

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Stanovení malondialdehydu jako sekundárního
produktu lipidové peroxidace v lidských
nádorových buňkách**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Martina Zehnálková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Ursula Ferretti
Rok:	2018

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala mé vedoucí Mgr. Ursule Ferretti za odborné vedení, vstřícnost, trpělivost a čas, který mi věnovala v průběhu řešení mé bakalářské práce. Děkuji Mgr. Marku Rácovi, Ph.D. za pomoc s realizací experimentální práce a cenné rady. Za cenné připomínky děkuji také doc. RNDr. Pavlu Pospíšilovi, PhD. Nakonec bych chtěla poděkovat svým blízkým za podporu během mého studia.

Tato práce byla provedena pod záštitou grantu IGA_PrF_2018_022.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Martina Zehnálková
Název práce	Stanovení malondialdehydu jako sekundárního produktu lipidové peroxidace v lidských nádorových buňkách
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Ursula Ferretti
Rok obhajoby práce	2018
Abstrakt	<p>Reaktivní formy kyslíku jsou intenzivně studovanými látkami, jelikož mohou vyvolávat oxidační stres a poškození biomolekul, např. lipidovou peroxidaci. V této studii byl sledován vliv tří reaktivních forem kyslíku, konkrétně singletního kyslíku, peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu na lidské rakovinné buňky. Byl vyhodnocen jejich vliv na vitalitu buněk a pomocí fluorescenční próby byla konfokálním mikroskopem potvrzena probíhající lipidová peroxidace. Metodou HPLC byla stanovena koncentrace vznikajícího malondialdehydu, sekundárního produktu lipidové peroxidace. Výsledky ukazují významný vliv reaktivních forem kyslíku na vitalitu buněk, kdy s delším inkubačním časem se vitalita buněk snižovala. Dále byl demonstrován vznik hydroperoxidů u rakovinných buněk ošetřených reagenty tvořícími singletní kyslík a hydroxylový radikál. Z výsledků stanovení malondialdehydu vyplývá, že vybrané reaktivní formy kyslíku nevykazují rostoucí tvorbu malondialdehydu s delším inkubačním časem. Nelze však vyloučit tvorbu konkurenčních sekundárních produktů lipidové peroxidace odlišnými dráhami.</p>
Klíčová slova	Lipidová peroxidace, malondialdehyd, HPLC
Počet stran	47
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and Surname	Martina Zehnálková
Title	Determination of malondialdehyde as the secondary product of lipid peroxidation in human cancer cells
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Ursula Ferretti
The year of presentation	2018
Abstract	<p>Reactive oxygen species are intensively studied substances, because they can cause oxidative stress and damage to biomolecules, such as lipid peroxidation. In this study, the effect of three reactive oxygen species, namely singlet oxygen, hydrogen peroxide and hydroxyl radical, on human cancer cells was observed. Its effect on cell viability was evaluated and lipid peroxidation via fluorescence probe and confocal microscopy was confirmed. The concentration of malondialdehyde, the secondary lipid peroxidation product, was determined by HPLC. The results showed a significant effect of reactive oxygen species on cell viability, when with longer incubation time the cell viability decreased. Furthermore, the formation of hydroperoxides in singlet oxygen and hydroxyl radical treated cancer cells was demonstrated. The results of malondialdehyde determination indicate that selected reactive oxygen species do not show increased malondialdehyde production with longer incubation time. However, the formation of competing secondary products by different paths of lipid peroxidation can not be excluded.</p>
Keywords	Lipid peroxidation, malondialdehyde, HPLC
Number of pages	47
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
2.1	Kyslík a jeho formy	9
2.1.1	Neradikálové reaktivní formy kyslíku	9
2.1.1.1	Singletní kyslík	10
2.1.1.2	Peroxid vodíku	10
2.1.2	Radikálové reaktivní formy kyslíku	11
2.1.2.1	Hydroxylový radikál	12
2.1.3	Interakce reaktivních forem kyslíku s biomolekulami	12
2.1.4	Vliv reaktivních forem kyslíku na zdraví	14
2.2	Antioxidační systémy	15
2.2.1	Katalasa	16
2.2.2	L-Askorbát	17
2.2.3	Trolox	17
2.2.4	Propylgalát	17
2.3	Lipidová peroxidace	18
2.3.1	Neenzymatická lipidová peroxidace	19
2.3.2	Enzymatická lipidová peroxidace	20
2.3.3	Produkty lipidové peroxidace	21
2.3.3.1	Primární produkty lipidové peroxidace	22
2.3.3.2	Sekundární produkty lipidové peroxidace	22
2.4	Malondialdehyd	23
2.4.1	Vznik malondialdehydu	23
2.4.2	Metabolismus malondialdehydu	24
2.4.3	Metody detekce a kvantifikace malondialdehydu	25
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1	Materiál	27
3.1.1	Chemikálie	27
3.1.2	Přístrojové vybavení	27
3.2	Biologický materiál a kultivační podmínky	28
3.3	Metody	28
3.3.1	Určení počtu a vitality buněk	28
3.3.2	Příprava biologických vzorků	29
3.3.3	Stanovení malondialdehydu v rakovinných buňkách	29
3.3.3.1	Příprava vzorků pro měření pomocí HPLC	29
3.3.3.2	Stanovení kalibrační křivky koncentrace malondialdehydu	30
3.3.4	Detekce hydroperoxidů konfokální mikroskopií	31
3.3.5	Statistická analýza	31
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	32
4.1	Vliv reaktivních forem kyslíku na vitalitu buněk	32
4.2	Detekce hydroperoxidů konfokální mikroskopií	33
4.3	Kalibrační křivka pro malondialdehyd	34
4.4	Stanovení malondialdehydu v rakovinných buňkách	36
5	ZÁVĚR	40
6	LITERATURA	41
7	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	46

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

Vypracovat literární rešerši na téma peroxidace lipidů a produkce malondialdehydu, reaktivních forem kyslíku a antioxidačních systémů.

Praktická část

Zvládnout metodiku práce s vysokotlakou kapalinovou chromatografií (HPLC).
Stanovit produkci malondialdehydu v lidských nádorových buňkách pomocí HPLC.
Vyhodnotit naměřené výsledky a diskutovat v porovnání s literaturou.

1 ÚVOD

Reaktivní formy kyslíku jsou jak radikálové, tak i neradikálové molekuly, jež vznikají i přirozeně v buňce vlivem metabolických přeměn. Buňky disponují různými antioxidantními systémy, které je chrání vůči negativním vlivům reaktivních forem kyslíku (i dusíku). Pokud však účinek reaktivních forem převáží účinek antioxidantů, dochází k oxidačnímu stresu a poškození biomolekul. Příkladem takového procesu je peroxidace lipidů, při které může docházet k poškození buněčných membrán.

Lipidová peroxidace může být vyvolána neenzymaticky (reaktivními formami kyslíku) i enzymaticky (lipoxygenasy, cyklooxygenasy, cytochrom P450). Během tohoto děje vznikají produkty, které mohou dále reagovat a poškozovat buňku. V biologických systémech jsou poškozovány biomolekuly, čímž mohou být zasaženy i signální dráhy buňky. Pokud lipidové peroxidaci buňka nedokáže zabránit obrannými mechanismy, může docházet až k apoptóze končící buněčnou smrtí.

Lipidovou peroxidací dochází primárně k tvorbě lipidových hydroperoxidů, které se dále účastní tvorby nových reaktivních produktů. Mezi sekundární produkty patří aldehydy, z nichž nejsledovanější jsou malondialdehyd a 4-hydroxynonenal. Tyto aldehydy jsou relativně stabilní látky, biologicky vysoce aktivní a mají mutagenní a toxické účinky. Malondialdehyd je používán jako marker oxidačního poškození buněk a vyskytuje se ve dvou formách – volné a vázané. Váže se na thio- a aminoskupiny proteinů a nukleových kyselin. Množství volného malondialdehydu je obvykle velmi nízké a obtížně detekovatelné, proto se nejčastěji detekuje celkový malondialdehyd.

Teoretická část této práce se zabývá popisem vybraných reaktivních forem kyslíku (jejich vznikem, reaktivitou a produkty jejich reakcí), antioxidantních systémů a lipidové peroxidace se zaměřením na malondialdehyd. Praktická část této práce popisuje působení reaktivních forem kyslíku na vitalitu buněk, jejich vliv na peroxidaci lipidů a kvantifikaci malondialdehydu, jakožto sekundárního produktu lipidové peroxidace.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Kyslík a jeho formy

Kyslík je jeden z nejdůležitějších prvků pro život. Na Zemi se kyslík vyskytuje jak ve formě molekulárního plynu, tak i v široké řadě sloučenin. U aerobních organismů je konečným akceptorem elektronů katalytického metabolismu a umožňuje kontinuální zisk energie. Přírozená snaha kyslíku dosáhnout elektronového oktetu (redukce) může být doprovázena vznikem jeho reaktivních forem (ROS), které můžeme rozdělit na neradikálové a radikálové (Lane, 2002).

Molekulární kyslík (O_2) nás obklopuje jako dvouatomová molekula, jejíž atomy jsou vázány kovalentní dvojnou vazbou. Přes 99% O_2 v atmosféře je tvořeno isotopem ^{16}O a stopovým množstvím ^{17}O a ^{18}O . Molekulární kyslík má čtyři volné elektronové páry.

Při tvorbě O_2 redistribucí elektronů do nově vzniknuvších molekulových orbitalů vznikají dva nepárové elektrony, každý v jednom ze dvou π^* protivazebných orbitalů. Proto ho můžeme definovat jako volný radikál a zároveň tak vysvětlit jeho reaktivitu. Aby mohl O_2 oxidovat určitý atom nebo molekulu prostřednictvím přijetí páru elektronů, musí mít elektrony substrátů oxidace stejně orientovaný spin, což jim umožňuje zabudovat do vakantních π^* protivazebných orbitalů. Avšak žádný pár elektronů v atomových či molekulových orbitalech tuto podmínku nespĺňuje, jelikož mají opačný spin podle Pauliho principu. Toto tzv. spinové omezení předurčuje O_2 k příjmu elektronů jednoho po druhém a vysvětluje nižší ochotu reakce s neradikály oproti radikálům (Gilbert, 1981; Babcock, 1999).

2.1.1 Neradikálové reaktivní formy kyslíku

Jak už název napovídá, v těchto formách se nevyskytují žádné nepárové elektrony a jejich reaktivita je způsobena pouze chemickým charakterem nebo chováním O_2 (elektronegativita, elektronová hustota kolem kyslíku v daných sloučeninách kyslíku). Mezi neradikálové ROS patří například singletní kyslík (1O_2), peroxid vodíku (H_2O_2), ozon (O_3) a kyselina chlorná ($HClO$).

2.1.1.1 Singletní kyslík

Singletní kyslík může vznikat při dodání energie O_2 a jsou známy dvě formy: $^1\Delta gO_2$ a $^1\Delta g^+O_2$. U obou těchto forem je odstraněno spinové omezení, čímž je oxidační síla 1O_2 mnohem vyšší a reaguje ochotně i s neradikály. Nejčastějším způsobem tohoto procesu je tzv. fotosensitizační reakce. Její mechanismus tkví v předání energie od světlem excitované molekuly na blízkou molekulu O_2 . Nejběžnějšími fotosensitivními chemickými látkami jsou např. barviva (akridinová oranž, methylenová modř, toluidinová modř), aromatické uhlovodíky (chinony, naftaleny, bifenyly). Z fotosensitivních biomolekul pak můžeme jmenovat např. flavinové deriváty (riboflavin, FAD), bilirubin a porfyriny (hem, chlorofyly) (Martin a Logsdon, 1987).

Dalším zdrojem 1O_2 je organický peroxylový radikál (ROO^\bullet), z něhož vzniká 1O_2 tzv. Russelovým mechanismem (reakce 1). Dvě molekuly ROO^\bullet spolu reagují tvoříce lineární tetraoxidový intermediát ($ROOOOR$), který se rozpadá na alkohol, tripletní karbonyl ($^3R=O$) a 1O_2 (Daniels, 1984).



Alternativou tvorby 1O_2 je rozklad H_2O_2 popř. reakce H_2O_2 s chlornanem nebo bromnanem, reakcí O_3 s biomolekulami. Příkladem reakce, při které vzniká 1O_2 jako jediný ROS, je rozklad aromatických endoperoxidů (naftalen endoperoxid) (Davies, 2003). V rakovinných buňkách vzniká 1O_2 působením hydroxylového radikálu ($^\bullet OH$) paralelně s oxidativním poškozením biomolekul (Rác *et al.*, 2015).

Singletní kyslík může interagovat s dalšími molekulami dvěma základními mechanismy: chemicky (většinou adicí na dvojnou vazbu) anebo přenosem excitační energie, čímž se vrací do základního stavu (zhasení 1O_2). Singletní kyslík reaguje zejména s molekulami obsahující dvojnou vazbu $C=C$ (Davies, 2003).

2.1.1.2 Peroxid vodíku

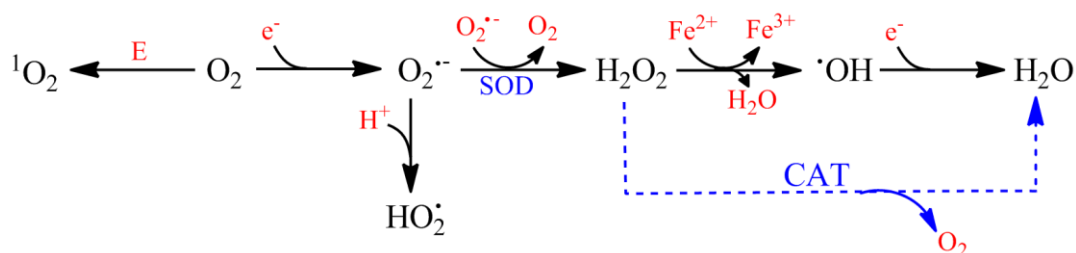
Peroxid vodíku je viskózní kapalina, která se za normálních podmínek rozkládá na vodu a O_2 . Mísí se dobře s vodou díky intenzivní tvorbě vodíkových můstků. Peroxid vodíku je kontinuálně produkován v naprosté většině tkání *in vivo* v koncentracích 10^{-8} až 10^{-7} $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. K produkci H_2O_2 dochází v organismech prostřednictvím enzymů oxidas (xanthin-, glukosa-) nebo superoxididismutasy (SOD). Nejzásadnějším příspěvkem k tvorbě H_2O_2 v živočišných buňkách jsou mitochondrie prostřednictvím aktivity

monoaminoxidasy, β -oxidace mastných kyselin a z elektronového transportního řetězce (Jansen, 2002).

Vzhledem k širokému rozšíření H_2O_2 je pozitivní, že se jedná o slabé oxidační nebo redukční činidlo a obecně je málo reaktivní. Například pokud jsou DNA, lipidy nebo proteiny *in vitro* inkubovány s H_2O_2 až při $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentracích, tak není sledována žádná oxidační aktivita. Naopak při působení na buňky dochází k rozsáhlé oxidaci biomolekul, která však není zprostředkována samotným H_2O_2 . Peroxid vodíku přechází přes buněčné membrány, mimo jiné pomocí aquaporinů, a uvnitř buněk reaguje s ionty železa nebo mědi tvořící reaktivnější $\cdot\text{OH}$, zodpovědný za většinu buněčného poškození (Seaver a Imlay, 2001). Zároveň může H_2O_2 přímo inaktivovat některé enzymy (např. glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasa, protein-fosfatasy a kaspasy) prostřednictvím oxidace cysteinových skupin nutných pro katalytickou aktivitu (Brodie a Reed, 1987). I přes nízkou reaktivitu je H_2O_2 cytotoxický a ve vyšších koncentracích se používá jako antiseptikum a desinfekce.

2.1.2 Radikálové reaktivní formy kyslíku

Volný radikál je definován jako částice schopná samostatné existence obsahující jeden nebo více nepárových elektronů. Nepárový elektron obsazuje atomový nebo molekulový orbital, v němž kromě něj není přítomen žádný jiný elektron. Přítomnost nepárového elektronu většinou způsobuje paramagnetismus a reaktivitu, která se však mezi radikály různí. Radikály jsou tvořeny buď ztrátou jednoho elektronu, nebo homolytickým štěpením kovalentní vazby (Obr. 1). Energie potřebná pro disociaci kovalentní vazby může být zprostředkována ionizujícím zářením, UV zářením či teplem (von Sonntag, 1987). Z radikálových ROS můžeme jmenovat např. superoxidový aniontový radikál ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hydroperoxylový radikál ($\text{HO}_2\cdot$), $\cdot\text{OH}$, organický alkoxylový radikál ($\text{RO}\cdot$), organický peroxylový radikál ($\text{ROO}\cdot$) a uhličitánový radikál ($\text{CO}_3^{\bullet-}$).

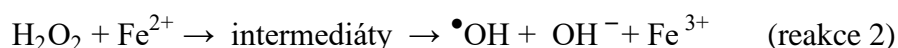


Obr. 1 Schéma vzniku nejběžnějších ROS z O_2 .

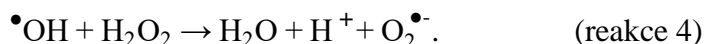
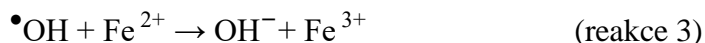
2.1.2.1 Hydroxylový radikál

Hydroxylový radikál je nejreaktivnější známý kyslíkový radikál s vysokou pozitivní hodnotou redukčního potenciálu. Reakce $\bullet\text{OH}$ mohou být trojího typu: adice, odtržení vodíkového radikálu ze substrátu a elektronový přenos. Aktivně reaguje s aromatickými sloučeninami, a systémy s dvojnou vazbou, např. i s thyminem. Reakcí s hydrogenuhlíčanem nebo uhličitánem tvoří $\text{CO}_3^{\bullet-}$.

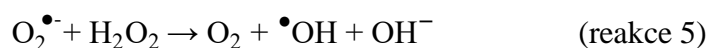
Hydroxylový radikál může být produkován reakcí kovových iontů s H_2O_2 (mechanismus Fentonovy reakce) nebo UV zářením vyvolaným homolytickým štěpením O-O vazby v H_2O_2 . Tato reakce může probíhat v kůži vystavené slunečnímu záření. Dalšími minoritními procesy vzniku $\bullet\text{OH}$ jsou působení ionizujícího záření na vodu, reakce HClO s $\text{O}_2^{\bullet-}$, nebo sonikací vody. Fentonova reakce (reakce 2) je nejvýznamnějším příkladem tvorby volných radikálů katalyzované dvojmocnými kationty přechodných kovů (Fe, Cu, Zn). Již v roce 1876 byla prokázána oxidace mnoha různých organických molekul směsí H_2O_2 a Fe^{2+} soli.



Do dnešní doby je mechanismus této oxidace zkoumán, a i přes majoritní podíl oxidace zprostředkované hydroxylovým radikálem mohou vznikat odlišné ROS (reakce 3 a 4).



Vznikající $\text{O}_2^{\bullet-}$ může dále reagovat Haber-Weissovým mechanismem (reakce 5).



Avšak za standardních podmínek je rychlostní konstanta této reakce téměř nulová, což odporuje faktu, že byl $\bullet\text{OH}$ detekován ve velkém množství v systémech produkujících $\text{O}_2^{\bullet-}$. Právě tato reakce je katalyzována přechodnými kovy (Fe, Cu, Ni), které často kontaminují většinu chemikálií, díky čemuž byl objasněn kompletní mechanismus Haber-Weissovy reakce (Weiss, 1935).

2.1.3 Interakce reaktivních forem kyslíku s biomolekulami

Vzhledem k vysoké reaktivitě ROS a jejich snadnému pronikání přes membrány dochází k interakci s biomolekulami, především v místech aromatických systémů a násobných vazeb. Nejdestruktivnějšími důsledky se vyznačují interakce ROS s DNA, aminokyselinami, proteiny a lipidy.

Ze všech známých ROS je z pohledu interakce s DNA nejdůležitějším $\bullet\text{OH}$, jelikož reaguje se všemi komponentami molekuly DNA, způsobuje poškození purinových i pyrimidinových bází a také deoxyribosové kostry (Disdaroglu *et al.*, 2002). Oxidační poškození, které vede k permanentní modifikaci genetického materiálu, reprezentuje první krok ke stárnutí a mutagenезi. Poškození DNA způsobené ROS zahrnuje jedno- nebo dvouvláknové zlomy DNA, modifikace bází a síťování DNA. Konečným důsledkem poškození DNA je spuštění nebo zastavení transkripce, narušení signálních drah, tvorba replikačních chyb, nestability genomu a kancerogeneze. Například $\bullet\text{OH}$ je schopen adice na dvojnou vazbu bází anebo ataku vodíkových atomů methylových skupin. Adici na dvojnou vazbu a tvorbu hydroxylových aduktů dobře reprezentuje 8-hydroxyguanin, který se velmi snadno tvoří a je vhodným biomarkerem oxidativního stresu organismů (Valko *et al.*, 2005).

Obecně jsou postranní řetězce aminokyselinových residuí citlivé na oxidaci způsobenou ionizujícím zářením nebo ROS. Jelikož residua Pro, His, Arg, Lys a Cys jsou citlivé vůči oxidaci katalyzované přechodnými kovy, může být tento proces místně specifický. Poněvadž 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES) vykazuje vysokou schopnost zhášení $\bullet\text{OH}$, je schopna ochránit proteiny vůči tomuto typu oxidace a proto se používá jako součást proteinových pufrů. Oxidace proteinů je úzce spojena se stárnutím a s ním spojenými nemocemi, což podporuje fakt, že při stárnutí dochází k akumulaci oxidovaných forem proteinů. Toto pozorování může být způsobeno sníženou antioxidační kapacitou a sníženou schopností degradovat oxidované proteiny vzhledem k nižší katalytické aktivitě proteas. Reaktivní formy kyslíku mohou primárně inhibovat proteinfosfatasy, narušující klíčové signální dráhy regulující růst, proliferaci, diferenciaci a apoptózu (Stadtman, 2001 a 2004). Z tohoto pohledu je působení ROS na proteiny klíčové pro pochopení rozvoje onkologických onemocnění.

Reakcí $\bullet\text{OH}$ nebo $\text{O}_2^{\bullet-}$ s proteiny dochází ke tvorbě radikálů na centrálních uhlících, které za aerobních podmínek reagují s kyslíkem za tvorby ROO^\bullet (Stadtman, 1992). Organické peroxylové radikály jsou převedeny na alkylové peroxidy reakcí s protonovaným HO_2^\bullet . Při absenci ionizujícího záření jsou však proteiny rezistentní vůči poškození H_2O_2 a dalšími jednoduchými oxidanty, pokud však zároveň nejsou přítomné přechodné kovy. Naopak kovy katalyzované poškození proteinů zahrnuje oxidační štěpení, ztrátu histidinových residuí, tyrosinové síťování, tvorbu organických alkylových radikálů (R^\bullet), RO^\bullet a ROO^\bullet . U zmíněných radikálů může docházet

ke štěpení peptidové vazby za tvorby různých produktů (Levine a Stadtman, 2001). Poškozené proteiny ale mohou být poměrně snadno odbourány a jejich poškození většinou nebývá pro buňku smrtelné, avšak u dvou mitochondriálních proteinů (adeninnukleotidtranslokasa a akonitasa) jsou kritickými cíly z pohledu dlouhodobého oxidačního poškození.

Je dobře známo, že ROS napadají i mnohé další buněčné komponenty zahrnující mastné kyseliny, především velmi citlivé polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) (podrobněji v kapitole 2.3 Lipidová peroxidace).

2.1.4 Vliv reaktivních forem kyslíku na zdraví

Již v roce 1785 Joseph Priestley demonstroval toxicitu O_2 , nedlouho po jeho objevu (Halliwell a Gutteridge, 2007). V současné době již známe mechanismy negativního působení O_2 a především ROS. Zatímco nízká koncentrace ROS je pro buňky fyziologická, vysoké koncentrace ROS poškozují biomolekuly, vyvolávají autofáгии, apoptózu a nekrózu buněk až tkání (Brieger *et al.*, 2012). Jedna lidská buňka je za jeden den vystavena $1,5 \cdot 10^5$ kontaktů s ROS, jejichž negativnímu působení se brání rozmanitými antioxidačními systémy (viz kapitola 2.2 Antioxidační systémy) (Beckman a Ames, 1997). V průběhu života organismů dochází postupně ke slábnutí ochrany, což se projevuje vyšším oxidačním poškozením, které pak ve výsledku vede ke stárnutí (Afanas'ev, 2010).

Vysoké koncentrace ROS jsou spojeny s některými chronickými chorobami, z nichž nejzávažnější je ateroskleróza, mutageneze, karcinogeneze a neurodegenerativní poruchy (Castro a Freeman, 2001). Co se týče aterosklerózy, jsou ROS schopny oxidovat lipoproteinové částice o nízké hustotě (LDL), přičemž glykované LDL jsou k poškození mnohem náchylnější. Modifikované LDL pak mohou reagovat s oxidem dusnatým. Postupně dochází k ukládání tzv. LDL plaků ve stěně cév, infiltraci leukocytů, čímž se postupně snižuje průsvit cév. Dochází k nedostatečné cirkulaci krve, popřípadě její stagnaci, což může vést ke tvorbě trombů, jenž mohou způsobit infarkt myokardu, cévní mozkovou příhodu nebo plicní embolii (Mügge, 1998).

Interakcí ROS s DNA dochází k tvorbě aduktů a oxidačnímu poškození. Nejkritičtější je vznik zlomů a síťování DNA (viz kapitola 2.1.3 Interakce reaktivních forem kyslíku s biomolekulami). Poškození DNA vede k narušení signálních drah a v konečném důsledku ke kancerogenezi.

Vzhledem k vysokému obsahu PUFA v mozkové tkáni, potřeby jejího vysokého okysličení a jen slabé antioxidační obraně, ROS nejvíce ohrožuje nervovou soustavu a mozek. Oxidační poškození neuronů pak vede k rozvoji neurodegenerativních onemocnění, jako jsou např. Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba či amyotrofická laterální skleróza. Prevence i léčba těchto nemocí je založena na podávání antioxidantů pro zmírnění oxidačního poškození, avšak úspěšnost je rozporuplná a závisí na stádiu choroby i formě podání antioxidantu (Kim *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017).

I přes negativní účinky O_2 a ROS jsou tyto molekuly v nízkých koncentracích zásadní pro fungování většiny organismů. Molekulární kyslík je nezbytně důležitý pro všechny aerobní organismy, u nichž je koncovým akceptorem elektronů v dýchacím řetězci a umožňuje heterotrofní zisk energie. Z medicínského pohledu se používá inhalace O_2 jakožto léčiva při hypoxických stavech nebo poškození dýchacího ústrojí. Reaktivní formy kyslíku vznikají fyziologicky v organismech, jsou velmi přínosné při zneškodňování patogenů makrofágy či T-lymfocyty, popřípadě fungují jako důležité signální molekuly (Belikov *et al.*, 2015).

2.2 Antioxidační systémy

Vzhledem k toxicitě O_2 a jeho různých forem je přežití aerobních organismů umožněno pouze díky antioxidačním systémům, které se u nich v průběhu evoluce vyvinuly. Antioxidanty mohou být tvořeny *in vivo* nebo mohou být získávány z potravy. Slouží jako ochrana vůči oxidačnímu stresu a volným radikálům. Mechanismy obrany vůči reaktivním sloučeninám, jako ROS a reaktivní formy dusíku (RNS), jsou u aerobních organismů na různé úrovni. Bakterie využívají jednoduchého pohybu, aby se vyhnuly místům s vysokou koncentrací O_2 (Armitage, 1999). Jiné organismy si vytvořily elektronové transportní řetězce a cytochrom oxidasy, díky čemuž snížily vnitrobuněčné koncentrace O_2 a to se stalo hnací silou vývoje mnohobuněčnosti (Chance *et al.*, 1979).

Působení antioxidantů může probíhat několika mechanismy:

- Snížení tvorby ROS (např. mitochondriální rozpojovače; proteiny ochraňující kovové ionty nebo hem před oxidací jako jsou albumin, transferiny, haptoglobiny, ceruloplasmin)
- Katalytické odstranění ROS (např. enzymy SOD, superoxid reduktasa, katalasa (CAT) a mnohé peroxidasy)
- Fyzikální zhášení ROS (karotenoidy)

- Ochrana biomolekul před oxidativním poškozením (např. vazba chaperonů)
- „Sebevražedná“ činidla, která jsou přednostně oxidována ROS, aby ochránila důležitější biomolekuly (např. kyselina askorbová, α -tokoferol, Trolox, propylgalát) (Halliwell a Gutteridge, 2007).

Antioxidační systémy mohou být rozděleny na vnitrobuněčné, membránové a mimobuněčné. Mezi vnitrobuněčné antioxidanty patří především enzymy, které jsou specifické a nevytvářejí reaktivní intermediáty. Jsou to např. SOD, CAT, glutathion peroxidasa, cytochrom oxidasa. V průběhu běžného metabolismu tyto enzymy eliminují reaktivní sloučeniny a udržují nízkou hotovost přechodných kovů pro zajištění syntézy DNA a signální dráhy (Jacobs, 1970). Membránové antioxidanty jsou přizpůsobeny lipidovému hydrofobnímu prostředí a vykazují vysokou specifitu. Řadí se sem např. koenzym Q, β -karoten či vitamin E (α -tokoferol) a jeho deriváty. Mezi extracelulární antioxidanty patří ve velmi malé míře zastoupené SOD, a v mnohem vyšší míře se zde uplatňují ochranné proteiny (albumin, haptoglobin, ceruloplasmin, transferiny) a malé antioxidační molekuly (kyselina askorbová, glutathion, bilirubin) (Gutteridge, 1995).

2.2.1 Katalasa

Katalasa (CAT) (EC 1.11.1.6) je enzym přítomný v rostlinných i živočišných buňkách, i v aerobních bakteriích. Katalasa katalyzuje přeměnu H_2O_2 na vodu a O_2 a je to jeden z nejvýkonnějších enzymů (jedna molekula CAT je schopna přeměnit asi $6 \cdot 10^6$ molekul H_2O_2 za minutu) (Matés *et al.*, 1999). V případě eukaryotních buněk je lokalizována v buněčných membránových organelách zvaných peroxisomy. V peroxisomech jsou lokalizovány mimo CAT i enzymy H_2O_2 produkující, např. enzymy β -oxidace mastných kyselin nebo glykolát oxidasa. Z evolučního hlediska je kolokalizace výhodná, neboť může být toxický H_2O_2 ihned po vzniku odbourán. V peroxisomech dochází však k rozkladu H_2O_2 vznikuvšího i v jiných organelách (mitochondrie, endoplasmatické retikulum) (Antunes *et al.*, 2002). U živočichů se nachází ve všech orgánech, ale především je koncentrována v játrech a erytrocytech, aby chránila buňky celého těla před extracelulárním H_2O_2 (Winterbourn a Stern, 1987). Živočišná CAT je složena ze čtyř podjednotek, z nichž každá obsahuje hemově vázaný Fe^{3+} v aktivním místě. Hemová skupina je uzavřena pod povrchem molekuly a je dostupná pouze prostřednictvím kanálu, který je ohraničen hydrofobními residui. Toto uspořádání zajišťuje substrátovou specifitu enzymu. Každá z podjednotek na sebe váže 1 NADPH jako donor elektronů (Bravo *et al.*, 1999).

2.2.2 L-Askorbát

L-Askorbát (vitamin C) je velmi důležitý a silný antioxidant fungující ve vodných prostředích. Je přítomen např. na sliznici plic a oční rohovce. Kooperuje s vitamínem E a karotenoidy, a tím chrání membrány a lipoproteiny proti působení ROS. Má dvě ionizovatelné hydroxylové skupiny, takže jde o dvojsytnou kyselinu. Při fyziologickém pH je ale 99,9% molekul L-askorbátu ve formě jednosytné sodné či draselné soli (Cuzzocrea *et al.*, 2004).

Zatímco příjem vysokých dávek vitamínu C (až 2 g/den) nezpůsobovaly žádné vedlejší účinky, bylo zjištěno, že nízké koncentrace vitamínu C v krevním séru mohou u rizikových populací přispět k vyššímu riziku chronické gastritidy nebo žaludeční metaplazie, které předcházejí rakovinnému bujení v žaludku či střevech. Pozitivní vliv vitamínu C snižující výskyt rakoviny žaludku je pravděpodobně způsoben snížením tvorby reaktivních N-nitroso sloučenin. Další studie ukazují, že L-askorbát reguluje faktory ovlivňující genovou expresi, apoptózu a další buněčné pochody včetně modulace imunitní odpovědi (You *et al.*, 2000).

2.2.3 Trolox

Trolox je ve vodě rozpustný strukturní analog vitamínu E (α -tokoferolu), se kterým sdílí antioxidační schopnosti, ale na rozdíl od něj se neváže na membrány a proto je místem jeho působení cytosol. Jedná se o uměle syntetizovanou 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-2-benzopyran-2-karboxylovou kyselinu. Používá se jako standard tzv. Trolox ekvivalentní antioxidační kapacity (TEAC), která je určována u potravin, nápojů a potravinových doplňků (Huang *et al.*, 2005).

2.2.4 Propylgalát

Propylgalát je syntetický antioxidant často používaný jako potravinářsky certifikované aditivum (E310) a dále se používá v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Jde o nenabitou molekulu, která je schopná penetrovat buněčné membrány a interagovat tak s intracelulárními ROS. V buněčné linii IMR-90 působí proti negativnímu vlivu H_2O_2 vyvolávajícímu peroxidaci lipidů a oxidační poškození DNA (Ching-Hsein Chen *et al.*, 2007). Propylgalát je obtížně vylučován, což vede k jeho akumulaci v těle (Nakagawa *et al.*, 1995).

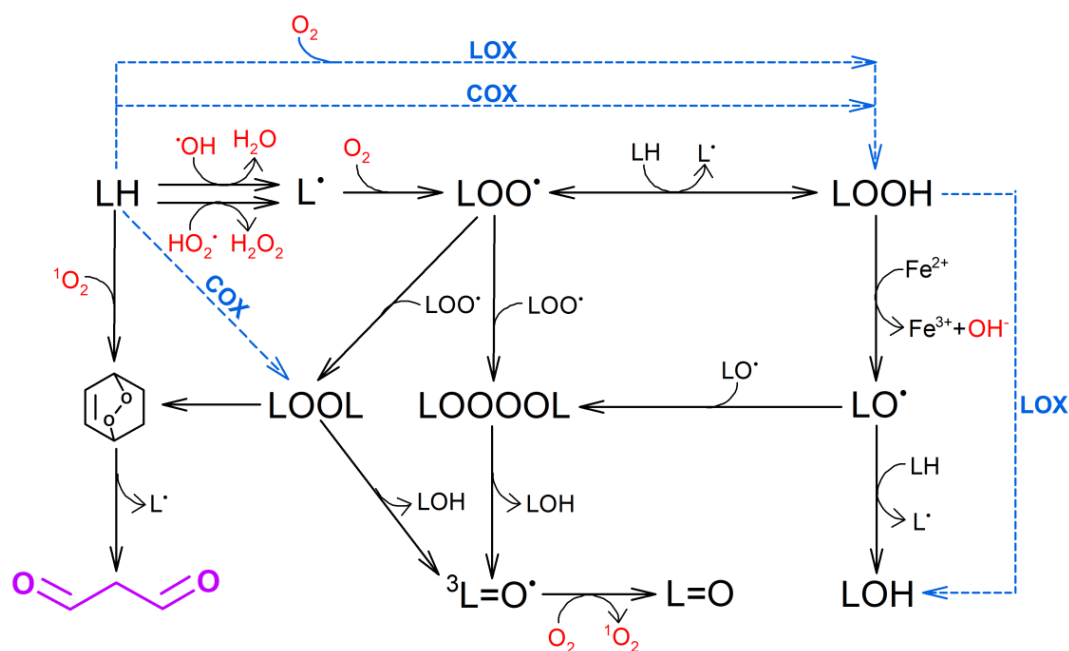
V rozporu s výše zmíněným využitím propylgalátu mohou být jeho prooxidační účinky, které byly testovány působením na potkaní samce. U těch indukoval tvorbu tumorů ostrůvkových buněk pankreatu a feochromocytomů nadledvin. U myších samců došlo k vývoji maligních lymfomů (Prejean *et al.*, 1982). V buněčné linii CHO-K1 (ovariální buňky křečka) indukoval výměnu sesterských chromatid a chromosomové aberace (Tayama a Nakagawa, 2001).

Výše zmíněné projevy karcinogenity mohou být způsobeny poškozením DNA katalyzovaným přechodnými kovy, které podporuje přítomnost kyseliny gallové, jež vzniká hydrolyzou propylgalátu (Kobayashi *et al.*, 2004). Toto prooxidační působení bylo sledováno i u lidských buněk (HeLa, leukemické buňky), v nichž indukovalo apoptózu právě prostřednictvím ROS (Chen *et al.*, 2011; You a Park, 2011).

2.3 Lipidová peroxidace

Lipidy jsou širokou skupinou makromolekul, vykazující rozmanité biologické funkce od zásobních nepolárních triacylglycerolů, přes PUFA, až po fosfolipidy tvořící membrány zajišťující kompartmentaci eukaryotických buněk. Vzhledem k zásadní funkci fosfolipidů v membránách, ovlivňuje jejich stav výrazně fyziologii celé buňky i organel. Mnohé lipidy jsou zároveň klíčovými signálními molekulami (např. fosfatidylinositolfosfáty, diacylglycerol, eikosanoidy).

Polynenasycené mastné kyseliny obsahují dvě a více dvojných vazeb mezi uhlíky. Vzhledem ke snížené otáčivosti okolo dvojných vazeb vykazují tyto konformace *cis* nebo *trans*, přičemž většina přírodních mastných kyselin má konformaci *cis*. Mezi PUFA patří například kyselina linolová, kyselina linoleová či kyselina arachidonová (Gardner, 1989). Mononenasycené či nasycené lipidy mohou být také oxidovány, avšak na rozdíl od PUFA mnohem hůře. Lipidy zasažené peroxidací mohou být lokalizovány na různých místech v organismu nebo v buňce. Při peroxidaci membránových lipidů dochází velmi často i k poškození membránových proteinů, což má negativní vliv na buňku.



Obr. 2 Schéma lipidové peroxidace, černě vyznačená neenzymatická, modře enzymatická cesta, fialově zvýrazněn MDA.

Z široké škály ROS jsou lipidy nejvíce atakovány dvěma radikály a to $\bullet\text{OH}$ a $\text{HO}_2\bullet$ (Obr. 2). Oba zmíněné radikály hrají v případě peroxidace lipidů důležitou roli, jelikož mohou iniciovat řetězovou oxidaci PUFA vedoucí k poškození funkce membrán. Vzhledem k řetězovému charakteru těchto reakcí vzniká množství radikálů a dalších reaktivních sloučenin, jež mohou dále negativně interagovat s biomolekulami či působit cytotoxicky. Mimo ROS můžou lipidovou peroxidaci způsobovat také RNS, organické peroxidy nebo azosloučeniny. Lipidová peroxidace je obecně proces, při němž dochází k ataku oxidantů na lipidy obsahující dvojně vazby mezi uhlíky. Rozlišujeme peroxidaci lipidů neenzymatickou a enzymatickou (Massey a Nicolaou, 2013).

2.3.1 Neenzymatická lipidová peroxidace

Neenzymatická peroxidace lipidů sestává ze tří fází: iniciace, propagace a terminace. Při iniciaci dochází k odštěpení allylového vodíku působením prooxidantů (např. $\bullet\text{OH}$) za vzniku lipidového alkylového radikálu ($\text{L}\bullet$) na centrálním uhlíku. Následnou stabilizací $\text{L}\bullet$ interakcí nepárového elektronu s π -elektrony dvojně vazby dochází k přeskupení molekuly tvořící konjugovaný dienový radikál. Tento v propagační fázi velmi ochotně reaguje s O_2 a vzniká lipidový peroxylový radikál ($\text{LOO}\bullet$), který odštěpuje vodíkový atom z další molekuly lipidů (čímž dojde k tvorbě nového $\text{L}\bullet$ a pokračuje řetězová reakce) a stává se z něj lipidový hydroperoxid (LOOH).

Terminační fáze se účastní antioxidanty (např. α -tokoferol, Trolox), jenž jsou donory vodíkových atomů pro LOO^\bullet , z nich samých se stávají radikály, které reagují s další molekulou LOO^\bullet za tvorby neradikálových produktů. V případě, že je peroxidace lipidů iniciována, probíhá propagační fáze tak dlouho, dokud nejsou vytvořeny terminační produkty a všechny radikály zneškodněny (Yin, Xu, Porter, 2011; Ayala *et al.*, 2014).

V případě autooxidace je peroxidace lipidů iniciována působením LOO^\bullet a lipido-vými alkoxylovými radikály (LO^\bullet), jenž vznikají jednoelektronovými oxidačními nebo i redukčními reakcemi z LOOH . Těmto reakcím předchází vznik LOOH , který může probíhat chemickou (metabolickou) nebo fyzikální (ionizujícím zářením) cestou. V biologických systémech takto dochází především k poškození membránových fosfolipidů, které je spojeno s toxicitou ROS a buněčným stárnutím. Autooxidace většiny organických substrátů v roztocích je spontánním procesem při parciálním tlaku O_2 větším než 13,3 kPa (průměrný parciální tlak O_2 v arteriální krvi je 9-14 kPa) (Repetto *et al.*, 2010).

Iniciace lipidové peroxidace tzv. fotooxidací zahrnuje fotosensitizační reakce, jimž podléhají tzv. fotosensibilizátory. To jsou látky (např. chlorofyly, flaviny, NADH), jenž po absorpci UV/Vis záření tvoří singletní excitované stavy. Excitované singletní stavy jsou následně mezisystémovým přechodem převedeny na tripletní excitované stavy. Existují dva typy fotosensitizační reakce. U prvního typu dochází tripletním fotosensibilizátorem k odtržení elektronu a protonu z blízkých molekul, za vzniku kationového radikálu molekuly a aniontového radikálu fotosensibilizátoru. Aniontový radikál následně redukuje O_2 , tvořící $\text{O}_2^{\bullet-}$, ten dismutuje na H_2O_2 , který může být redukován na $^\bullet\text{OH}$. U druhého typu této reakce dochází k přenosu energie z tripletního fotosensibilizátoru přímo na O_2 , za tvorby $^1\text{O}_2$ (DeRossa a Crutchley, 2002; da Silva *et al.*, 2012).

2.3.2 Enzymatická lipidová peroxidace

Enzymatickou lipidovou peroxidací nejvíce katalyzují lipoxygenasa (LOX) a cyklooxygenasa (COX), které oxygenují volné a esterifikované PUFA. V důsledku toho se tvoří LOO^\bullet . Oba enzymy se účastní tvorby eikosanoidů z PUFA, které mají ve svém řetězci 20 uhlíkových atomů (především z kyseliny arachidonové). Produkty enzymatické lipidové peroxidace jsou signálními molekulami zapojenými do regulace mnoha buněčných dějů, především zánětlivé a bolestivé odpovědi, alergické reakce atd.

Vzhledem k parakrinnímu charakteru signalizace působí pouze lokálně a často po krátkou dobu.

Lipoxygenasy, nehemové proteiny obsahující železo, existují ve třech isoformách enzymu (5-LOX, 12-LOX a 15-LOX). Jsou multifunkčními enzymy, které katalyzují širší škálu reakcí. Může se jednat o vložení O₂ do molekuly PUFA (dioxygenasová reakce) za tvorby LOOH, nebo přeměnu LOOH na lipidovou hydroxy mastnou kyselinu (LOH) (hydroperoxidasová reakce), či tvorbu leukotrienů (synthasová reakce). Důležitá je struktura aktivního centra těchto enzymů, ve které je ion železa koordinován pěti aminokyselinovými residui a molekulou vody do oktaedrického koordinačního komplexu (Smith a Murphy, 2002; Yamamoto *et al.*, 2004; Andreou a Feussner, 2009).

Cyklooxygenasy (prostaglandin-endoperoxid synthasy) (COX) jsou hemové proteiny vykazující bifunkční aktivitu. Jsou známy tři isoformy COX (COX-1, COX-2 a COX-3), které sdílí mechanismus katalyzovaných reakcí, ale jejich struktura, buněčná lokalizace a regulace se odlišují. Tyto enzymy mohou fungovat jako dioxygenasy nebo hydroperoxidasy. V případě oxygenasové aktivity katalyzují reakce stejným způsobem jako LOX (odštěpení vodíku a dioxygenace), ale primárními produkty COX jsou narušitelé od LOX endoperoxidy a LOOH (Schneider *et al.*, 2007). Působením enzymů z rodiny COX na kyselinu arachidonovou vznikají prostanoidy prostaglandiny a tromboxany (Smith, 1989; Marnett *et al.*, 1999; Viita *et al.*, 2012).

Do enzymatického poškození lipidů spadá i epoxygenasová cesta. Epoxygenasy jsou membránově vázané, hem obsahující enzymy rodiny cytochromu P450, katalyzující produkci epoxidů. Jejich hlavním substrátem je kyselina arachidonová a produktem mimo jiné kyselina epoxyeikosatrienová. Epoxygenasa katalyzuje připojení kyslíkového atomu na uhlík tvořící jednu ze dvou dvojných vazeb v molekule kyseliny arachidonové a redukcí dvojně vazby dochází k tvorbě epoxidu. Produktem je směs regioizomerů kyseliny epoxyeikosatrienové, které však mají podobné metabolické a funkční vlastnosti (Spector, 2009; Spector a Kim, 2015).

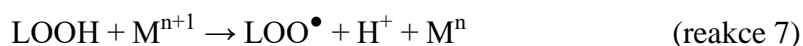
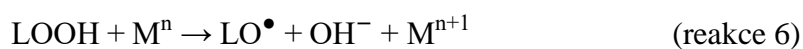
2.3.3 Produkty lipidové peroxidace

Peroxidace mastných kyselin vede k tvorbě širokého spektra oxidačních produktů. Hlavními primárními produkty jsou LOOH. Z těch se v průběhu peroxidačních reakcí tvoří různé aldehydy a hydroxy mastné kyseliny jakožto sekundární produkty (Girotti, 1998).

2.3.3.1 Primární produkty lipidové peroxidace

Lipidové hydroperoxy jsou stabilní produkty tvořené v propagační fázi procesu lipidové peroxidace. Tvorba LOOH umožňuje mnohé redukční reakce, které mohou vést jak k inhibici peroxidativního poškození, tak k jeho indukci (Niki, 2014).

Na rozdíl od inhibice oxidativního poškození se mohou LOOH *in vivo* rozkládat i prostřednictvím jednoelektronové redukce, přispívající k iniciačním a propagačním fázím lipidové peroxidace s důsledkem rozšíření oxidativního poškození. Lipidové hydroperoxy mohou být přeměněny na LO• a LOO• pomocí redoxního cyklu přechodných kovů (M) (reakce 6 a 7) (Yin *et al.*, 2011).



Lipidové hydroperoxy mohou také reagovat s peroxodusitanem nebo HClO za tvorby ¹O₂, který může dále poškozovat biomolekuly (Szabó *et al.*, 2007). Hydroperoxidová skupina může být navázána na strukturně rozličné lipidy, např. na PUFA, triacylglyceroly, fosfolipidy a steroly.

Prostřednictvím dvouelektronové redukce se *in vivo* mohou LOOH rozkládat, čímž může být peroxidativní poškození inhibováno. Enzymy katalyzující tyto dvouelektronové redukce jsou např. na selenu závislé glutathionperoxidasy či seleno-protein P. Glutathionperoxidasy katalyzují redukci LOOH za tvorby odpovídajících alkoholů za použití glutathionu jako reduktantu. Glutathionperoxidasy jsou lokalizovány v cytosolu, jádrech a mitochondriích savčích buněk. Selenoprotein P je hlavním selenoproteinem lidské plasmy, jenž redukuje LOOH využívající glutathion nebo thioredoxin jako koenzym. Zároveň chrání plasmatické proteiny a LDL proti peroxidaci (Steinbrenner a Sies, 2009). Bylo zjištěno, že stanovení koncentrace LOOH v krevním séru může být užitečné pro odhadnutí míry oxidativního stresu v tkáních (Niki, 2014).

2.3.3.2 Sekundární produkty lipidové peroxidace

Pokračující oxidace lipidů a fragmentace meziproductů vede k tvorbě hydroxy mastných kyselin a aldehydů o různé délce uhlíkového řetězce. Na rozdíl od lokálně působících radikálů mohou vzniklé aldehydy lehce difundovat přes membrány a kovalentně modifikovat i proteiny ve vzdálených oblastech buňky, například i v jádře (Esterbauer a Cheeseman, 1990).

Nejtoxictějším z aldehydů, které vznikají lipidovou peroxidací, je 4-hydroxynonenal (4-HNE), který může fungovat zároveň jako signální molekula i cytotoxická substance, jež poškozuje biomolekuly kovalentní modifikací. Podobně jako jiné produkty může 4-HNE vznikat jak neenzymaticky, tak enzymaticky. Vzniká především z kyselin arachidonové a linoleové (Schaur 2003). Za fyziologických podmínek asistuje při lysozomálním odbourávání proteinů. 4-hydroxynonenal vzniklý lipidovou peroxidací membrán může mít dokonce mutagenní a genotoxický efekt, stejně jako adukty tvořené s biomolekulami. Jelikož se chová i jako signální molekula zapojená do regulace několika transkripčních faktorů ovlivňujících buněčnou diferenciaci a proliferaci, nebo autofágii a apoptózu, je dnes považován za další důležitý marker peroxidace lipidů (Monroy *et al.*, 2013; Pizzimenti *et al.*, 2013).

2.4 Malondialdehyd

Malondialdehyd je sekundárním produktem lipidové peroxidace, vznikající rozkladem PUFA s delším řetězcem. Je všeobecně považován za ukazatel stresových podmínek a jeho nadprodukce je spojena s mnoha patologickými stavy (Garcia *et al.*, 2013). Ze sekundárních produktů lipidové peroxidace je MDA nejvíce mutagenní. Akutní toxicita MDA je nižší než toxicita 4-HNE (Esterbauer *et al.*, 1991).

Široká paleta MDA aduktů vzniká na základě jeho vysoké reaktivity. Tato reaktivita je však závislá na pH, v oblastech fyziologického pH je reaktivita nižší, jelikož MDA existuje ve formě enolátového iontu. Jakmile však pH klesne, přechází MDA do formy β -hydroxyakroleinu a jeho reaktivita výrazně stoupá (Esterbauer *et al.*, 1991). K reaktivitě přispívá především přítomnost dvou elektrofilních center na elektrondeficientních karbonylových uhlících. Tato centra jsou místem ataku nukleofilů jako jsou bazické aminokyseliny (Lys, His, Arg).

Malondialdehyd může rovněž působit jako přenašeč signálu a regulovat expresi genů. Nedávné výzkumy ukázaly, že MDA reguluje glukosou stimulovanou sekreci insulinu v ostrůvkových buňkách pankreatu (Wang *et al.*, 2014), indukuje expresi genů pro kolagen (García-Ruiz *et al.*, 2002).

2.4.1 Vznik malondialdehydu

Malondialdehyd může vznikat jak neenzymatickou, tak enzymatickou cestou. Neenzymatická dráha vzniku MDA probíhá cyklizací LOO^\bullet zoxidovaného z LOOH.

Tato cyklizace probíhá intramolekulární radikálovou adicí na dvojnou vazbu tvořící L^{\bullet} . Terminační reakcí může vznikat cyklický lipidový peroxid (LOOL), avšak vzniknuvší radikály mohou podlehnout druhé cyklizaci za tvorby cyklických endoperoxidů. Cyklické endoperoxidy jsou strukturně podobné prostaglandinům a jejich štěpením vzniká MDA. Hlavními prekurzory cyklických endoperoxidů jsou kyseliny arachidonová a linoleová, avšak substrátem zmíněných neenzymatických reakcí mohou být i další eikosanoidy (Milne *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2011).

Enzymaticky MDA vzniká *in vivo* jako vedlejší produkt biosyntézy thromboxanu A_2 z kyseliny arachidonové za katalýzy thromboxan A_2 -synthasy (Ekambaram *et al.*, 2012). Další možností tvorby je v průběhu syntézy prostaglandinu H_2 působením COX na kyselinu arachidonovou (Tsikas *et al.*, 2012).

2.4.2 Metabolismus malondialdehydu

Poté, co je MDA vytvořen, může být enzymaticky metabolizován nebo může reagovat s buněčnými nebo tkáňovými proteiny či DNA za vzniku aduktů. Jednou možnou biochemickou dráhou je oxidace katalyzovaná mitochondriální aldehyddehydrogenasou následovaná dekarboxylací za vzniku acetaldehydu. Acetaldehyd je toxická sloučenina, kterou tkáň aktivně metabolizují oxidací katalyzovanou acetaldehyddehydrogenasou. Vznikající acetát je převeden na acetyl-CoA a vstupuje do citrátového cyklu, v němž podléhá kompletní oxidaci (Marnett *et al.*, 1985).

Druhou možnou dráhou je přeměna MDA na methylglyoxal prostřednictvím fosfoglukosaisomerasy. Methylglyoxal podléhá reakci katalyzované glyoxalásou (jejímž kofaktorem je redukovaný glutathion), jejímž produktem je dále metabolizovaný D-laktát (Agadjanyan *et al.*, 2005). Část MDA je rovněž vyloučena močí ve formě enaminalů (Esterbauer *et al.*, 1991).

Počáteční reakce mezi MDA a aminokyselinami (ať už volnými nebo v rámci proteinů) tvoří tzv. Schiffovy báze (Pizzimenti *et al.*, 2013). Acetaldehyd vznikající metabolizací MDA se může adovat na primární adukty za tvorby tzv. malondialdehyd-acetaldehydových aduktů (MAA) (Tuma *et al.*, 2001). U MAA byla prokázána vysoká imunogenita a jsou dále velmi biologicky důležité, jelikož mohou vyvolávat sekundární poškození prostřednictvím intermolekulárního síťování proteinů anebo DNA (Weismann a Binder, 2012). Síťování způsobuje rozsáhlé změny v biochemických vlastnostech biomolekul a v průběhu stárnutí a chronických chorob se takto poškozené biomolekuly akumulují (Slatter *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2011).

2.4.3 Metody detekce a kvantifikace malondialdehydu

Existuje několik analytických přístupů pro odhad míry poškození způsobeného ROS, z nichž nejčastěji používaným je měření koncentrace MDA. V biologických systémech se může MDA vyskytovat volný, nebo vázaný na thiolové- nebo amino- skupiny biomolekul (proteinů nebo nukleových kyselin). Ve vzorcích je obvykle koncentrace volného MDA velmi nízká, proto je nejčastěji stanovována koncentrace celkového MDA. Vázaný MDA je pro celkovou kvantifikaci MDA ve vzorku uvolňován alkalickou hydrolyzou hydroxidem sodným při 60 °C po dobu 30 min. Aby bylo zabráněno opětovné vazbě MDA, jsou poté proteiny obsažené ve vzorku precipitovány kyselinou chloristou nebo trichloroctovou a centrifugací odstraněny ze vzorku (Carbonneau *et al.*, 1991; Pilz *et al.*, 2000; Mendonça *et al.*, 2017).

Pro stanovení koncentrace MDA existuje několik analytických metod, z nichž dodnes nejčastější je stanovení tzv. sloučenin reagujících s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS). Po inkubaci vzorků s kyselinou thiobarbiturovou (TBA) při 100 °C v kyselém prostředí je měřena absorbance při 532 nm, která odpovídá koncentraci TBARS (Bird a Draper, 1984). Tento přístup je velmi jednoduchý a finančně nenáročný, avšak z pohledu stanovení MDA také velmi nepřesný, jelikož TBA reaguje s mnoha dalšími sloučeninami (uhlovodíky, barviva, aminokyseliny, pyridiny), které způsobují interferenci (Yeo *et al.*, 1994; Guillen-Sans a Guzman-Chozas, 1998). Obměnou této metody je chromatografický přístup využívající separaci aduktu MDA-TBA na reverzní fázi s použitím HPLC s fluorescenční nebo UV/VIS detekcí (Volpi a Tarugi, 1998). Jelikož je nutné reakci inkubovat za vysokých teplot (95 - 100 °C) až po dobu 150 minut, může docházet k nežádoucí peroxidaci složek vzorků. I přes to zůstává tato metoda široce používanou pro stanovení MDA v biologických vzorcích (Mateos *et al.*, 2005).

Alternativní metodou stanovení koncentrace MDA bez derivatizace je vysokoúčinná kapilární elektroforéza (HPCE). Příprava vzorků pro toto stanovení zahrnuje pouze precipitaci proteinů, což v případě použití acetonitrilu umožňuje pouze stanovení volného MDA. Citlivost HPCE je asi desetkrát vyšší než HPLC (Del Rio *et al.*, 2005).

Dalším přístupem je derivatizace MDA např. s 2,4-dinitrofenylhydrazinem (DNPH), pentafluorofenylhydrazinem nebo diaminonaftalenem, která umožňuje specifitější stanovení koncentrace MDA. Pro analýzu potravin i biologických vzorků byla s příznivými výsledky použita derivatizace v pentafluorofenylhydrazinu s následnou

separací a detekcí pomocí GC-MS, což je však finančně a technicky náročná metoda (Yeo *et al.*, 1999; Fan a Thayer, 2002). Obdobná měření byla s úspěchem provedena při derivatizaci s DNPH spojené se separací pomocí HPLC, v dnešní době dostupné ve většině laboratoří (Cordis *et al.*, 1998). Tento přístup byl použit pro stanovení koncentrace MDA v biologických vzorcích, a to v potkaní či lidské plasmě, v potkaní moči nebo v tkáňových kulturách buněk (lidský hepatom HepG2) (Pilz *et al.*, 2000; Mateos *et al.*, 2004 a 2005). Metoda HPLC se ukázala být přesná, citlivá a reprodukovatelná pro stanovení lipidové peroxidace buněk.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

RPMI 1640 médium (Biosera, Francie), fetální hovězí sérum (Biosera, Francie), streptomycin (Biosera, Francie), penicilin (Biosera, Francie), trypsin-EDTA 10x (Biosera, Francie), trypanová modř (Sigma-Aldrich, USA), peroxid vodíku (Sigma-Aldrich, USA), kyselina molybdenová (Sigma-Aldrich, USA), heptahydrát síranu železnatého (BDH Laboratory Supplies, Velká Británie), katalasa z hovězích jater (Sigma-Aldrich, USA), hydroxid sodný (Lach-Ner, Česká republika), kyselina chloristá (Sigma-Aldrich, USA), 2,4-dinitrofenylhydrazin (Sigma-Aldrich, Rakousko), kyselina sírová (Lach-Ner, Česká republika), hexan pro HPLC (Sigma-Aldrich, Velká Británie), metanol pro HPLC (Sigma-Aldrich, Francie), triethylamin (Sigma-Aldrich, Belgie), voda pro HPLC (Sigma-Aldrich, Izrael), acetonitril pro HPLC (Sigma-Aldrich, Izrael), kyselina octová (Lach-Ner, Česká republika), 1,1,3,3-tetraethoxypropan (Sigma-Aldrich, Čína), fluorescenční próba SPY-LHP (Dojindo Laboratories, Japonsko)

3.1.2 Přístrojové vybavení

Laminární box s vertikálním prouděním (Merci, Česká republika), kultivační inkubátor (Contherm Mitre 4000 series, Nový Zéland), automatický počítací buněk (Automated Cell Counter TC20 Bio-Rad Laboratories, USA), sklíčka pro počítání buněk (Bio-Rad Laboratories, USA), stolní centrifuga (Fisher Scientific, Korea), stolní mini centrifuga (ThermoFisher, USA), stolní centrifuga (Sigma 3-30K Sartorius, Německo), vortex (IKA Works MS2, USA), třepačka (BioSan SIA PSU-10i, Lotyšsko), ultrasonikátor (Ultrasonikátor UP50H Hielscher, Německo), termoblok (BioSan SIA Bio TDB-100, Lotyšsko), digestoř (Merci M-1800, Česká republika), HPLC (Waters e2695 Separations Module, USA), UV/VIS detektor (Waters 2489 UV/VIS detektor, USA), kolona (Symetry C18, 4,6 x 75 mm, velikost částic 3,5 μm , Waters, USA), absorpční spektrofotometr (Dvoupaprskový spektrometr Unicam UV550, Thermo, USA), laserový konfokální mikroskop (jednotka Fluorview 1000 připojená na mikroskop IX 80, Olympus, Česká republika).

3.2 Biologický materiál a kultivační podmínky

Při experimentech byla použita buněčná linie A2780, která byla kultivována při 37 °C v 5% CO₂ atmosféře. Ke kultivaci bylo použito RPMI-1640 médium s 10% fetálním hovězím sérem (FBS) a antibiotiky (penicilin 100 U·ml⁻¹, streptomycin 100 µg·ml⁻¹). Buňky této kultury adherují povrchovými glykoproteiny ke dnu kultivační lahve. Mezi adhesivní proteiny patří např. plakophilin 2, tetraspanin, presenilin, receptor pro sfingosinfosfát, integrin β-4, claudin 3, α-1 řetězec kolagenu, galectin 7 (Jong-Gyu *et al.*, 2015). Z tohoto důvodu je pro odebrání vzorků nutné krátké natrávení adherentních molekul trypsinem. Trypsinizace je po 1 minutě ukončena přidáním RPMI-1640 média s FBS a antibiotiky. Pro omezení opětovné sedimentace a přichycování buněk ke dnům zkumavek byly odebrané vzorky buněčné suspenze dále uchovávány na třepačce.

Buňky linie A2780 byly získány z ovariálního adenokarcinomu od neléčené pacientky. Tato kultura rakovinných buněk má epiteliální morfologii, buňky rostou v kultivačních lahvích v jedné vrstvě. Linie A2780 je často používána jako model pro výzkum účinnosti potenciálních protirakovinných léků či mechanismu jejich působení. Bylo vytvořeno přes 26 buněčných linií z původní kultury A2780, které jsou rezistentní vůči různým chemoterapeutikům (např. cisplatině, karboplatině, adriamycinu, antracyklinům). Linie rakovinných buněk odolných vůči cytostatickým lékům pak slouží ke zjišťování mechanismu jejich rezistence nebo hledání nových strategií pro překonání jejich odolnosti (Public Health England).

3.3 Metody

3.3.1 Určení počtu a vitality buněk

Počet a vitalita buněk v buněčných kulturách byly určovány pomocí automatického počítáče buněk. Pro zjištění vitality buněk bylo nutné obarvení buněčné suspenze 0,4% w/v trypanovou modří v poměru 1:1. Trypanová modř proniká do cytoplasmy buněk, u živých buněk dochází k aktivnímu pumpování barviva ven do extracelulárního prostoru, ale u mrtvých buněk zůstává v cytoplasmě. Obarvená suspenze je nanášena na počítací sklíčko, vložena do automatického počítáče buněk určujícího jak celkový počet buněk, tak i množství živých buněk ve vzorku.

3.3.2 Příprava biologických vzorků

V experimentech byly použity vzorky připravené tak, aby obsahovaly určitý počet buněk. Pro stanovení vlivu ROS na vitalitu buněk a konfokální mikroskopii ošetřených buněk byla použita koncentrace $2 \cdot 10^6$ buněk·ml⁻¹, zatímco pro HPLC analýzu vzorky obsahovaly $6 \cdot 10^6$ buněk ve 2,5 ml média. Buněčná suspenze byla před samotným měřením třikrát promyta v RPMI-1640 médiu, aby bylo eliminováno falešné pozadí. To by mohlo být způsobeno FBS a antibiotiky reagujícími s chemikáliemi použitými v dalším postupu.

Z promyté buněčné suspenze byly připravovány a analyzovány vlivy tří typů ROS: $^1\text{O}_2$, H_2O_2 a $\bullet\text{OH}$. Kontrolní vzorek buněčné suspenze už nebyl dále upravován.

Pro studium vlivu $^1\text{O}_2$ na buňky bylo ke vzorku buněčné suspenze přidáno 53 μl 100 mM kyseliny molybdenové a 53 μl 100 mM H_2O_2 , jejichž reakcí vzniká $^1\text{O}_2$.

Dalším typem ošetření vzorku buněčné suspenze, na němž byl pozorován účinek druhé neradikálové ROS, bylo 53 μl 100 mM H_2O_2 .

Poslední vzorek byl vystaven Fentonově reakci, při níž vzniká vysoce reaktivní $\bullet\text{OH}$. Reakce byla vyvolána v 1 ml buněčné suspenze přidáním 10 μl 100 mM heptahydrátu síranu železnatého s 50 μl 100 mM H_2O_2 .

Bylo provedeno kinetické měření, během něhož byly vzorky sledovány v časech 0, 30, 60 a 120 min. Reakce byly ukončeny po inkubační době přidáním 16 μl katalasy ($320 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$) k vzorkům ošetřeným reagenty pro tvorbu ROS, které pak byly ihned analyzovány.

3.3.3 Stanovení malondialdehydu v rakovinných buňkách

3.3.3.1 Příprava vzorků pro měření pomocí HPLC

Ze vzorků buněčné suspenze ošetřených reagenty pro zkoumání vlivu ROS byl následujícím způsobem izolován MDA a analyzován pomocí HPLC s UV detekcí. Po dokončení inkubace byl vzorek neprodleně sonikován na ledu po dobu 90 vteřin. Po 15 min centrifugaci při 10 000 g a 20 °C bylo do čisté zkumavky odebráno 800 μl ze vzniklého supernatantu, k němuž bylo přidáno 160 μl 6 M hydroxidu sodného. Vytvořený vzorek byl inkubován v termobloku po dobu 30 min při 60 °C, kdy alkalickou hydrolyzou došlo k uvolnění MDA navázaného na proteiny. K zamezení zpětného navázání MDA k proteinům, byly tyto precipitovány pomocí 400 μl 35% v/v

kyseliny chloristé a okamžitou centrifugací po dobu 10 min při 16 000 g a 20 °C odstraněny ze vzorku. Po dokončení bylo 1 250 µl získaného supernatantu odebráno do zkumavky. Do takto připraveného vzorku bylo přidáno 10 µl 50 mM DNPH rozpuštěného v 50% v/v kyselině sírové a následovala 15 min inkubace ve tmě při pokojové teplotě, při níž vznikal MDA-DNPH adukt. Tento pak byl v digestoři extrahován do 2 520 µl hexanu. Pro snazší odebrání hexanové fáze byla vodná fáze zmrazena v tekutém dusíku. Odpařování odebrané hexanové fáze obsahující MDA-DNPH adukt bylo urychleno vývěvou s plynným dusíkem. Do zkumavky s filmem po odpaření hexanu bylo přidáno 135 µl mobilní fáze a obsah důkladně protřepán. Do vialky bylo odebráno 125 µl vzorku obsahujícího MDA-DNPH adukt.

Analýza MDA-DNPH aduktu probíhala izokratickou separací pomocí HPLC, pro kterou byla připravena mobilní fáze o pH 3,5 obsahující 25 mM triethylamin a acetonitril v poměru 1:1 v/v. Pro úpravu pH mobilní fáze byla přidána kyselina octová. Pro separaci byla použita kolona Symetry C18 (4,6 x 75 mm, s velikostí částic 3,5 µm) a MDA-DNPH adukt byl detekován při vlnové délce 310 nm. Mobilní fáze protékala rychlostí 0,5 ml·min⁻¹ a nástřikový objem analytu činil 100 µl. Měření jednoho vzorku probíhalo po dobu 10 minut. V prostoru s analyzovanými vzorky byla teplota 25 °C a prostor s kolonou byl ohříván na 35 °C. Mezi měřeními jednotlivých vzorků byla chromatografická kolona 10 min promývána mobilní fází s metanolovým gradientem. K evaluaci výsledků získaných HPLC analýzou byl použit software Empower[®] 3.

3.3.3.2 Stanovení kalibrační křivky koncentrace malondialdehydu

Pro adukt MDA-DNPH byl použit standard obsahující 500 µl 1% v/v kyseliny sírové a 20 µl 1,1,3,3-tetraoxypropanu (TEP), který byl inkubován při teplotě 40 °C ve tmě po dobu 2 hodin. Po inkubaci byla změřena absorbance standardu při 244 nm na absorpčním spektrofotometru. Jako referenční vzorek sloužila 1% v/v kyselina sírová. Ze zjištěné absorbance byla vypočítána koncentrace připraveného standardu. Molární absorpční koeficient standardu má hodnotu $\varepsilon = 13700 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Standard byl poté zředěn na požadované koncentrace pro kalibrační křivku MDA 1% v/v kyselinou sírovou.

Do vialky bylo odebráno 125 µl standardu o zvolené koncentraci, a po přidání 1 µl 50 mM DNPH rozpuštěného v 50% v/v kyselině sírové byl vzorek 30 minut inkubován ve tmě. Po dokončení inkubace byl hydrazonový MDA-DNPH adukt analyzován

pomocí HPLC s UV detekcí stejným způsobem jako vzorky připravené z buněčné suspenze.

3.3.4 Detekce hydroperoxidů konfokální mikroskopií

Rakovinné buňky vystavené vlivu ROS byly pozorovány pomocí laserového konfokálního mikroskopu. Vzorky byly připraveny v objemu 0,5 ml postupem uvedeným dříve v kapitole 3.3.2 Příprava biologických vzorků. Po dokončení inkubace s reagenty a katalasou byly vzorky dvakrát promyty ve fosfátovém pufru o pH 7,2. K promytému vzorku bylo přidáno 20 μ l 5 mM fluorescenční próby SPY-LHP a následovalo 30 min inkubace ve tmě na třepačce při teplotě 37 °C. Fluorescenční próba SPY-LHP je vysoce selektivní k LOOH vytvářející fluorescenční komplex SPY-LHPox, jenž neinterferuje s ROS (Soh *et al.*, 2007). Vzorky buněčné suspenze vystavené ROS byly po inkubaci s fluorescenční próbou dvakrát promyty ve fosfátovém pufru o pH 7,2 a zakoncentrovány do výsledného objemu 20 μ l.

Z takto připraveného vzorku bylo nanášeno 10 μ l na podložní sklíčko, překryto krycím sklíčkem a pozorováno na laserovém konfokálním mikroskopu IX 80 s fluorescenční konfokální jednotkou Fluorview 1000. Mikrofotografie byly pořízeny v procházejícím světle (v detekčním modulu s Nomarského filtry pro diferenční interferenční kontrast (DIC)) v kombinaci s fluorescenčním kanálem detekujícím fluorescenci SPY-LHPox. Excitace próby byla provedena argonovým laserem při 488 nm a signál byl detekován pomocí emisního filtru nastaveného na 505-525 nm. K vyhodnocení výsledků konfokální mikroskopie vzorků s fluorescenční próbou SPY-LHP byl použit program Olympus FV10-ASW 3.0 (Sedlářová *et al.*, 2011).

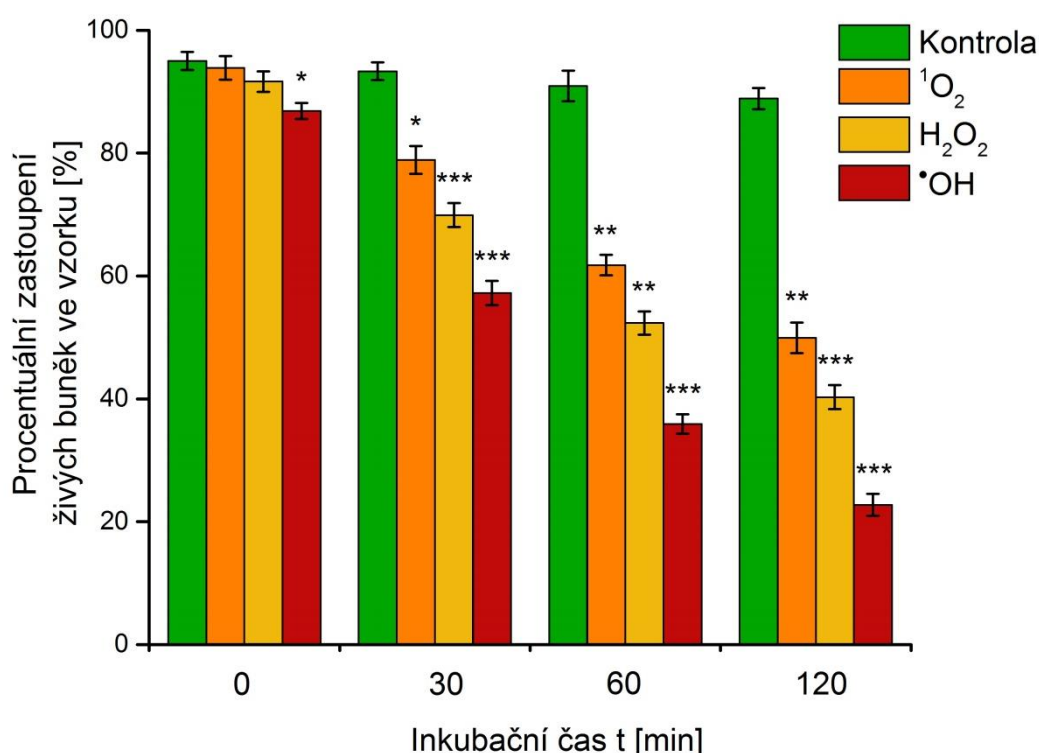
3.3.5 Statistická analýza

Pomocí programu Microsoft Excel a softwaru Origin (verze 8.5.1) byly výsledky podrobeny jednovýběrovému párovému neparametrovému t-testu a vícenásobná ANOVA s Tukey testem. Analýza byla provedena na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Výsledky získané měřením vitality vzorků vystavených působení ROS měly p-hodnoty $< 0,05$, a proto jsou považovány za signifikantní, viz Tab. 1. Výsledky HPLC analýzy měly p-hodnoty $> 0,05$, a proto jsou považovány za nesignifikantní, viz Tab. 2.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Vliv reaktivních forem kyslíku na vitalitu buněk

Na základě kvantifikace všech buněk a podílu živých po vitálním barvení trypanovou modří byl stanoven vliv analyzovaných ROS na vitalitu buněk. Prostřednictvím analýzy vitality po prodlužující se interakci s ROS byla sledována kinetika jejich toxického působení. U všech vzorků ošetřených reagenty tvořící ROS byl v průběhu času zaznamenán úbytek živých buněk. U kontrolního vzorku činil pokles vitality po dobu trvání experimentu pouze 5%, což mohlo být způsobeno vystavení pokojové teplotě. Naproti tomu ošetřené vzorky vykazovaly vysokou míru mortality buněk. Negativní účinek ROS na vitalitu buněk stoupá od $^1\text{O}_2$, přes H_2O_2 , k $\bullet\text{OH}$ (Obr. 3). Dle výsledků statistické analýzy tohoto měření byly rozdíly mezi kontrolními vzorky a vzorky vystavenými působení ROS v inkubačních časech 30 minut, 60 minut i 120 minut signifikantní (Tab. 1).



Obr. 3 Závislost procentuálního zastoupení živých buněk ve čtyřech inkubačních časech (0 min, 30 min, 60 min, 120min) po vystavení vlivu $^1\text{O}_2$, H_2O_2 a $\bullet\text{OH}$ ($n=3$, \pm SD). Hvězdičky označují signifikantní rozdíly mezi ROS stanovené pomocí t-testu: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Rozdíly byly potvrzeny pomocí vícenásobné ANOVY s Tukey testem.

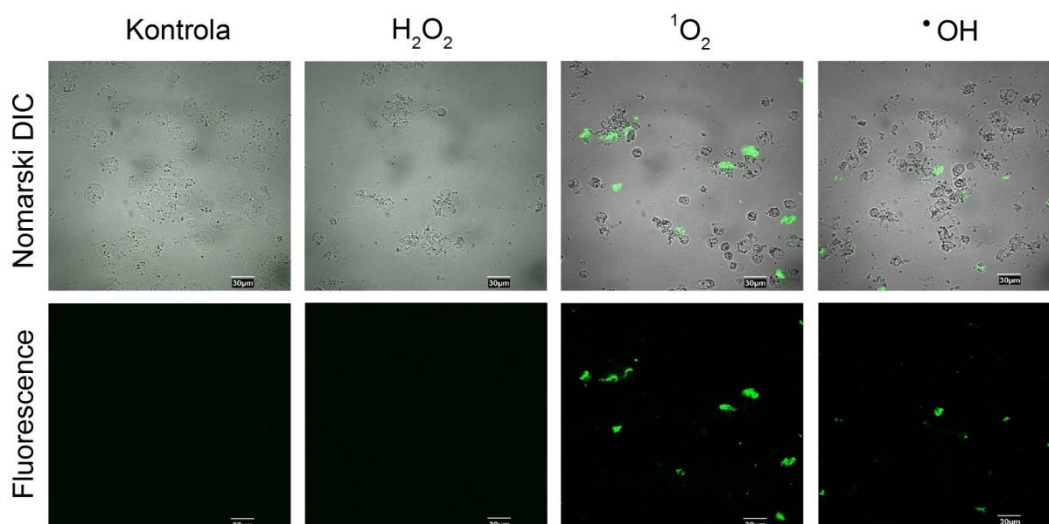
Tab. 1 Výsledky statistické analýzy pro měření vitality buněk ošetřených ROS.

Typ ošetření	Inkubační čas [min]	p-hodnota
Kontrola	0	X
	30	X
	60	X
	120	X
$^1\text{O}_2$	0	0,438
	30	0,0135
	60	0,0067
	120	0,0031
H_2O_2	0	0,1885
	30	0,0005
	60	0,0022
	120	0,0004
$\bullet\text{OH}$	0	0,0276
	30	0,0002
	60	0,0003
	120	0,0003

Trend výsledků se shoduje s daty získanými z obdobné analýzy na rakovinných buňkách linie U937 (Rác *et al.*, 2015). Ve zmíněné publikaci byl sledován vliv H_2O_2 a $\bullet\text{OH}$, kde druhý zmíněný vykazoval taktéž větší negativní účinek na buněčnou vitalitu. Poklesy vitality u buněk U937 byly přibližně 1,5 krát nižší než v předkládané práci u A2780. Buňky linie U937 jsou lymfomy a zjištěná vyšší toxicita vůči A2780 (epiteliální karcinom vaječníku) souvisí s větší odolností lymfomů vůči oxidačnímu stresu. Ta byla již dříve zjištěna a bylo objasněno, že u lymfomů může docházet k mitochondriálním změnám, které jim zajišťují větší odolnost vůči ROS (Wilkinson *et al.*, 2012).

4.2 Detekce hydroperoxidů konfokální mikroskopií

Byla provedena vizualizace LOOH pomocí fluorescenční próby SPY-LHP v buňkách vystavených působení ROS. V kontrolních buňkách nebyl detekován žádný fluorescenční signál, který by poukazoval na přítomnost LOOH (Obr. 4). Tento výsledek byl získán i u vzorku ošetřeného H_2O_2 , absence signálu mohla být v tomto případě způsobena rozpadem LOOH na sekundární produkty ještě před pozorováním.

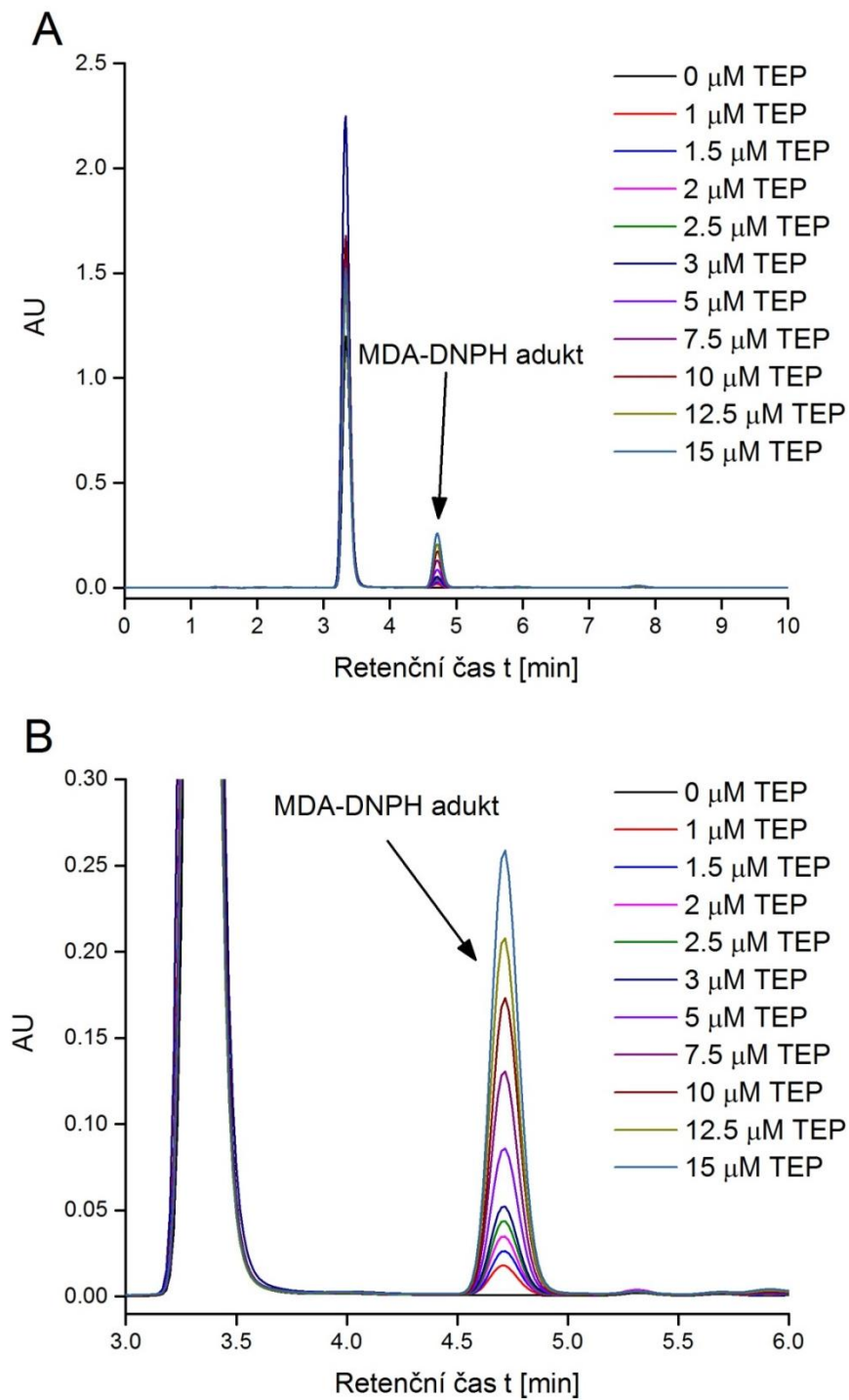


Obr. 4 Snímky buněk vystavených působení ¹O₂, H₂O₂ a •OH po dobu 120 min z konfokálního mikroskopu. Barveno fluorescenční próbou SPY-LHP specifickou pro LOOH (zelená). První řádek překryv Nomarského a fluorescenčního kanálu, druhý řádek fluorescenční kanál. Velikost měřítka 30 μm.

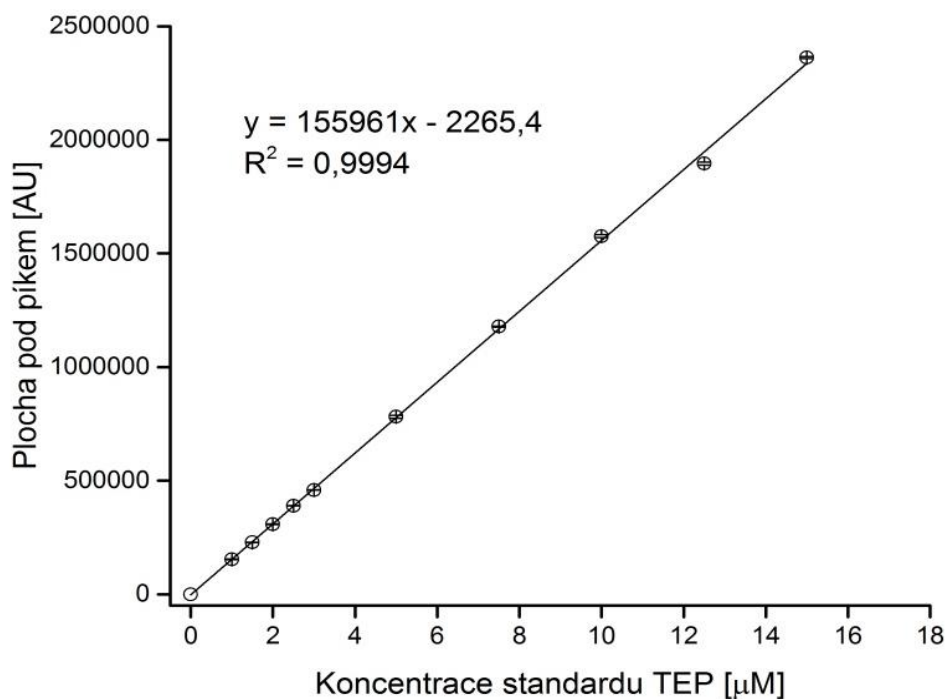
Nejsilnější fluorescenční signál byl po 120 minutách působení pozorován u buněk vystavených ¹O₂. Jeho působením vzniká už v prvních fázích reakce s biomolekulami velké množství LOOH, které se udržuje delší dobu než u H₂O₂, jelikož je ¹O₂ silnějším oxidantem. U •OH byl signál také detekován, ale v menší míře než u ¹O₂, jelikož jsou LOOH jedním z vícera možných produktů, které mohou vznikat.

4.3 Kalibrační křivka pro malondialdehyd

Byla vytvořena koncentrační řada standardu pro MDA, jejíž vzorky byly po derivatizaci s DNPH podrobeny HPLC analýze. Ze získaných chromatogramů (Obr. 5) byla vytvořena kalibrační křivka pro MDA-DNPH adukt (Obr. 6).



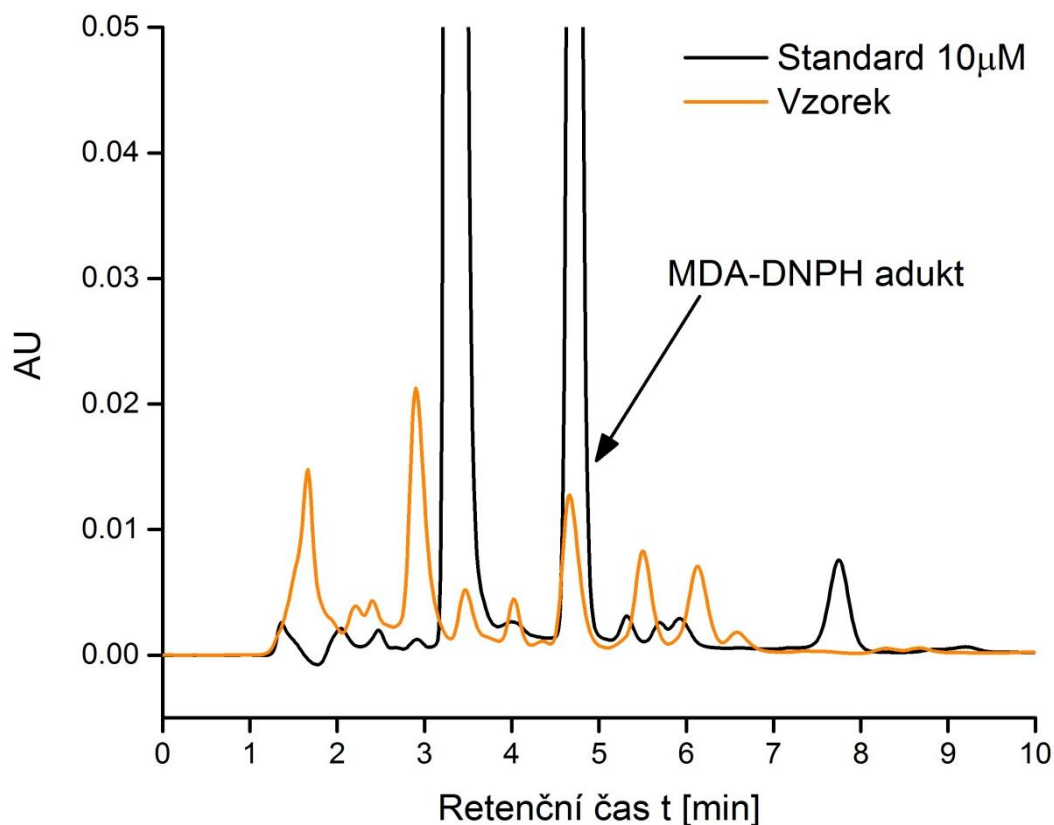
Obr. 5 Srovnání chromatogramů koncentrační řady standardu TEP pro MDA-DNPH adukt.
 A: pohled na celý chromatogram a B: detail píku MDA-DNPH aduktu.



Obr. 6 Kalibrační křivka pro MDA-DNPH adukt. (n=3, ± SD).

4.4 Stanovení malondialdehydu v rakovinných buňkách

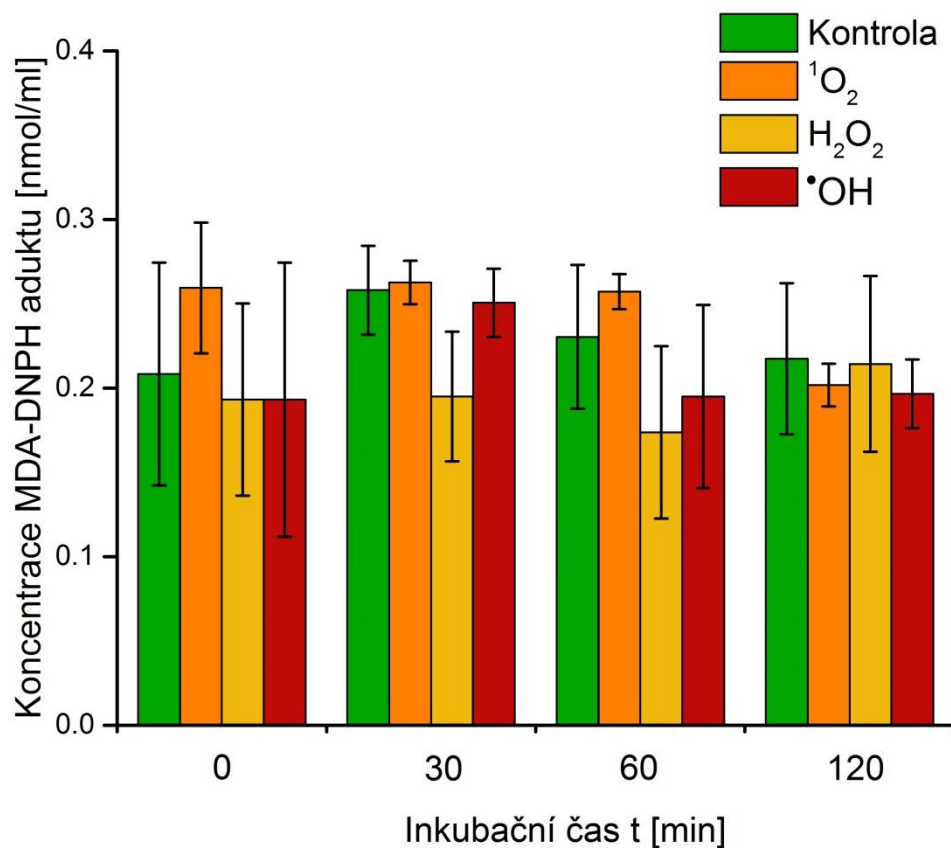
Na základě kalibrační závislosti získané z koncentrační řady byla vyhodnocena data získaná HPLC analýzou jednotlivých vzorků. V chromatogramech byly identifikovány píky odpovídající aduktu MDA-DNPH (Obr. 7) a následně byla provedena integrace jejich křivky. Tím byla stanovena plocha pod píkem, která byla pomocí kalibrace přepočítána na koncentraci MDA ve vzorcích.



Obr. 7 Srovnání chromatogramu standardu (10 μM TEP) a kontrolního biologického vzorku extrahovaného v hexanu.

Koncentrace MDA v kontrolních vzorcích (inkubační čas 0 min) byla srovnatelná s koncentracemi ošetřených vzorků (Obr. 8). Tato skutečnost může souviset s vyšší koncentrací MDA v buňkách již před ošetřením, a může poukazovat na oxidační stres v průběhu kultivace buněk.

Zároveň však u kinetického měření tvorby MDA nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi působením jednotlivých ROS v čase (Tab. 2). Stanovené koncentrace MDA, jakožto markeru lipidové peroxidace, tedy neprokázaly rozdíly mezi intenzitou indukce lipidové peroxidace u sledovaných ROS: $^1\text{O}_2$, H_2O_2 a $\bullet\text{OH}$. Tato zjištění mohou být způsobena rychlým rozpadem MDA na acetaldehyd, takže je detekován pouze zlomek celkového vzniklého MDA. Je také možné, že ve studovaných rakoviných buňkách vzniká větší množství kompetitivního sekundárního produktu lipidové peroxidace, a to 4-HNE. Jeho tvorba probíhá jinými drahami. Alternativními konkurenčními produkty by mohly být také hydroxy mastné kyseliny.



Obr. 8 Kinetické měření vlivu ¹O₂, H₂O₂ a •OH na koncentraci MDA-DNPH aduktu v ošetřených buňkách. (n=3, ± SD). Výsledky byly podrobeny t-testu a vícenásobné ANOVĚ s Tukey testem.

Tab. 2 Výsledky statistické analýzy pro stanovené koncentrace MDA-DNPH aduktu v buňkách ošetřených ROS.

Typ ošetření	Inkubační čas [min]	p-hodnota
Kontrola	0	X
	30	X
	60	X
	120	X
¹ O ₂	0	0,4533
	30	0,8189
	60	0,3008
	120	0,6093
H ₂ O ₂	0	0,7773
	30	0,157
	60	0,2351
	120	0,96

Tab. 2 Výsledky statistické analýzy pro stanovené koncentrace MDA-DNPH aduktu v buňkách ošetřených ROS. (pokračování)

Typ ošetření	Inkubační čas [min]	p-hodnota
•OH	0	0,8628
	30	0,4807
	60	0,7778
	120	0,6106

Nevýznamné rozdíly mezi kontrolními buňkami a buňkami ošetřenými H_2O_2 byly pozorovány už ve dřívějších pracích, konkrétně na lymfomových buňkách linie U937 (Rác *et al.*, 2015). Jak už bylo zmíněno výše, vykazují lymfomy vyšší odolnost vůči oxidačnímu stresu, při kvantifikaci MDA byly stanoveny koncentrace $0.029 \pm 0.003 \text{ nmol ml}^{-1}$ (kontrolní buňky), $0.030 \pm 0.003 \text{ nmol ml}^{-1}$ (ošetřené H_2O_2) a $0.09 \pm 0.02 \text{ nmol ml}^{-1}$ (ošetřené •OH) na objem vzorku (Rác *et al.*, 2015). Jelikož v publikaci nebyl uveden počet buněk ve vzorku, je možné pouze konstatovat, že v předkládané práci byly stanoveny koncentrace o řád vyšší. Navíc autoři prováděli při přípravě vzorku z ošetřených buněk promývání PBS pufrem, což mohlo způsobit vymytí buněčného obsahu u buněk s poškozenou membránou a tím i ztrátu MDA. Nelze proto specifikovat zda jsou rozdíly způsobeny různým typem buněk, či přípravou vzorku.

V další publikaci analyzující vliv proteinových (albuminových) ROOH byl sledován nárůst koncentrace MDA při ošetření buněk A2780, avšak nebyla pozorována koncentračně závislá odezva a koncentrace MDA se pohybovala řádově v jednotkách $\text{pmol} \cdot \text{ml}^{-1}$, což je asi 200 krát méně než v předkládané práci (Lipová, 2016). Počet buněk ve vzorku byl v tomto případě uveden a odpovídal $2 \cdot 10^6$ buněk v 1 ml vzorku, ve srovnání s $2,4 \cdot 10^6$ buněk v 1 ml u předkládané práce. Uvažujeme-li, že autorka použila k iniciaci lipidové peroxidace proteinové hydroperoxydy, jež jsou slabšími oxidačními činidly, můžeme při porovnání s ROS použitými v předkládané práci očekávat nižší odezvu. Avšak metodika přípravy vzorku se lišila, neboť autorka publikace taktéž prováděla promývání ošetřených buněk PBS pufrem, což pravděpodobně způsobilo vymytí obsahu buněk a ztrátu MDA. Proto ani v tomto případě není možno objektivně porovnat a zhodnotit získaná data.

5 ZÁVĚR

V předkládané bakalářské práci byla zpracována literární rešerše na téma ROS, antioxidačních systémů, peroxidace lipidů a produkce MDA.

V experimentální části práce byly nejdříve kultivovány buňky linie A2780 (lidský epiteliální karcinom vaječníku), za účelem zisku modelových buněk pro studium vlivu ROS. Následně probíhalo ošetření těchto buněk ROS, konkrétně $^1\text{O}_2$, H_2O_2 a $\bullet\text{OH}$. Nejdříve byla analyzována vitalita buněk po prodlužující se interakci s ROS, čímž byla sledována kinetika jejich toxického působení. U všech vzorků ošetřených reagenty tvořící ROS byl v průběhu času zaznamenán úbytek živých buněk. V souladu s hypotézou, byly prokázány statisticky významné rozdíly v působení jednotlivých ROS na vitalitu rakovinných buněk, jejichž toxický účinek můžeme seřadit sestupně takto: $\bullet\text{OH} > \text{H}_2\text{O}_2 > ^1\text{O}_2 > \text{kontrola}$.

Následně bylo provedeno ověření probíhající lipidové peroxidace pomocí značení LOOH fluorescenční próbou SPY-LHP a vizualizace konfokální mikroskopií v buňkách vystavených působení ROS. V kontrolních buňkách a buňkách ošetřených H_2O_2 nebyly LOOH prokázány. Oproti tomu u buněk ošetřených $^1\text{O}_2$ a $\bullet\text{OH}$ byl sledován SPY-LHPox fluorescenční signál, v případě $^1\text{O}_2$ intenzivnější.

Pro kvantifikaci MDA v buňkách metodou HPLC byla připravena kalibrační řada a sestrojena kalibrační závislost signálu na koncentraci standardu TEP. Následná kvantifikace MDA v buňkách ošetřených studovanými ROS, odpovídající míře lipidové peroxidace, však neprokázala statisticky signifikantní rozdíly mezi jednotlivými ROS v průběhu času.

Získaná data by mohla sloužit jako základ navazující studie, ve které by byly kvantifikovány konkurenční sekundární produkty lipidové peroxidace (4-HNE nebo hydroxy mastné kyseliny). Zároveň by mohlo být přínosné sledovat stabilitu MDA v médiu a v prostředí buněk, pro posouzení jeho stability.

6 LITERATURA

- Afanas'ev I. (2010): Signaling and Damaging Functions of Free Radicals in Aging-Free Radical Theory, Hormesis, and TOR. *Aging and Disease* **1**, 75-88.
- Agadjanyan Z.S., Dmitriev L.F., Dugin S.F. (2005): A new role of phosphoglucose isomerase. Involvement of the glycolytic enzyme in aldehyde metabolism. *Biochemistry* **70**, 1251-1255.
- Andreou A. a Feussner I. (2009): Lipoxygenases - Structure and reaction mechanism. *Phytochemistry* **70**, 1504-1510.
- Antunes F., Han D., Cadenas E. (2002): Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radical Biology & Medicine* **33**, 1260-1267.
- Armitage J.P. (1999): Bacterial tactic responses. *Advances in Microbial Physiology* **41**, 229-289.
- Ayala A., Muñoz M.F., Argüelles S. (2014): Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014:360438.
<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2014/360438/>.
- Babcock G.T. (1999): How oxygen is activated and reduced in respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 12971-12973.
- Beckman K.B., Ames B.N. (1997): Oxidative decay of DNA. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 19633-19636.
- Belikov A.V., Schraven B., Simeoni L. (2015): T cells and reactive oxygen species. *Journal of Biomedical Science* **22**, 85.
<https://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12929-015-0194-3>.
- Bird R.P., Draper H.H. (1984): Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. *Methods in Enzymology* **105**, 299-305.
- Bravo J., Mate M.J., Schneider T., Switala J., Wilson K., Loewen P.C., Fita I. (1999): Structure of catalase HPII from *Escherichia coli* at 1.9 Å resolution. *Proteins* **34**, 155-166.
- Brieger K., Schiavone S., Miller F.J. Jr, Krause K.H. (2012): Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Medical Weekly* **142**:w13659.
<https://smw.ch/article/doi/smw.2012.13659>.
- Brodie A.E. a Reed D.J. (1987): Reversible oxidation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase thiols in human lung carcinoma cells by hydrogen peroxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **148**, 120-125.
- Carbonneau M.A., Peuchant E., Sess D., Canioni P., Clerc M. (1991): Free and bound malondialdehyde measured as thiobarbituric acid adduct by HPLC in serum and plasma. *Clinical Chemistry* **37**, 1423-1429.
- Castro L., Freeman B.A. (2001): Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition* **17**, 163-165.
- Chance B., Sies H., Boveris A. (1979): Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews* **59**, 527-605.
- Chen C.H., Lin W.C., Kuo C.N., Lu F.J. (2011): Role of redox signaling regulation in propyl gallate-induced apoptosis of human leukemia cells. *Food and chemical toxicology* **49**, 494-501.
- Chen C.H., Liu T.Z., Chen C.H., Wong C.H., Chen C.H., Lu F.J., Chen S.C. (2007): The efficacy of protective effects of tannic acid, gallic acid, ellagic acid, and propyl gallate against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damages in IMR-90 cells. *Molecular Nutrition & Food Research* **51**, 962-968.
- Cheng J., Wang F., Yu D.F., Wu P.F., Chen J.G. (2011): The cytotoxic mechanism of malondialdehyde and protective effect of carnosine via protein cross-linking/mitochondrial dysfunction/reactive oxygen species/MAPK pathway in neurons. *European Journal of Pharmacology* **650**, 184-194.

- Cordis G.A., Das D.K., Riedel W. (1998): High-performance liquid chromatographic peak identification of 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives of lipid peroxidation aldehydes by photodiode array detection. *Journal of Chromatography. A* **798**, 117-123.
- Cuzzocrea S., Thiemermann C., Salvemini D. (2004): Potential therapeutic effect of antioxidant therapy in shock and inflammation. *Current Medicinal Chemistry* **11**, 1147-1162.
- da Silva E. F., Pedersen B. W., Breitenbach T., Toftegaard R., Kuimova M. K., Arnaut L. G., Ogilby P. R. (2012): Irradiation- and sensitizer-dependent changes in the lifetime of intracellular singlet oxygen produced in a photosensitized process. *The Journal of Physical Chemistry B* **116**, 445-461.
- Daniels V. (1984): The Russell effect —a review of its possible uses in conservation and the scientific examination of materials. *Studies in Conservation* **29**, 57-62.
- Davies M.J. (2003): Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **305**, 761-770.
- Del Rio D., Stewart A.J., Pellegrini N. (2005): A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **15**, 316-328.
- DeRosa M. C. a Crutchley R. J. (2002): Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews* **233**, 351-371.
- Dizdaroglu M., Jaruga P., Birincioglu M., Rodriguez H. (2002): Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology & Medicine* **32**, 1102-1115.
- Ekambaram P., Lambiv W., Cazzolli R., Ashton A.W., Honn K.V. (2011): The thromboxane synthase and receptor signaling pathway in cancer: an emerging paradigm in cancer progression and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews* **30**, 397-408.
- Esterbauer H. a Cheeseman K.H. (1990): Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology* **186**, 407-421.
- Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. (1991): Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine* **11**, 81-128.
- Fan X. a Thayer D.W. (2002): gamma-Radiation influences browning, antioxidant activity, and malondialdehyde level of apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 710-715.
- Garcia S.C., Grotto D., Bulcão R.P., Moro A.M., Roehrs M., Valentini J., de Freitas F.A., Paniz C., Bubols G.B., Charão M.F. (2013): Evaluation of lipid damage related to pathological and physiological conditions. *Drug and Chemical Toxicology* **36**, 306-312.
- García-Ruiz I, de la Torre P, Díaz T, Esteban E., Fernández I., Muñoz-Yagüe T., Solís-Herruzo J.A. (2002): Sp1 and Sp3 transcription factors mediate malondialdehyde-induced collagen alpha 1(I) gene expression in cultured hepatic stellate cells. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 30551-30558.
- Gardner H. W. (1989): Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biology & Medicine* **7**, 65-86.
- Gilbert D.L. (1981): *Oxygen and Living Processes: An Interdisciplinary Approach*. Springer-Verlag, New York, U.S.A., 401 stran.
- Girotti A.W. (1998): Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipid Research* **39**, 1529-1542.
- Guillén-Sans R., Guzmán-Chozas M. (1998): The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **38**, 315-330.
- Gutteridge, J.M. (1995): Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry* **41**, 1819-1828.
- Halliwell B., Gutteridge J. (2007): *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed., Oxford University Press, New York, U.S.A., 888 stran.
- Huang D., Ou B., Prior R.L. (2005): The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 1841-1856.
- Huang H., Kozekov I.D., Kozekova A., Wang H., Lloyd R.S., Rizzo C.J., Stone M.P. (2010): DNA cross-link induced by trans-4-hydroxynonenal. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **51**, 625-634.

- Jacobs A. (1970): Low molecular weight intracellular iron transport compounds. *Blood* **50**, 433-439.
- Kim G.H., Kim J.E., Rhie S.J., Yoon S. (2015): The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Experimental Neurobiology* **24**, 325-340.
- Lane N.: (2002): *Oxygen: The Molecule That Made the World*. Oxford University Press, New York, U.S.A., 374 stran.
- Lee J.G., Ahn J.H., Jin Kim T., Ho Lee J., Choi J.H. (2015): Mutant p53 promotes ovarian cancer cell adhesion to mesothelial cells via integrin β 4 and Akt signals. *Scientific reports* **5**, 12642. <https://www.nature.com/articles/srep12642>.
- Levine R.L., Stadtman E.R. (2001): Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental Gerontology* **36**, 1495-1502.
- Lipová N. (2016): Oxidativní poškození lipidů v lidských nádorových buňkách. Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc, Česká republika.
- Liu Z., Zhou T., Ziegler A.C., Dimitrion P., Zuo L. (2017): Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* ; **2017**, 2525967. <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2017/2525967/>.
- Marnett L.J., Buck J., Tuttle M.A., Basu A.K., Bull A.W. (1985): Distribution and oxidation of malondialdehyde in mice. *Prostaglandins* **30**, 241-254.
- Marnett L.J., Rowlinson S.W., Goodwin D.C., Kalgutkar A.S., Lanzo C.A. (1999): Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 22903-22906.
- Martin J.P. a Logsdon N. (1987): Oxygen radicals are generated by dye-mediated intracellular photooxidations: a role for superoxide in photodynamic effects. *Archive of Biochemistry and Biophysics* **256**, 39-49.
- Massey K.A. a Nicolaou A. (2013): Lipidomics of oxidized polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biology & Medicine* **59**, 45-55.
- Mateos R., Goya L., Bravo L. (2004): Determination of malondialdehyde by liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazone derivative: a marker for oxidative stress in cell cultures of human hepatoma HepG2. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **805**, 33-39.
- Mateos R., Lecumberri E., Ramos S., Goya L., Bravo L. (2005): Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **827**, 76-82.
- Matés J.M., Pérez-Gómez C., Núñez de Castro I. (1999): Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* **32**, 595-603.
- Mendonça R., Gning O., Di Cesaré C., Lachat L., Bennett N.C., Helfenstein F., Glauser G. (2017): Sensitive and selective quantification of free and total malondialdehyde in plasma using UHPLC-HRMS. *Journal of Lipid Research* **58**, 1924-1931.
- Milne G.L., Yin H., Morrow J.D. (2008): Human biochemistry of the isoprostane pathway. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 15533-15537.
- Monroy C.A., Doorn J.A., Roman D.L. (2013): Modification and functional inhibition of regulator of G-protein signaling 4 (RGS4) by 4-Hydroxy-2-nonenal. *Chemical Research in Toxicology* **26**, 1832-1839.
- Mügge A. (1998): The role of reactive oxygen species in atherosclerosis. *Zeitschrift für Kardiologie* **87**, 851-864.
- Nakagawa Y., Nakajima K., Tayama S., Moldéus P. (1995): Metabolism and cytotoxicity of propyl gallate in isolated rat hepatocytes: effects of a thiol reductant and an esterase inhibitor. *Molecular Pharmacology* **47**, 1021-1027.
- Niki E. (2014): Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. *Biochimica et Biophysica Acta: General Subjects* **1840**, 809-817.

- Pilz J., Meineke I., Gleiter C.H. (2000): Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications* **742**, 315-325.
- Pizzimenti S., Ciamporcero E., Daga M., Pettazzoni P., Arcaro A., Cetrangolo G., Minelli R., Dianzani C., Lepore A., Gentile F., Barrera G. (2013): Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. *Frontiers in Physiology* **4**, 242.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2013.00242/full>.
- Prejean J., James R., Farnell D., Belzer J., Thompson R. (1982): NTP Technical Report On The Carcinogenesis Bioassay Of Propyl Gallate (CAS No. 121-79-9) In F344/N Rats And B6C3F1 Mice (Feed Study). *U.S. Department Of Health And Human Services Public Health Service National Institutes of Health NTP-81-42 NIH Publication No. 83-1796*.
- Public Health England: <https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/113526/a2780-cell-line-profile.pdf> (24. 2. 2018)
- Rác M., Křupka M., Binder S., Sedlářová M., Matusšková Z., Raška M., Pospíšil P. (2015): Oxidative damage of U937 human leukemic cells caused by hydroxyl radical results in singlet oxygen formation. *PloS One* **10**:e0116958.
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0116958>.
- Repetto M.G., Ferrarotti N.F., Boveris A. (2010): The involvement of transition metal ions on iron-dependent lipid peroxidation. *Archives of toxicology* **84**, 255-262.
- Schaur R.J. (2003): Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Molecular Aspects of Medicine* **24**, 149–159.
- Schneider C., Pratt D.A., Porter N.A., Brash A.R. (2007): Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis. *Chemistry & Biology* **14**, 473-488.
- Seaver L.C., Imlay J.A. (2001): Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **183**, 7173-7181.
- Sedlářová M., Petřivalský M., Piterková J., Luhová L., Kočířová J., Lebeda A.: (2011): Influence of nitric oxide and reactive oxygen species on development of lettuce downy mildew in *Lactuca* spp. *European Journal of Plant Pathology* **129**, 267-280.
- Slatter D.A., Avery N.C., Bailey A.J. (2004): Identification of a new cross-link and unique histidine adduct from bovine serum albumin incubated with malondialdehyde. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 61-69.
- Smith E.E. (1989): Thromboxane A2 in cardiovascular and renal disorders: is there a defined role for thromboxane receptor antagonists or thromboxane synthase inhibitors?. *Eicosanoids* **2**, 199-212.
- Smith W.L. a Murphy R.C. (2002): The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxygenase pathways. In: *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. 4th ed. (Vance D. E., Vance J. E., eds.), Elsevier Science, 341-371.
- Soh N., Ariyoshi T., Fukaminato T., Nakajima H., Nakano K., Imato T. (2007): Swallow-tailed perylene derivative: a new tool for fluorescent imaging of lipid hydroperoxides. *Organic & Biomolecular Chemistry* **5**, 3762-3768.
- Spector A.A. (2009): Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway. *The Journal of Lipid Research* **50**, 52-56.
- Spector A.A. a Kim H.Y. (2015): Cytochrome P450 epoxygenase pathway of polyunsaturated fatty acid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular and Cell Biology of Lipids* **1851**, 356-365.
- Stadtman E.R. (1992): Protein oxidation and aging. *Science* **257**, 1220-1224.
- Stadtman E.R. (2001): Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* **928**, 22-38.
- Stadtman E.R. (2004): Cyclic oxidation and reduction of methionine residues of proteins in antioxidant defense and cellular regulation. *Archive sof Biochemistry and Biophysics* **423**, 2-5.
- Steinbrenner H., Sies H. (2009): Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta: General Subjects* **1790**, 1478–1485.

- Szabó C., Ischiropoulos H., Radi R. (2007): Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* **6**, 662–680.
- Tayama S. A Nakagawa Y. (2001): Cytogenetic effects of propyl gallate in CHO-K1 cells. *Mutation Research* **498**, 117-127.
- Tsikas D., Suchy M.T., Niemann J., Tossios P., Schneider Y., Rothmann S., Gutzki F.M., Frölich J.C., Stichtenoth D.O. (2012): Glutathione promotes prostaglandin H synthase (cyclooxygenase)-dependent formation of malondialdehyde and 15(S)-8-*iso*-prostaglandin F2a. *FEBS Letters* **586**, 3723–3730.
- Tuma D.J., Kearley M.L., Thiele G.M., Worrall S., Haver A., Klassen L.W., Sorrell M.F. (2001): Elucidation of reaction scheme describing malondialdehyde-acetaldehyde-protein adduct formation. *Chemical Research in Toxicology* **14**, 822-832.
- Valko M., Morris H., Cronin M.T. (2005): Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* **12**, 1161-1208.
- Viita H., Pacholska A., Ahmad F., Tietäväinen J., Naarala J., Hyvärinen A., Wirth T., Ylä-Herttuala S. (2012): 15-Lipoxygenase-1 induces lipid peroxidation and apoptosis, and improves survival in rat malignant glioma. *In Vivo* **26**, 1-8.
- Volpi N., Tarugi P. (1998): Improvement in the high-performance liquid chromatography malondialdehyde level determination in normal human plasma. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications* **713**, 433-437.
- von Sonntag C. (1987): New aspects in the free-radical chemistry of pyrimidine nucleobases. *Free Radical Research Communications* **2**, 217-224.
- Wang X., Lei X.G., Wang J. (2014): Malondialdehyde regulates glucose-stimulated insulin secretion in murine islets via TCF7L2-dependent Wnt signaling pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology* **382**, 8–16.
- Weismann D. a Binder C.J. (2012): The innate immune response to products of phospholipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes* **1818**, 2465-2475.
- Weiss, J. (1935): Elektronenübergangsprozesse im Mechanismus von Oxydations- und Reduktionsreaktionen in Lösungen. *Naturwissenschaften* **23**, 64-69.
- Wilkinson S.T., Tome M.E., Briehl M.M. (2012): Mitochondrial adaptations to oxidative stress confer resistance to apoptosis in lymphoma cells. *International Journal of Molecular Sciences* **13**, 10212-10228.
- Winterbourn C.C. a Stern A. (1987): Human red cells scavenge extracellular hydrogen peroxide and inhibit formation of hypochlorous acid and hydroxyl radical. *The Journal of Clinical Investigation* **80**, 1486-1491.
- Yamamoto S., Suzuki H., Ueda N., Takahashi Y., Yoshimoto T. (2004): Mammalian lipoxygenases. In: *The Eicosanoids*. (Curtis-Prior P., ed.), John Wiley & Sons, Chichester, VB, 53–59.
- Yeo H.C., Helbock H.J., Chyu D.W., Ames B.N. (1994): Assay of malondialdehyde in biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **220**, 391-396.
- Yeo H.C., Liu J., Helbock H.J., Ames B.N. (1999): Assay of malondialdehyde and other alkanals in biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry. *Methods in Enzymology* **300**, 70-78.
- Yin H., Xu L., Porter N. A. (2011): Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chemical Reviews* **111**, 5944–5972.
- You B.R. a Park W.H. (2011): The enhancement of propyl gallate-induced HeLa cell death by MAPK inhibitors is accompanied by increasing ROS levels. *Molecular Biology Reports* **38**, 2349-2358.
- You W.C., Zhang L., Gail M.H., Chang Y.S., Liu W.D., Ma J.L., Li J.Y., Jin M.L., Hu Y.R., Yang C.S., Blaser M.J., Correa P., Blot W.J., Fraumeni Jr. J.F., Xu G.W. (2000): Gastric dysplasia and gastric cancer: *Helicobacter pylori*, serum vitamin C, and other risk factors. *Journal of the National Cancer Institute* **92**, 1607–1612.

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

$^1\text{O}_2$	singletní kyslík
$^3\text{R}=\text{O}$	tripletní karbonyl
4-HNE	4-hydroxynonenal
$\bullet\text{OH}$	hydroxylový radikál
CAT	katalasa
$\text{CO}_3^{\bullet-}$	uhličitanový radikál
COX	cyklooxygenasa
DIC	diferenční interferenční kontrast
DNPH	2,4-dinitrofenylhydrazin
FBS	fetální hovězí sérum
H_2O_2	peroxid vodíku
HClO	kyselina chlorná
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HO_2^{\bullet}	hydroperoxylový radikál
HPCE	vysokoučinná kapilární elektroforéza
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
L^{\bullet}	lipidový alkylový radikál
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
LO^{\bullet}	lipidový alkoxylový radikál
LOH	lipidová hydroxy mastná kyselina
LOO^{\bullet}	lipidový peroxylový radikál
LOOH	lipidový hydroperoxid
LOOL	lipidový peroxid
LOX	lipoxygenasa
MAA	malondialdehyd-acetaldehydový adukt
MDA	malondialdehyd
O_2	molekulární kyslík
$\text{O}_2^{\bullet-}$	superoxidový aniontový radikál

O ₃	ozon
PUFA	polynenasycená mastná kyselina
R [•]	organický alkylový radikál
RNS	reaktivní formy dusíku
RO [•]	organický alkoxylový radikál
ROO [•]	organický peroxylový radikál
ROOH	organický hydroperoxid
ROOOOR	organický tetraoxid
ROS	reaktivní formy kyslíku
SOD	superoxid dismutasa
TBA	kyselina thiobarbiturová
TBARS	sloučeniny reagující s kyselinou thiobarbiturovou
TEAC	Trolox ekvivalentní antioxidační kapacita
TEP	1,1,3,3-tetraetoxypropan