 µl vhodně naředěného vzorku (tj. lyzát erytrocytů s ředěním 25x).
5. V případě blanku je vzorek nahrazen 20 µl Tris-EDTA pufru (pH 8,2).
6. Nakonec multikanálovou pipetou přidejte 20 µl 2 mmol/l pyrogallolu v 0,021% HCl.
7. Každý vzorek měřte alespoň v technickém triplikátu.
8. Po zahájení reakce (přidavku pyrogallolu) destičku ihned vložte do mikrodestičkového spektrofotometru a měřte změnu (nárůst) absorbance při 320 nm dle nastaveného protokolu s následujícími parametry:
 - teplota reakce: 30 °C
 - doba měření: 4 minuty
 - interval měření: 30 sekund
 - vlnová délka: 320 nm
 - před každým změřením absorbance v daných intervalech destičku promíchat.

Vyhodnocení výsledků:

1. Prvně vypočítejte průměrnou hodnotu autooxidace pyrogallolu v blanku a v jamkách se vzorky. Z lineární části závislosti absorbance na čase zjistěte změnu absorbance za 1 minutu pro každou jamku blanku i vzorků.
2. Poté vypočítejte průměrnou hodnotu změny absorbance za 1 minutu pro blank obsahující pyrogallol bez vzorku. Tato hodnota odpovídá 100% autooxidaci pyrogallolu.
3. Následně dopočítejte procentuelní autooxidaci pyrogallolu v jamkách se vzorky pomocí trojčlenky.
4. Hodnota inhibice autooxidace pyrogallolu SOD obsaženou ve vzorku se vypočítá jako rozdíl 100 % (autooxidace pyrogallolu) a vypočítané autooxidace v jamkách se vzorky.
5. Poté vypočítejte vztaženou aktivitu, tj. vztažení k jednotce aktivity SOD, kdy 1 AU = množství enzymu, které inhibuje reakci autooxidace pyrogallolu o 50 %:

$$a_v = \frac{100 - \bar{o}}{50} \times f \text{ [AU]}$$

a_v vztažená aktivita

f ředící faktor

\bar{o} ... průměrná hodnota autooxidace pyrogallolu v jamce se vzorkem (%)

6. Ze vztažené aktivity vypočítejte celkovou aktivitu v 1 ml lyzátu erytrocytů:

$$a = \frac{a_v \times V}{V_L} \text{ [AU]}$$

a celková aktivita v 1 ml lyzátu erytrocytů

a_v vztažená aktivita

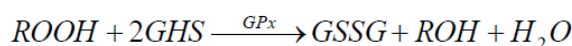
V objem naředěného lyzátu odpovídající 1 ml

V_L objem lyzátu erytrocytů v reakční směsi

7. Nakonec vypočítejte aktivitu SOD v lyzátu erytrocytů vztaženou na 1 mg hemoglobinu (2.2.4.2 Koncentrace hemoglobinu).

2.2.2.4 Aktivita glutathionperoxidasy

Stanovení aktivity glutathionperoxidasy (GPx, EC 1.11.1.9) se provádí pomocí upravené spektrofotometrické metody podle Flohé & Günzler (1984). Aktivita GPx se stanovuje na základě dvou spřažených reakcí:



Glutathionperoxidasa, za účasti redukováného glutathionu (GSH), katalyzuje redukci organických hydroperoxidů. Vzniklá molekula oxidovaného glutathionu (GSSG) je redukována enzymem glutathionreduktasou (GR) s využitím NADPH. Stanovení úbytku NADPH (donoru elektronů reakce) pro zjištění aktivity GPx je provedeno spektrofotometricky, měřením poklesu absorbance v čase při 340 nm. Tato metoda byla optimalizována pro stanovení aktivity GPx v plazmě, séru i lyzátech erytrocytů.

Pracovní postup:

1. Alikvoty měřených vzorků rozmrazte a následně zcentrifugujte (3 minuty, 10 000 g, 4 °C).
2. Vzorky dále uchovávejte na ledu, nebo při 4 °C.
3. Lyzáty erytrocytů 50x naředte PBS pufrem. Plazmu a sérum použijte pro měření neředěné.
4. Do jamky 96-jamkové mikrotitrační destičky pro měření v UV oblasti napipetujte:
 - 50 µl 15 mmol/l GSH
 - 10 µl vzorku
 - 50 µl 5 U/ml glutathionreduktasy

50 μ l 0,75 mmol/l NADPH

5. Reakci startujte přidavkem 50 μ l 4,5 mmol/l kumenhydroperoxidu. Do blanků přidejte místo kumenhydroperoxidu stejné množství vody. Každý vzorek má svůj blank pro odečtení případné reakce ve vzorku samotném.
6. Každý vzorek měřte alespoň v technickém triplikátu.
7. Po zahájení reakce přidavkem kumenhydroperoxidu destičku ihned vložte do spektrofotometru a měřte změnu absorbance při 340 nm dle nastaveného protokolu s následujícími parametry:
 - teplota reakce: 25 °C
 - doba měření: 5 minut
 - interval měření: 1 minuta
 - vlnová délka: 340 nm
 - před každým změřením absorbance v daných intervalech destičku promíchat
 - na závěr proměřit absorbanci při 900 a 977 nm pro výpočet délky optické dráhy.

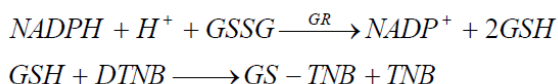
Vyhodnocení výsledků:

1. Od absorbancí vzorků odečtete průměrnou absorbanci blanku.
2. Pro výpočet aktivity GPx v objemu vzorku pipetovaného do reakce (a, katal) ve vzorku použijte následující vztah:

$$a = \Delta A \times V_c / \epsilon \times l \times t$$
 kde ΔA označuje změnu absorbance ve sledovaném časovém úseku (změna absorbance za 5 min), V_c je celkový reakční objem v jamce mikrotitrační destičky (0,00021 l), ϵ je molární absorpční koeficient NADPH (6220 l/mol.cm), l je délka optické dráhy, t je celková doba měření v sekundách (300 s).
 Délka optické dráhy se vypočítá podle vzorce: $l \text{ [cm]} = (A_{977} - A_{900}) / 0,18$. Vypočítaná hodnota je při dodržení pipetovaných objemů do reakce kolem 0,5 cm.
3. Pro vyhodnocení použijte lineární část závislosti absorbance na čase. Aktivitu GPx (v objemu vzorku pipetovaného do reakce) vypočítanou dle vzorce výše je vhodné převést na menší jednotky μ kat/nkat/pkat a vztáhnout buď na 1 ml analyzovaného vzorku, na 1 mg proteinů (2.2.4.1 Koncentrace proteinů) nebo v případě lyzátů erytrocytů na 1 mg hemoglobinu (2.2.4.2 Koncentrace hemoglobinu). Při výpočtech je nutné zohlednit faktor ředění vzorku.

2.2.2.5 Aktivita glutathionreduktasy

Aktivita enzymu glutathionreduktasy (GR, EC 1.6.4.2) se stanovuje upravenou spektrofotometrickou metodou podle Cribba et al. (1989). GR katalyzuje NADPH-dependentní redukci GSSG za vzniku GSH a NADP^+ . Redukovaný glutathion poté spontánně reaguje s chromogenním substrátem 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoovou) kyselinou (DTNB).



Vznikající barevný produkt 5-thio-2-nitrobenzoová kyselina (TNB) se měří spektrofotometricky jako nárůst absorbance v čase při vlnové délce 412 nm. Tato metoda byla optimalizována pro stanovení aktivity GR v krevní plazmě a séru.

Pracovní postup:

1. Alikvoty měřených vzorků rozmrazte a následně zcentrifugujte (3 minuty, 10 000 g, 4 °C).
2. Vzorky dále uchovávejte na ledu, nebo při 4 °C.
3. Krevní plazmu nebo sérum 5x naředte PBS pufrem.
4. Do jamky 96-jamkové mikrotitrační destičky pro měření ve VIS oblasti napipetujte:
 - 40 µl vzorku
 - 10 µl 12 mmol/l NADPH
 - 150 µl 0,1 mmol/l DTNB
5. Reakci startujte přidavkem 10 µl 3,25 mmol/l GSSG. Do blanků přidejte místo GSSG stejný objem reakčního pufru pro GR. Každý vzorek má svůj blank pro odečtení případné reakce ve vzorku samotném.
6. Každý vzorek měřte alespoň v technickém triplikátu.
7. Po zahájení reakce (přidavku GSSG) destičku ihned vložte do spektrofotometru a měřte změnu absorbance při 412 nm dle nastaveného protokolu s následujícími parametry:
 - teplota reakce: 25 °C
 - doba měření: 10 minut
 - interval měření: 1 minuta
 - vlnová délka: 412 nm
 - před každým změřením absorbance v daných intervalech destičku promíchat
 - na závěr proměřit absorbanci při 900 a 977 nm pro výpočet délky optické dráhy.

Vyhodnocení výsledků:

1. Od absorbancí vzorků odečtete průměrnou absorbanci blanku.
2. Pro výpočet aktivity GR v objemu vzorku pipetovaného do reakce (a, katal) použijte následující vztah:

$$a = \Delta A \times V_c / \epsilon \times l \times t$$
 kde ΔA označuje změnu absorbance ve sledovaném časovém úseku (změna absorbance za 10 min), V_c je celkový reakční objem v jamce mikrotitrační destičky (0,00021 l), ϵ je molární absorpční koeficient TNB (14150 l/mol.cm), l je délka optické dráhy, t je celková doba měření v sekundách (600 s).
 Délka optické dráhy se vypočítá podle vzorce: $l \text{ [cm]} = (A_{977} - A_{900}) / 0,18$. Vypočítaná hodnota je při dodržení pipetovaných objemů do reakce kolem 0,5 cm.
3. Pro vyhodnocení použijte lineární část závislosti absorbance na čase. Aktivitu GR (v objemu vzorku pipetovaného do reakce) vypočítanou dle vzorce výše je vhodné převést na menší jednotky $\mu\text{kat}/\text{nkat}/\text{pkat}$ a vztáhnout buď na 1 ml analyzovaného

vzorku nebo na 1 mg proteinů (2.2.4.1 Koncentrace proteinů). Při výpočtech je nutné zohlednit faktor ředění vzorku.

2.2.3 Kvantifikace Hsp70

Množství Hsp70 se stanovuje v séru komerčním kitem založeným na sendvičové ELISA metodě (Bovine Hsp70 ELISA Kit (FineTest)). Stanovení je založeno na zachycení proteinu HSP 70 na dno jamek, na které je navázána protilátka. Jako detekční protilátka je využita protilátka konjugovaná s biotinem. Po promytí je přidán komplex streptavidinu s křenovou peroxidasou (HRP). Nenavázaný komplex streptavidinu s HRP je odstraněn, jamky jsou promyty a je přidán substrát pro HRP – 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB). Po proběhnutí enzymové reakce vzniká modrý produkt, který po přidavku kyselého STOP roztoku mění barvu z modré na žlutou. Tento produkt je detekován spektrofotometricky při 450 nm. Pro výpočet množství Hsp70 jsou vždy rovněž proměřeny standardy Hsp70 a je sestrojena odpovídající kalibrační křivka. Následně je množství Hsp70 vztaženo na 1 mg proteinu ve vzorku. Tato metoda byla optimalizována pro stanovení množství Hsp70 v krevním séru.

Pracovní postup s využitím „Bovine Hsp70 ELISA Kit“:

- 1) Nejprve je potřeba provést ELISA metodu se vzorky séra v monoplikátu pro zjištění vhodného ředění vzorku.
- 2) Dále ELISA opakujte v duplikátu a se standardy Hsp70 pro sestavení kalibrační křivky umožňující výpočet množství Hsp70 ve vzorku. Standardy připravte v koncentračním rozpětí 0,3125 – 0,625 – 1,125 – 2,5 -5 ng/ml v Sample Dilution Buffer.
- 3) Vhodně nařeďte vzorky v PBS pufru a dále s „Sample Dilution Buffer“ dle instrukcí výrobce kitu.
- 4) Do jamek destičky v duplikátu napipetujte po 100 µl standardy a blank (tj. Sample Dilution Buffer).
- 5) Po 100 µl napipetujte správně naředěné vzorky a destičku inkubujte při 37 °C po dobu 90 minut.
- 6) Odstraňte obsah jamek a destičku 2x promyjte promývacím pufrem.
- 7) Do jamek přidejte 100 µl protilátky značené biotinem a inkubujte při 37 °C po dobu 60 min.
- 8) Odstraňte obsah jamek a destičku 3x promyjte promývacím pufrem.
- 9) Do jamek napipetujte komplex streptavidinu s HRP (SABC) po 100 µl a inkubujte při 37 °C po dobu 30 min.
- 10) Odstraňte obsah jamek a destičku 5x promyjte promývacím pufrem.
- 11) Do jamek napipetujte 90 µl TMB (předem ekvilibrovaného při 37 °C) a inkubujte při 37 °C za tmy po dobu 10 min.
- 12) Poté do jamek přidejte 50 µl STOP roztoku, dojde k zežloutnutí původně modrého produktu.
- 13) Ihned změřte absorbanci při 450 nm.

Vyhodnocení výsledků:

1. Od absorbancí standardů a vzorků odečtete průměrnou absorbanci blanku.

2. Z naměřených absorbancí pro standardy Hsp70 sestavte kalibrační křivku.
3. Ze získané rovnice kalibrační křivky spočítejte množství Hsp70 ve vzorku, nezapomeňte zohlednit všechna ředění vzorku séra.
4. Množství Hsp70 v séru vztáhněte na 1 mg proteinu (2.2.4.1 Koncentrace proteinů).

2.2.4 Další parametry

2.2.4.1 Koncentrace celkových proteinů

Koncentraci celkových proteinů lze stanovit metodou dle Bradforda (Bradford, 1976). Tato metoda je založena na tvorbě komplexu mezi proteiny a triarylmetanovým barvivem Coomassie Brilliant Blue G-250 v kyselém prostředí. Po vazbě na protein se absorpční maximum CBB G-250 posunuje ze 465 na 595 nm. Jako standard pro tuto metodu se používá hovězí sérový albumin (BSA). Tato metoda byla optimalizována pro stanovení koncentrace proteinů v krevní plazmě, séru i lyzátech erytrocytů.

Pracovní postup:

1. Připravte si kalibrační sadu roztoků BSA v PBS pufru o koncentracích 0,1-0,2-0,3-0,4-0,5-0,6 mg/ml.
2. Alikvoty séra, plazmy a lyzátů erytrocytů rozmrazte a následně zcentrifugujte (3 minuty, 10 000 g, 4 °C).
3. Vzorky krevního séra a plazmy naředte PBS pufrům 100x a vzorky lyzátů erytrocytů 50x.
4. Do jamky 96-jamkové mikrotitrační destičky pro měření ve VIS oblasti napipetujte 45 µl vody a přidejte 5 µl PBS pufru (blank), standardu nebo vzorku minimálně v technickém duplikátu.
5. Do jamek přidejte 200 µl pracovního roztoku Bradfordova činidla.
6. Destičku mírně promíchejte a nechte inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě.
7. Po ukončení inkubace mikrotitrační destičku protřepejte a měřte absorbanci při vlnové délce 595 nm.

Vyhodnocení výsledků:

1. Od absorbancí standardů/vzorků odečtete průměrnou absorbanci blanku.
2. Sestrojte kalibrační graf s využitím standardních roztoků, zjistěte rovnici přímky. Tu následně použijte pro výpočet koncentrace celkových proteinů ve vzorku. Při výpočtech je nutné zohlednit faktor ředění vzorku.

2.2.4.2 Koncentrace hemoglobinu

Koncentraci hemoglobinu s využitím komerčního kitu „Hemoglobin Assay Kit“ od firmy Sigma-Aldrich (MAK115) lze stanovit ve všech typech vzorků (plazma, sérum i lyzáty

erytrocytů). Stanovení je založeno na vylepšené Triton/NaOH metodě, kdy dochází k přeměně hemoglobinu na barevný produkt, který lze měřit spektrofotometricky při 400 nm. V plazmě a séru se přítomnost hemoglobinu měří pouze z důvodu vyloučení hemolyzovaných vzorků v klinické praxi, kdy může dojít k ovlivnění správnosti výsledků některých stanovení (aktivity enzymů, interference při měření absorbancí, atd.). Jako hemolyzované vzorky se označují ty, kde množství hemoglobinu v séru je vyšší než 0,4 mg/ml a v plazmě 0,2 mg/ml. Koncentrace hemoglobinu v připravených lyzátech erytrocytů je použita pro vyjádření specifické aktivity sledovaných antioxidačních enzymů.

Pracovní postup s využitím „Hemoglobin Assay Kit“:

1. Rozmrazte a následně zcentrifugujte (3 minuty, 10 000 g, 4 °C) alikvoty plazmy, séra a lyzáty erytrocytů.
2. Lyzáty erytrocytů 50x naředte PBS pufrém. Plazmu a sérum použijte pro měření neředěné.
3. Kit pro stanovení koncentrace hemoglobinu vytemperujte na laboratorní teplotu.
4. Dále postupujte dle instrukcí výrobce kitu, tj dle přiloženého manuálu.
5. Do jamky 96-jamkové mikrotitrační destičky pro měření ve VIS oblasti napipetujte 50 µl PBS pufru (blank), kalibrátoru (součástí kitu) nebo vzorku minimálně v technickém duplikátu.
6. K blanku a kalibrátoru přidejte 200 µl vody a ke vzorkům 200 µl reakčního pufru.
7. Destičku mírně promíchejte a nechte inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě.
8. Po ukončení inkubace měřte absorbanci při vlnové délce 400 nm.

Vyhodnocení výsledků dle manuálu z komerčního kitu:

1. Od absorbancí kalibrátoru a vzorků odečtete průměrnou absorbanci blanku.
2. Koncentraci hemoglobinu (mg/ml) vypočítejte dle následujícího vzorce:

$$(A_{400} \text{ vzorku} / A_{400} \text{ kalibrátoru}) \times 1 \text{ mg/ml} \times f \text{ (ředicí faktor)}$$
 koncentrace kalibrátoru v jamce = 1 mg/ml

3. Závěr

Předkládaná metodika detailně popisuje proces odběrů krve skotu, jejich zpracování a vybrané biochemické analýzy vedoucí k získání obrazu míry oxidačního stresu zvířete. Pro stanovení parametrů oxidačního stresu byl vybrán z často velkého množství publikovaných metodik vždy jen jeden zástupce a v metodice detailně popsán jak princip a postup stanovení, tak i postup vyhodnocení a získání výsledků. Tabulka 3 shrnuje všechny v metodice popisované parametry oxidačního stresu, zdroje metod a vzorky, pro které byly tyto metody optimalizovány.

Tab. 3 Přehled stanovovaných parametrů oxidačního stresu v daných typech vzorků a zdroje použitých metod. S – krevní sérum, P – krevní plazma, L – lyzát erytrocytů.

	Metodika podle	Vzorek	Stanovení optimalizováno
Metody stanovení oxidačních biomarkerů:			
Celkový oxidační status	Erel, 2005	S	ano
		P	ano
		L	ano
Peroxidace lipidů	Hodges et al., 1999	S	ne
		P	ne
		L	ano
Metody stanovení antioxidačních biomarkerů:			
Celková antioxidační kapacita	Erel, 2004	S	ano
		P	ano
		L	ano
Katalasa	Góth, 1991	S	ne
		P	ne
		L	ano
Superoxiddismutasa	Marklund & Marklund, 1974	S	ne
		P	ne
		L	ano
Glutathionperoxidasa	Flohé & Günzler, 1984	S	ano
		P	ano
		L	ano
Glutathionreduktasa	Cribb et al., 1989	S	ano
		P	ano
		L	ne
Další parametry:			
Hsp70	Komerční kit	S	ano
		P	ne
		L	ne
Celkové proteiny	Bradford, 1976	S	ano
		P	ano
		L	ano
Hemoglobin	Komerční kit	S	ano
		P	ano
		L	ano

4. Doporučení pro praxi

Pro přesné stanovení biochemických parametrů je důležité dodržet popsané pracovní postupy odběru krve a jejich zpracování. Nutné je vyloučit případné hemolyzované vzorky krevního séra a plazmy. Vzorky po rozmrazení a během měření je potřeba skladovat v chladu, aby nedocházelo k denaturaci proteinů a tím ke snížení aktivity testovaných antioxidačních enzymů. Je potřeba se vyvarovat také opakovanému rozmražení vzorků. Při pipetování do mikrotitračních destiček je nezbytné zamezit vzniku bublin v jamkách, případně je před měřením ve spektrofotometru odstranit (např. protřepáním, nebo propíchnutím jehlou).

III. Stanovení novosti postupů

V metodice jsou shrnuty současné poznatky o možnosti nejčastěji používaných biochemických analýz krve v oblasti oxidačního stresu, tedy vybrané metody a jejich principy, detailní pracovní postupy a vyhodnocení získaných výsledků. Všechna stanovení jsou z původně publikovaných metodik přepracována pro stanovení v mikrotitračních destičkách s využitím mikrodestičkového spektrofotometru. Tento typ stanovení vyniká rychlým změřením velkého množství vzorků najednou, úsporou objemu testovaných vzorků a také malou spotřebou reagensů oproti klasickému měření v kyvetách.

IV. Popis uplatnění metodiky

Metodika je určena vědeckým pracovníkům, studentům, pracovníkům v oblasti biochemie a dalším, kteří se zajímají o problematiku oxidačního stresu a jeho stanovením.

Metodika sledování parametrů oxidačního stresu u skotu v krvi představuje důležitý nástroj pro monitorování zdraví zvířat.

Uplatnění této metodiky může být následující:

1. **Diagnostika zdravotního stavu:** Včasné odhalení oxidačního stresu může pomoci v diagnostice různých onemocnění a zdravotních problémů, jako jsou např. zánětlivé procesy či metabolické poruchy. Biochemická vyšetření zaměřená na specifické biomarkery, jako jsou antioxidanty, včetně enzymů podílejících se na ochraně proti oxidačnímu stresu (např. superoxidodismutasa), mohou poskytnout cenné informace o změnách v aktuálním zdravotním stavu zvířete.
2. **Optimalizace výživy:** Na základě výsledků testů lze efektivněji přizpůsobit nutriční strategie, včetně krmné dávky, aby bylo zajištěno dostatečné množství mikroprvků, stopových prvků a dalších živin. To může vést k lepší odolnosti zvířat vůči stresovým faktorům a nemocem.
3. **Monitorování reprodukčního zdraví:** Oxidační stres může negativně ovlivnit reprodukční zdraví skotu. Pravidelným sledováním parametrů oxidačního stresu lze rychle identifikovat problémy a provádět cílené intervence, což může zlepšit reprodukční úspěšnost.
4. **Kontrola stresových stavů a jejich prevence:** Metodika může být aplikována k monitorování skotu v různých stresových situacích, například během porodu, transportu nebo změny prostředí. Identifikace zvýšeného oxidačního stresu v těchto obdobích umožňuje včasné zásahy, které mohou snížit riziko následných zdravotních problémů a ztrát v produkci. Sledování parametrů oxidačního stresu přispívá k výzkumu fyziologického stavu zvířat a může napomoci k vývoji strategií pro zlepšení životních podmínek skotu, čímž se zvyšuje jejich celková pohoda.

Zavedením této metodiky do praxe mohou chovatelé skotu zlepšit zdravotní stav a užitkovost svých zvířat, snížit ekonomické ztráty způsobené nemocemi a podpořit celkovou udržitelnost chovu.

V. Ekonomické aspekty metodiky

Dobrý zdravotní stav zvířat je úzce spojený s dobrou ekonomikou chovu. Každé onemocnění zvířat přináší nejen zvýšené náklady, ale především ovlivňuje pohodu zvířat v chovu/stádu. Významnou roli hraje v tomto směru prevence stresovým situacím, jejichž společným důsledkem může být rozvoj oxidačního stresu na úrovni buněk, tkání, orgánů i celkového stavu organismu.

Jak již bylo uvedeno v předcházející kapitole (III. Stanovení novosti postupů), uvedené biochemické analýzy provedené s využitím mikrodestičkového spektrofotometru umožňují paralelní analýzu několika vzorků, což se odráží na zkrácení časové náročnosti analýzy, a dále přináší úsporu objemu testovaných vzorků včetně nižší spotřeby reagensů. Tyto benefity vedou k nižším ekonomickým nákladům při analýzách. Klíčové ekonomické faktory mohou být následující:

1. Náklady na testování:

- Přímé náklady: zahrnují cenu biochemických testů, používaných chemikálií, reakčních činidel a dopravy vzorků do laboratoře. Tyto náklady mohou být variabilní v závislosti na frekvenci testování a počtu testovaných zvířat (velikosti chovu).
- Nepřímé náklady: mohou zahrnovat čas personálu při odběru vzorků, přípravy laboratoře a dalších administrativních úkolů.

2. Návratnost investice:

- Zdraví zvířat: pravidelné sledování oxidačního stresu může vést k časně detekci zdravotních problémů a prevenci onemocnění, což snižuje náklady na veterinární péči a ztráty spojené s úhynem zvířat.
- Zvýšení produkce: udržování optimálního zdraví skotu může vést ke zvýšení produkce a kvality mléka a masa, což výrazně zvyšuje příjmy farmáře.

3. Prevence a management:

- Optimalizace krmné směsi: identifikace zvířat trpících oxidačním stresem může pomoci farmářům optimalizovat krmnou strategii.
- Zlepšení managementu stáda: strukturované sledování zdraví znamená lepší plánování reprodukce a zlepšení celkového managementu stáda.

4. Další ekonomické přínosy:

- Snížení výskytu nemocí: nižší výskyt nemocí spojených s oxidačním stresem snižuje náklady na léčbu a ztrátu produktivity.
- Snížení ekologického dopadu: zlepšený zdravotní stav zvířat může vést k efektivnějšímu využití zdrojů (krmení, voda, energetické a přírodní zdroje, finanční prostředky) a snížení emisí, což může být ekonomicky výhodné s ohledem na budoucí regulace a dotace.

V závěru, implementace metodiky sledování oxidačního stresu u skotu prostřednictvím výše uvedených vybraných vyšetření z krve se ukazuje jako ekonomicky prospěšná strategie, která může zlepšit prevenci onemocnění a zlepšení zdraví zvířat, zvýšit produktivitu a přispět k ekonomické udržitelnosti chovu.

VI. Seznam použité související literatury

Alamu, O., Rado, M., Ekpo, O., & Fisher, D. (2020). Differential Sensitivity of Two Endothelial Cell Lines to Hydrogen Peroxide Toxicity: Relevance for In Vitro Studies of the Blood–Brain Barrier. *Cells*, *9*(2), 403. <https://doi.org/10.3390/cells9020403>

Bafana, A., Dutt, S., Kumar, A., Kumar, S., & Ahuja, P. S. (2011). The basic and applied aspects of superoxide dismutase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *68*(2), 129-138. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.11.007>

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Cribb, A. E., Leeder, J. S., & Spielberg, S. P. (1989). Use of a microplate reader in an assay of glutathione reductase using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal Biochem*, *183*(1), 195-196. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90188-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90188-7)

Da Costa, L. A., Badawi, A., & El-Soheby, A. (2012). Nutrigenetics and Modulation of Oxidative Stress. *Ann Nutr Metab*, *60*(Suppl. 3), 27-36. <https://doi.org/10.1159/000337311>

Dahiya, V., & Buchner, J. (2019). Functional principles and regulation of molecular chaperones. *Molecular Chaperones in Human Disorders*, *114*, 1-60. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2018.10.001>

Epstein, C. J., Avraham, K. B., Lovett, M., Smith, S., Elroy-Stein, O., Rotman, G., Bry, C., & Groner, Y. (1987). Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity: animal model of dosage effects in Down syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *84*(22), 8044-8048. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.22.8044>

Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*, *37*(4), 277-285. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015>

Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*, *38*(12), 1103-1111. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008>

Flohé, L., & Günzler, W. A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, *105*, 114-120. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05015-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05015-1)

Flohé, L., Toppo, S., & Orian, L. (2022). The glutathione peroxidase family: Discoveries and mechanism. *Free Radical Biology and Medicine*, *187*, 113-122. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.05.003>

Glorieux, C., & Calderon, P. B. (2017). Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological Chemistry*, *398*(10), 1095-1108. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0131>

Gonzalez-Pacheco, F. R., Deudero, J. J., Castellanos, M. C., Castilla, M. A., Alvarez-Arroyo, M. V., Yague, S., & Caramelo, C. (2006). Mechanisms of endothelial response to oxidative aggression: protective role

of autologous VEGF and induction of VEGFR2 by H₂O₂. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291, H1395-1401. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01277.2005>

Góth, L. (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta*, 196(2-3), 143-151. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(91\)90067-M](https://doi.org/10.1016/0009-8981(91)90067-M)

Hejel, P., Sáfár, J., Bognár, B., Kiss, L., Jurkovich, V., Brydl, E., & Könyves, L. (2021). The impact of the oxidative status on the reproduction of cows and the calves' health – a review. *Acta Vet Brno*, 90(1), 3-13. <https://doi.org/10.2754/avb202190010003>

Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., & Prange, R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207(4), 604-611. <https://doi.org/10.1007/s004250050524>

Jóźwik, A., Krzyżewski, J., Strzałkowska, N., Poławska, E., Bagnicka, E., Wierzbicka, A., Niemczuk, K., Lipińska, P., & Horbańcu, J. O. (2012). Relations between the oxidative status, mastitis, milk quality and disorders of reproductive functions in dairy cows - a review. *Anim Sci Pap Rep*, 30, 297-307.

Kalmar, B., & Greensmith, L. (2009). Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(4), 310-318. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.02.003>

Kim, Y. -M., Kim, S. -J., Tatsunami, R., Yamamura, H., Fukai, T., & Ushio-Fukai, M. (2017). ROS-induced ROS release orchestrated by Nox4, Nox2, and mitochondria in VEGF signaling and angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 312(6), C749-C764. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00346.2016>

Mannervik, B. (1985). Glutathione peroxidase. *Glutamate, Glutamine, Glutathione, and Related Compounds*, 113, 490-495. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(85\)13063-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(85)13063-6)

Marklund, S., & Marklund, G. (1974). Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *Eur J Biochem*, 47(3), 469-474. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>

Martinelli, I., Zucchi, E., Simonini, C., Gianferrari, G., Zamboni, G., Pinti, M., & Mandrioli, J. (2023). The landscape of cognitive impairment in superoxide dismutase 1-amyotrophic lateral sclerosis. *Neural Regeneration Research*, 18(7), 1427-1433. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.361535>

McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem*, 244(22), 6049-6055.

Mills, G. C. (1957). Hemoglobin Catabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 229(1), 189-197. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)70608-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)70608-X)

Mondola, P., Damiano, S., Sasso, A., & Santillo, M. (2016). The Cu, Zn Superoxide Dismutase: Not Only a Dismutase Enzyme. *Frontiers in Physiology*, 7, 594. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00594>

Niki, E. (2009). Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects: Physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(5), 469-484. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.032>

- O'Flaherty, C. (2019). Orchestrating the antioxidant defenses in the epididymis. *Andrology*, 7(5), 662-668. <https://doi.org/10.1111/andr.12630>
- Reed, T. T. (2011). Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(7), 1302-1319. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.027>
- Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G., & Hoekstra, W. G. (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase: Biochemical Role as a Component of Glutathione Peroxidase. *Science*, 179(4073), 588-590. <https://doi.org/10.1126/science.179.4073.588>
- Smith, C. J., Perfetti, T. A., & King, J. A. (2019). Indirect oxidative stress from pulmonary inflammation exceeds direct oxidative stress from chemical damage to mitochondria. *Toxicology Research and Application*, 3, 1-10. <https://doi.org/10.1177/2397847319842845>
- Taherkhani, S., Suzuki, K., & Castell, L. (2020). A Short Overview of Changes in Inflammatory Cytokines and Oxidative Stress in Response to Physical Activity and Antioxidant Supplementation. *Antioxidants*, 9(9), 886. <https://doi.org/10.3390/antiox9090886>
- Ursini, F., & Maiorino, M. (2020). Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPx4. *Free Radical Biology and Medicine*, 152, 175-185. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.027>
- Wang, B., Wang, Y., Zhang, J., Hu, C., Jiang, J., Li, Y., & Peng, Z. Y. (2023). ROS-induced lipid peroxidation modulates cell death outcome: mechanisms behind apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Archives of Toxicology*, 97(6), 1439-1451. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03476-6>
- Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A. (2011). Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chemical Reviews*, 111(10), 5944-5972. <https://doi.org/10.1021/cr200084z>
- Yuan, F., Yin, S., Xu, Y., Xiang, L., Wang, H., Li, Z., Fan, K., & Pan, G. (2021). The Richness and Diversity of Catalases in Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 12, 645477. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.645477>
- Zámocký, M., & Koller, F. (1999). Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 72(1), 19-66. [https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(98\)00058-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(98)00058-3)
- Zhao, X. -J., Wang, X. -Y., Wang, J. -H., Wang, Z. -Y., Wang, L., & Wang, Z. -H. (2015). Oxidative Stress and Imbalance of Mineral Metabolism Contribute to Lameness in Dairy Cows. *Biol Trace Elem Res*, 164(1), 43-49. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-0207-1>

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

Bezdíček, J., Nesvadbová, A., Makarevich, A. & Kubovičová, E. (2021). Negative impact of heat stress on reproduction in cows: Animal husbandry and biotechnological viewpoints: A review. *Czech J Anim Sci*, 66, 293-301. doi.org/10.17221/44/2021-CJAS.

Makarevich, A., Špaleková, E., Kubovičová, E., Bezdíček, J., Chrenek, P. (2022) Cooling storage of ram sperm in presence of antioxidant glutathione. *Czech J Anim Sci*, 67(9), 356-364. <https://doi.org/10.17221/113/2022-CJA>.

Olexiková, L., Dujíčková, L., Makarevich, A. -V., Bezdíček, J., Sekaninová, J., Nesvadbová, A., Chrenek, P. (2023). Glutathione during Post-Thaw Recovery Culture Can Mitigate Deleterious Impact of Vitrification on Bovine Oocytes. *Antioxidants*, 12(35). <http://doi.org/10.3390/antiox12010035>.

Sekaninová, J., Janků, M., Luhová, L., Petřivalský, M., Bezdíček, J., Ducháček, J., Stádník, L. (2024). Effects of oxidative stress on reproduction of dairy cattle. *Poster presented at: The 75th EAAP Annual Meeting, September 1-5, 2024, Florence, Italy. Book of abstracts EAAP – 75th Annual Meeting*, p. 513, session 41, poster 10.