

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

KATEDRA BIOFYZIKY

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Charakterizace produktů lipidové peroxidace u lidských  
nádorových buněk**

Characterization of lipid peroxidation product in human cancer cells

Vypracoval: Jindřich Švihel

Studijní obor: Biofyzika

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Ursula Ferretti

Děkuji vedoucí bakalářské práce, Mgr. Ursule Ferretti za veškerou pomoc spojenou s bakalářskou prací. Děkuji doc. RNDr. Pavlu Pospíšilovi, Ph.D. a Mgr. Marku Rácovi, Ph.D. za konzultace a odborné rady. Dále bych chtěl poděkovat mé přítelkyni Pavlíně Kopecké za pevné nervy a korektury textu. Děkuji mé rodině, která mě po celou dobu studia všemi směry podporovala. Na závěr děkuji IGA\_PrF\_2016\_013, ze kterého byly použity finance na nákup mnou používaných chemikálií. A výzkumníkům z oddělení biofyziky za ochotu a trpělivost při práci v laboratořích po mém boku.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením  
Mgr. Ursuly Ferretti a za použití literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne 13. 5. 2016

## SOUHRN

Peroxidace lipidů vede k poškození molekul lipidů a tím k jejich nefunkčnosti. Lipidy jsou důležitými částmi buněčných membrán a jejich poškození vede ke změnám fluidity, propustnosti látek a může vést až k buněčné smrti tzv. lyzi. Cílem této práce bylo vytvořit, detekovat a charakterizovat produkty peroxidace lipidů z lidských nádorových buněk. K tomu jsme využili Fentonovou reakci, kterou se vytváří hydroxylový radikál. Ten napadá membrány nádorových buněk a tvoří lipidové radikálové formy. K jejich detekci jsme použili metodu elektronové paramagnetické resonance (EPR) v kombinaci s vyčytávačem elektronů POBN (4-pyridil-1-oxid-N-tetra-butylnitron), který se nejvíce hodí pro detekci lipidových radikálů. Detekovali jsme volný radikál s EPR spektrem odlišným od spektra aduktu POBN/OH. Usoudili jsme, že se jedná o lipidový alkylový radikál. Tuto hypotézu podporují provedené simulace, vysoká stabilita signálu, tvar spektra i navýšení intenzity EPR spektra po zamezení oxidace.

### **Použité zkratky:**

AscH<sup>•</sup> - monodehydroaskorbátový radikál

AscH<sub>2</sub> - L-askorbát

BMPO - 5-tert-butoxycarbonyl 5-methyl-1-pyrrolineN-oxid

DHA - dehydroaskorbát

DMPO - 5,5-dimethyl-pyrroline-1-oxid

EMPO - 5-(ethoxycarbonyl)-5-methyl-1-pyrrolin-oxid

EPR - elektronová paramagnetická rezonance

HO<sup>•</sup> - hydroxylový radikál

HO<sub>2</sub><sup>•</sup> - hydroperoxylový radikál

HPLC - vysokotlaká kapalinová chromatografie

L<sup>•</sup> - alkylový radikál

LO<sup>•</sup> - alkoxylový radikál

LOO<sup>•</sup> - peroxylový radikál

LOOH - lipidový hydroperoxid

O<sub>2</sub> - molekulárního kyslíku

PBN - α-phenyl N-tertiary-butylnitron

POBN - 4-pyridil-1-oxid-N-tetra-butylnitron

POBN/L – adukt 4-pyridil-1-oxid-N-tetra-butylnitron s alkylovým radikálem

POBN/OH – adukt 4-pyridil-1-oxid-N-tetra-butylnitron s hydroxylovým radikálem

POBN/OOL – adukt 4-pyridil-1-oxid-N-tetra-butylnitron s peroxylovým radikálem

POBN/R – adukt 4-pyridil-1-oxid-N-tetra-butylnitron s organickým radikálem

R<sup>•</sup> - organický radikál

RNS - reaktivní formy dusíku

ROS - reaktivní formy kyslíku

$\alpha$ -TO $\cdot$  -  $\alpha$ -tokoferolový radikál

$\alpha$ -TOQ -  $\alpha$ -tokoferolchinon

# OBSAH

1. Úvod.....	1
2. Přehled problematiky .....	2
2.1 Lipidy .....	2
2.1.1 Mastné kyseliny .....	4
Mononenasyčené mastné kyseliny.....	6
Polynenasycené mastné kyseliny.....	6
2.2 Peroxidace lipidů buněčných membrán .....	7
2.2.1 Neenzymatická.....	7
2.2.2 Enzymatická .....	9
2.2.3 Antioxidanty.....	10
2.3 Buňky A2780 .....	11
2.4 Elektronová paramagnetická rezonance.....	12
2.4.1 Princip .....	13
2.4.2 Spin trapping.....	14
2.4.2.1 Spektra aduktů lipidových radikálů s vychytávačem elektronů POBN .	14
3. Praktická část .....	17
3.1 Materiál metody .....	17
3.1.1 Chemikálie.....	17
3.1.2 Přístrojové vybavení .....	17
3.1.3 Biologický materiál.....	17
3.1.4 Příprava biologického materiálu.....	17
3.1.5 Určení počtu buněk.....	18
3.1.6 Měření signálu hydroxylového radikálu .....	18
3.1.7 Měření signálů organických radikálů .....	18
3.1.8 Způsob měření na EPR spektrometru pomocí programu Miniscope Control	19
3.1.9 Simulace EPR signálů .....	20
3.2 Výsledky .....	21
4. Diskuze .....	30

5. Závěr.....	33
6. Seznam literatury.....	34



# 1. Úvod

Jak již je několik desetiletí známo, reaktivní formy kyslíku (ROS – reactive oxygen species) a reaktivní formy dusíku (RNS – reactive nitrogen species) způsobují v živočišných organizmech řadu pozitivních i negativních procesů. Tyto volné radikály napadají biologicky významné sloučeniny, jako jsou lipidy, proteiny a nukleové kyseliny. Mění tak jejich strukturu a vedou k nesprávné biologické funkci daných sloučenin.

Peroxidace lipidů, což je napadení lipidů ROS a RNS má za následek vznik produktů lipidové peroxidace. Ty jsou často radikálové podoby, tím se má na mysli, že obsahují alespoň jeden nepárový elektron. Pro detekci volných radikálů je nejpoužívanější EPR. Sama o sobě by EPR však příliš volných radikálů nedetekovala, jelikož volné radikály mají dobu života v řádech tisícín sekund i méně. Proto nedílnou součástí této metody je použití tzv. vycytávačů spinu, díky nimž jsme schopni převést volné radikály na adukty s delší dobou života a tím je detekovat.

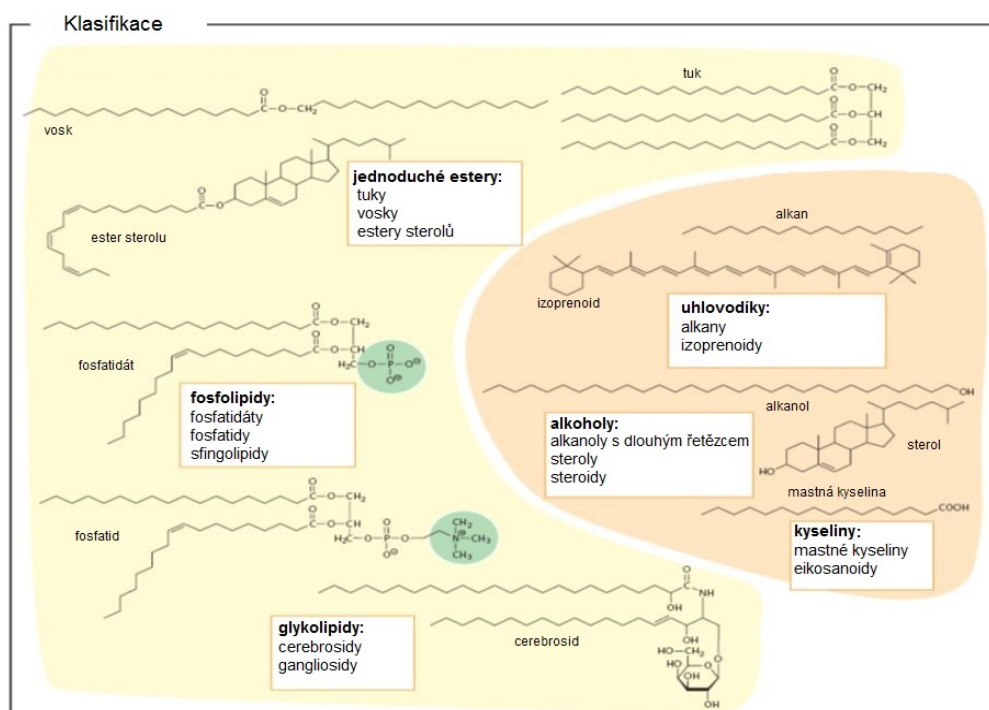
Proti volným radikálům existují účinné látky – antioxidanty. Antioxidanty mohou převádět volné radikály do méně reaktivních stavů a tak hrají klíčovou roli v organizmech, kde zabraňují poškozování buněčných struktur. Antioxidanty dělíme na enzymatické antioxidanty (superoxid dismutáza, glutathion peroxidáza a kataláza) a neenzymatické antioxidanty (L-askorbát,  $\alpha$ -tokoferol, glutathion, karotenoidy, flavonoidy a jiné).

Cílem této práce bylo vyvolat peroxidaci lipidů na lidské nádorové buněčné linii A2780. Zvládnout metodiku práce EPR a vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC). Pomocí těchto metod se pokusit o charakterizaci produktů lipidové peroxidace a vypracovat literární rešerši na dané téma.

## 2. Přehled problematiky

### 2.1 Lipidy

Lipidy jsou přirozeně vyskytující se molekuly v rostlinných i živočišných organizmech, z chemického pohledu se jedná o estery vyšších karboxylových kyselin. Mezi lipidy řadíme různorodé skupiny látek jako jednoduché estery, fosfolipidy, glykolipidy, lipidické alkoholy, uhlovodíky a mastné kyseliny. Jejich základní struktura je naznačena na Obrázku 1 (Koolman a Röhms 2012).



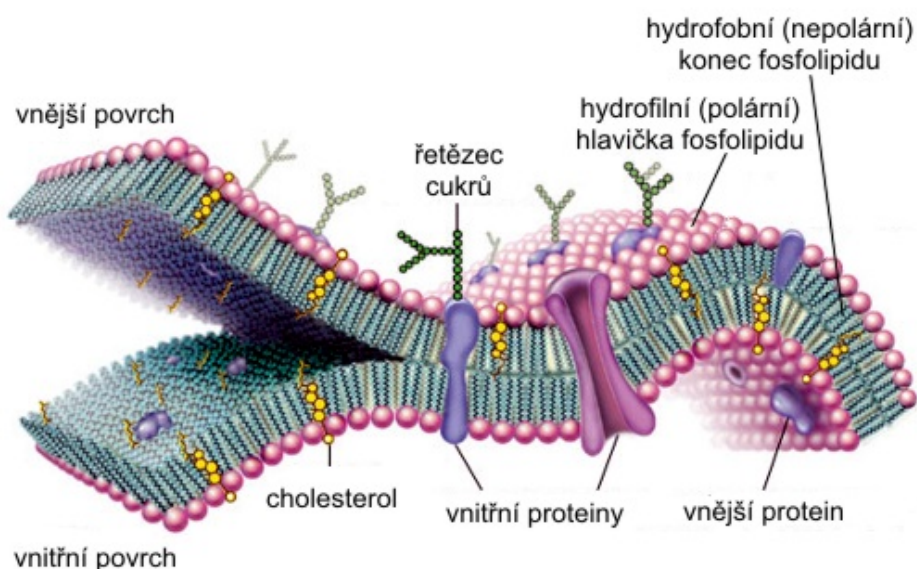
Obrázek 1.: Struktura skupin lipidů převzato a upraveno z Koolman a Röhms 2012

Lipidy jsou dobře rozpustné v organických rozpouštědlech, jako jsou benzen, aceton, metanol a chloroform. V polárních rozpouštědlech, jako je například voda, jsou naopak nerozpustné nebo velmi špatně rozpustné (Koolman a Röhms 2012).

Lipidy mají amfifilní vlastnosti. Díky těmto vlastnostem jsou lipidy schopny tvořit strukturu nazývanou micely. Micely jsou shodně orientované shluky molekul lipidů. Nachází se zde hydrofilní a hydrofobní část lipidů a vzájemnou orientací těchto částí

vznikají nejjednodušší membrány, oddělující dvě vodná prostředí (Lodish a kol. 2000). Rozdíly v délce řetězce a stupně nasycenosti mastných kyselin jsou důležité, protože ovlivňují schopnost lipidových molekul zaklínit se proti sobě, což má vliv na fluiditu membrány. Kratší řetězce, nebo přítomnost záhybů v molekule lipidu (způsobeny dvojnou vazbou), stěžují zaklínění molekul, a proto zvyšují fluiditu membrán (Alberts 2002).

Lipidy jsou tudíž důležitými stavebními prvky membrán. Zde spadají fosfolipidy, glykolipidy a cholesterol (Koolman a Röhm 2012). Lipidy mají v živočišných membránách nezastupitelnou úlohu a tvoří přibližně 50% hmotnosti většiny živočišných membrán (nejvíce zastoupeny jsou právě fosfolipidy), ale přesný poměr není jasně daný a odvíjí se od funkce a typu dané buňky (Alberts 2002). Jednotlivé lipidové komponenty jsou znázorněny v Obrázku 2.



**Obrázek 2.: Model buněčné membrány a jejích komponentů** – fosfolipidová dvojvrstva, oddělující dvě vodná prostředí. Fialové kuličky zobrazují hydrofilní části, zatímco tmavě modře jsou vyobrazeny hydrofobní části fosfolipidu. Vyskytují se zde také další součásti buněčné membrány, jako jsou vmezeřené proteiny, cholesterol nebo řetězce cukrů. Převzato z [http://www.aldebaran.cz/bulletin/2010\\_16/membrana.jpg](http://www.aldebaran.cz/bulletin/2010_16/membrana.jpg)

Lipidy v membránách se kromě stavební funkce, podílí také na elektrické izolaci. Obtížná iontová propustnost přes lipidové membrány je důležitá pro vznik membránových potenciálů (Koolman a Röhm 2012).

Lipidy, konkrétně mastné kyseliny, jsou významným zdrojem energie, což je jedna z jejich hlavních biologických funkcí. Energie je v mastných kyselinách dlouhodobě uložena. Mastné kyseliny mohou přecházet do tkání, kde se za přítomnosti kyslíku oxidují, procesem zvaným  $\beta$ -oxidace. Během tohoto procesu se redukují koenzymy, které se v dýchacím řetězci dále přeměňují za vzniku energetické makromolekuly adenosintrifosfátu, sloužící jako okamžitý zdroj energie.

Další funkcí, kde lipidy hrají nezastupitelnou úlohu, je šíření informace, jelikož jsou součástí některých hormonů. Některé lipidy vytvářejí takzvané kotvy a zajišťují úchyty proteinů do membrán. Jiné mohou být kofaktory enzymatických reakcí (Koolman a Röhm 2012, Cacabelos a kol. 2014).

### **2.1.1 Mastné kyseliny**

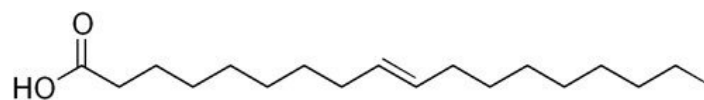
Mastné kyseliny jsou vyšší karboxylové kyseliny s nerozvětveným uhlovodíkovým řetězcem. V přírodních tucích mají zpravidla sudý počet uhlíkových atomů, jelikož vznikají ze dvou uhlíkových jednotek (Murray a kol. 2001). Vznikají hydrolýzou triglyceridů a fosfolipidů. Mastné kyseliny dělíme na nasycené a nenasycené, rozdíl závisí na přítomnosti dvojných vazeb a počtu vodíku v uhlovodíkovém řetězci. Nasycené mastné kyseliny neobsahují dvojnou vazbu, zatímco nenasycené mastné kyseliny mají alespoň jednu dvojnou vazbu v uhlovodíkovém řetězci (Leyton a kol. 1987).

Nasycené mastné kyseliny jsou lineární a jejich linearita je způsobena jednoduchými vazbami, jež tvoří ohyby. Nasycené mastné kyseliny dělíme podle délky řetězce na krátké, střední a dlouhé (Tabulka 1), (Katan a kol. 1994).

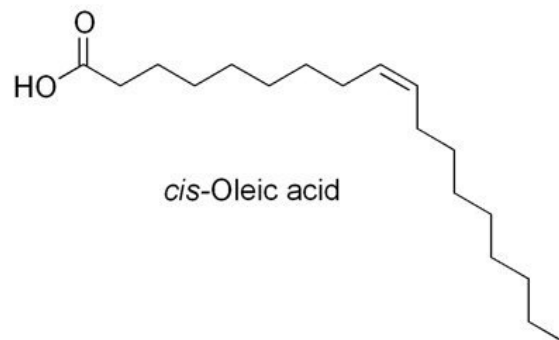
**Tabulka 1: Klasifikace nasycených mastných kyselin podle délky řetězce.**

Délka řetězce	Triviální název	Funkční vzorec
<b>Krátký</b>	kyselina octová	$\text{CH}_3\text{COOH}$
	kyselina propionová	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$
<b>Střední</b>	kyselina kapronová	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$
	kyselina kaprylová	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
	kyselina kaprinová	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$
	kyselina laurová	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
<b>Dlouhý</b>	kyselina palmitová	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
	kyselina stearová	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
	kyselina arachidonová	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$

U nenasyčených mastných kyselin se vyskytuje alespoň jedna dvojná vazba. Podle počtu dvojných vazeb dělíme mastné kyseliny na mononenasyčené a polynenasycené (Tabulka 2). Kvůli přítomnosti dvojných vazeb jsou nenasyčené mastné kyseliny více náchylné k reakcím vedoucím k peroxidaci lipidů, nelineární a více fluidní. Různé kombinace dvojných vazeb u nenasyčených mastných kyselin mohou tvořit dvě odlišné prostorové uspořádání, neboli izomery (cis a trans). Pokud molekula obsahuje na dvojně vazbě oba vodíky na shodné straně, nazývá se cis izomer, když na protilehlých nazýváme tuto vazbu trans izomer. V důsledku je možné izomery tvarově odlišit, zatímco trans izomery jsou rovinné, cis izomery mají řetězec zahnutý, což můžeme pozorovat na Obrázku 3 (Roche 1999).



*trans*-Oleic acid



*cis*-Oleic acid

Obrázek 3.: Ukázka *trans* a *cis* izomerie u kyseliny olejové. Převzato z <http://media0.webgarden.cz/images/media0:5109fdfd2739a.jpg/02.jpg>

Tabulka 2: Klasifikace nenasycených mastných kyselin podle počtu dvojných vazeb.

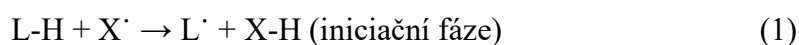
Počet dvojných vazeb	Triviální název	Funkční vzorec
<b>Mononenasyčené mastné kyseliny</b>	kyselina olejová	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Polynenasycené mastné kyseliny	kyselina linolová	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_2(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
	kyselina $\alpha$ -linolenová	$\text{CH}_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_3(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
	kyselina arachidonová	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
	kyselina dokosaheptaenová	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_6\text{CH}_2\text{COOH}$

## 2.2 Peroxidace lipidů buněčných membrán

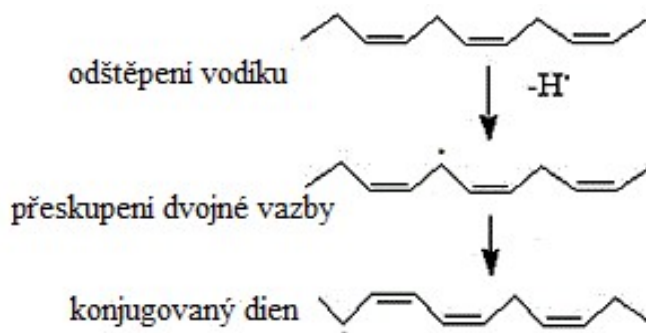
### 2.2.1 Neenzymatická

Peroxidace lipidů je řetězová reakce, která vede k oxidativnímu poškození nenasycených mastných kyselin způsobená volnými radikály. Mezi volné radikály, jež nejčastěji způsobují peroxidaci lipidů patří hydroxylový radikál ( $\text{HO}^\bullet$ ) a hydroperoxylový radikál ( $\text{HO}_2^\bullet$ ). Peroxidací lipidů se mění fluidita buněčných membrán, ionty (mimo jiné) snáze prostupují membránou, to ovlivňuje i membránový potenciál a vše může vyústit v lyzi buňky. Lipidy může negativně poznamenat působení ROS. Dochází tak k oxidačním a peroxidačním reakcím polynenasycených mastných kyselin, které jsou hojně zastoupeny ve fosfolipidových dvojvrstvách buněčných membrán. Nejnáchylnější jsou k těmto reakcím fosfolipidové membrány s vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin, kde jsou především napadány vyčnívající části dlouhých mastných kyselin. Nejčastějším terčem útoků volných radikálů bývají mastné kyseliny, jako jsou linoleová, arachidonová a dokosahexanová (Grinna 1977, Porter a kol. 1995, Buettner 2008).

Peroxidace lipidů je řetězová reakce, která se skládá ze tří fází: iniciační, propagační a terminační (Yin a Porter 2011). Iniciační, rovnice 1, je napadnutí molekuly mastné kyseliny (L-H) jedním z výše zmíněných volných radikálů ( $\text{X}^\bullet$ ).

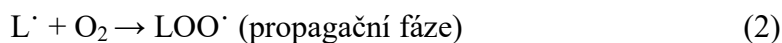


Nejcitlivějším místem tohoto útoku je methylenová skupina ( $=\text{CH}-$ ) a to z důvodu výskytu dvojné vazby, uhlovodíkový zbytek je tak reaktivnější než uhlovodíkový zbytek s vazbou jednoduchou. Volný radikál odštěpí mastné kyselině atom vodíku a vytvoří se alkylový radikál ( $\text{L}^\bullet$ ). Ve struktuře mastné kyseliny dochází při odštěpení vodíku k přeskupení dvojné vazby za vzniku konjugovaného dienu, kdy mezi dvěma dvojnými vazbami se nachází jedna jednoduchá vazba, což je znázorněno na Obrázku 4, kvůli přeskupení dvojné vazby.

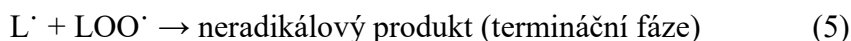
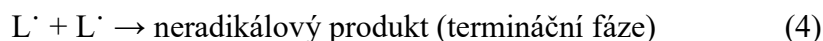


Obrázek 4.: Tvorba konjugovaného dienu - reakcí nenasycené mastné kyseliny s volným radikálem dochází k odštěpení atomu vodíku za vzniku alkylového radikálu, který má tendenci se částečně stabilizovat pomocí přeskupení vazeb molekuly lipidu na konjugovaný dien. Převzato a upraveno z <http://www.cyberlipid.org/images/pict138.GIF>

V propagační fázi, rovnice 2 a 3, kde v přítomnosti molekulárního kyslíku ( $O_2$ ) je oxidován  $L^\bullet$  a vzniká peroxylový radikál ( $LOO^\bullet$ ).

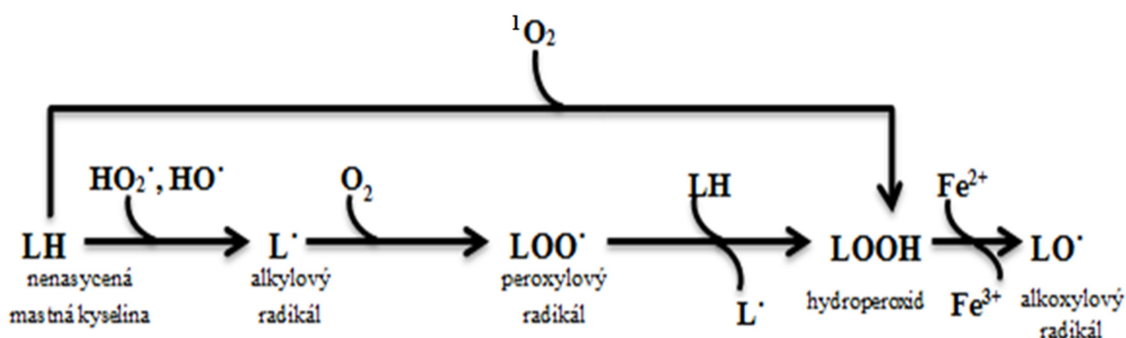


Velice reaktivní  $LOO^\bullet$  také napadá ostatní molekuly nenasycených mastných kyselin. Odjímá jim atom vodíku a sám se stává hydroperoxidem ( $LOOH$ ) za vzniku dalšího  $L^\bullet$  a tak postupuje propagační fáze do doby, než radikály zreagují s jinými volnými radikály (rekombinaci) nebo antioxidanty a dojde k ukončení řetězové reakce, neboli k terminaci, rovnice 4 a 5 (Venkataraman a kol. 2004).





Primárním produktem peroxidace lipidů jsou LOOH (Yu 1994). Vznikají tím, že volné radikály odebírají atom vodíku z methylenové skupiny nenasycených mastných kyselin a v průběhu těchto procesů dochází k oxidaci na výsledný LOOH (Girotti 1998). K lepšímu pochopení tvorby meziproduktů této řetězové reakce pomůže Obrázek 5. Přeměna LOOH na LOO<sup>•</sup> a alkoxylový radikál (LO<sup>•</sup>) je umožněna především volnými ionty kovů, jako je železo a měď. Tyto ionty buď LOOH oxidují na LOO<sup>•</sup> anebo redukují na LO<sup>•</sup> (Aust a kol. 1985).



Obrázek 5.: Schéma řetězové reakce při lipidové peroxidaci

## 2.2.2 Enzymatická

Je nutné dodat, že doposud jsme se bavili pouze o lipidové peroxidaci neenzymatické, což je nekontrolovatelný proces. Je zde však i druhá varianta a tou je enzymatická peroxidace, která slouží k produkci biologicky aktivních látek, významných při regulaci buněčných procesů, jako například prostaglandiny a leukotrieny. Enzymatická peroxidace je typická pro širokou škálu buněk. K tomuto účelu slouží enzym lipoxygenáza (Girotti 1998).

Lipoxygenáza je multifukční enzym, který katalyzuje začlenění molekulárního kyslíku do řetězce mastné kyseliny a tím vytváří LOOH. Dále převádí LOOH na hydroxy mastné kyseliny, ze kterých následně vznikají leukotrieny. Lipoxygenáza iniciuje peroxidace lipidů odebráním vodíkového protonu mastné kyselině LH. Vzniká tak L<sup>•</sup>, který je oxidován O<sub>2</sub> na LOO<sup>•</sup>, poté je následně zpátky přijat vodíkový atom, za vzniku

primárního produktu LOOH (Brash 1999). Lipoxygenáz je více typů například 5- LOX a 9- LOX. Tato značení nám dávají informaci, na kterém uhlíku je lipoxygenáza enzymaticky funkční.

Jednou z možností, jak zabránit postupující peroxidaci lipidů je použití enzymu glukóza oxidáza. Tento enzym převádí glukózu na glukonolakton při spotřebě O<sub>2</sub>, rovnice (6). Jako další produkt vzniká H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Díky odstranění O<sub>2</sub> neprobíhá propagační fáze peroxidace, jelikož se radikály neoxidují. Tento enzym našel široké využití jako konzervant různých typů výrobků, ale také díky němu můžeme stanovit množství glukózy například z krve (Sandip a kol. 2009)



### 2.2.3 Antioxidanty

Jak již bylo zmíněno, peroxidace lipidů může být ukončena antioxidanty. Antioxidanty jsou látky různé chemické struktury, zabraňující oxidativnímu poškození. Mohou být syntetizovány v organizmech, přijímány potravou nebo syntetizovány chemicky (Halliwell a Gutteridge 1999). Dělíme je na enzymatické antioxidanty (superoxid dismutáza, glutathion peroxidáza a kataláza) a neenzymatické antioxidanty (L-askorbát,  $\alpha$ -tokoferol, glutathion, propyl galát, karotenoidy, flavonoidy a jiné antioxidanty), (Valko a kol. 2007).

Kataláza je enzym složený ze čtyř hemových skupin, který snižuje množství H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Kataláza katalyticky přeměňuje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na vodu a O<sub>2</sub>, čímž předchází vzniku HO• a většímu poškození membrán, rovnice 7. Funguje i při vysokých koncentracích H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a tím se odlišuje od peroxidáz (Piterková a kol. 2005).



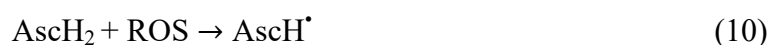
$\alpha$ -Tokoferol (derivát vitamínu E) eliminuje cyklicky vznikající LOO•.  $\alpha$ -Tokoferol odštěpuje svůj vodíkový atom a předá jej LOO•, za tvorby LOOH a  $\alpha$ -tokoferolového radikálu ( $\alpha$ -TO•), rovnice 8.



Následně mezi vzniklým  $\alpha\text{-TO}^\bullet$  a dalším  $\text{LOO}^\bullet$  dochází k terminační reakci za vzniku neradikálových produktů  $\text{LOOH}$  a  $\alpha\text{-tokoferolchinonu}$  ( $\alpha\text{-TOQ}$ ), rovnice 9 (Píterková a kol. 2005).



L-askorbát je univerzální antioxidant, je schopen působit na celou škálu volných radikálů. Přímou redukuje organické i anorganické radikály. Redukuje superoxidový aniontový radikál a  $\text{HO}^\bullet$ , reaguje se singletním kyslíkem a převádí  $\text{H}_2\text{O}_2$  na vodu (Halliwell a Gutteridge 1999). Reakcí L-askorbátu ( $\text{AscH}_2$ ) s ROS vzniká radikál monodehydroaskorbátu ( $\text{AscH}^\bullet$ ), rovnice 10.



Takto vzniklý  $\text{AscH}^\bullet$  reaguje s dalším  $\text{AscH}^\bullet$  za vzniku  $\text{AscH}_2$  a dehydroaskorbátu (DHA), rovnice 11.

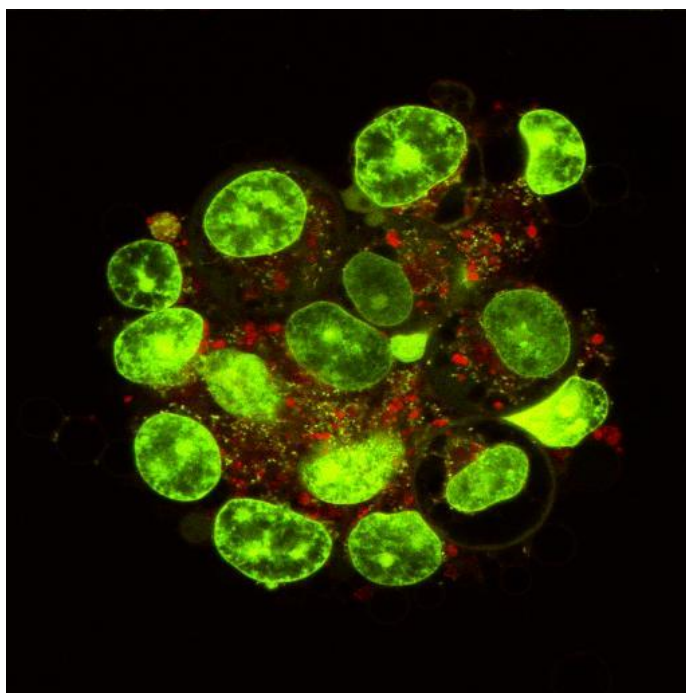


Propyl galát je synteticky vyráběný antioxidant, tělo si jej tedy nesyntetizuje ani jej není nutné přijímat potravou. Je však používán jako jeden z vitamínů E. Značí se jako vitamín E310. Má široké využití jako konzervant látek (Widengren a kol. 2007).

## 2.3 Buňky A2780

Buněčná linie A2780 lidského ovariálního karcinomu (Obrázek 6). Je široce používána jako modelová buněčná linie, především ve výzkumech cytotoxických látek a genetických studií rakovin. Buněčná linie A2780 byla získána z neošetřeného pacienta, která je stále uchovávána u doktora T. J. Warda v Cell Culture Unit v Manchesteru. Charakteristické pro buněčnou linii A2780 je jejich sedimentace a přichycení ke stěně kultivačních lahví, kde rostou jako jednovrstvý povlak na stěně nádoby. Ideální teplota pro kultivaci je  $37^\circ\text{C}$  s přidavkem 5%  $\text{CO}_2$ .

Informace převzaty z <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/93112519?lang=en&region=CZ&clid=Cj0KEQjw2sO3BRD49zdzfb8iLwBEiQAFZgZfLDeewJs7HgD8hLOjQNLDEqLwqpq7F5V0dFSDNz0BIwaAiqa8P8HAQ>



**Obrázek 6.:** Konfokální obraz buněk A2780 fluorescenčně značené Pt(II) převzato z [http://sydney.edu.au/science/chemistry/~hamble\\_t/anticanceragents.html](http://sydney.edu.au/science/chemistry/~hamble_t/anticanceragents.html)

## 2.4 Elektronová paramagnetická rezonance

Elektronová paramagnetická rezonance, EPR, je nejlepší metoda v detekci volných radikálů, jelikož jednoznačně detekuje látky, obsahující nepárové elektrony (mezi tyto látky také patří paramagnetické ionty přechodných kovů). Její velkou výhodou je schopnost měřit i při velmi nízkých koncentracích. Metoda EPR je schopna poskytnout informace o lokalizaci nepárového elektronu a umístění jeho aktivního centra (Buettner 1987).

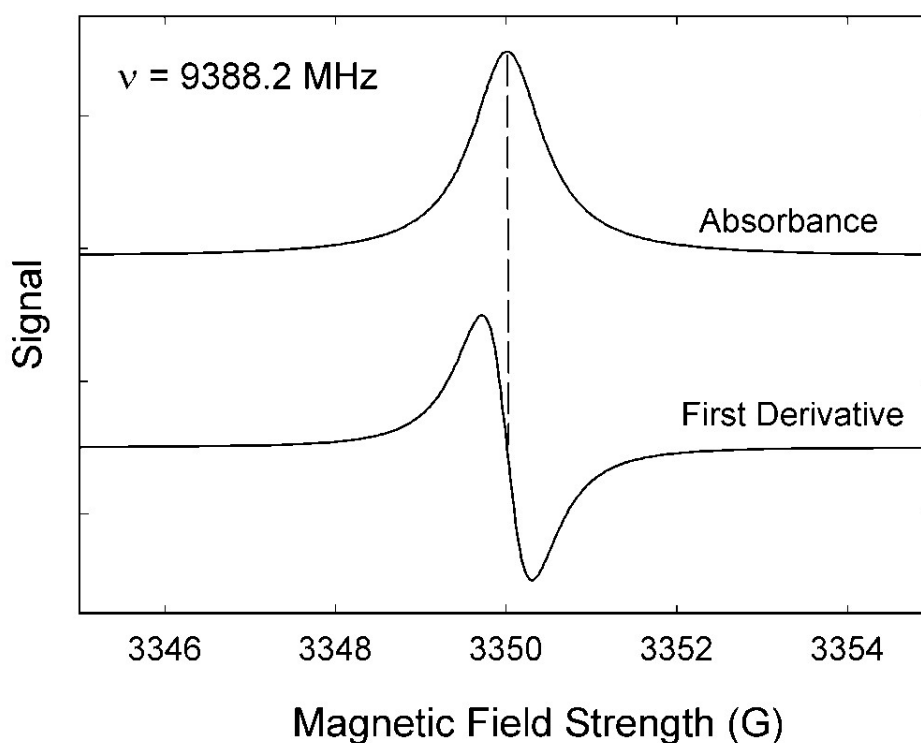
První zmínky této techniky byly v době ještě před 2. Světovou válkou. V biologických aplikacích se ale uplatnila později a to přibližně před 50 lety (Berliner 2016). Celá tato metoda je založena na Zeemanově jevu, při kterém dochází k rozštěpení energetických hladin z důvodu umístění molekul ve vnějším magnetickém poli.

## 2.4.1 Princip

Pro práci se používá EPR spektrometr, který se skládá z mikrovlnného zdroje (klystronu, nebo Gunnova oscilátoru), otvoru pro vložení vzorku, kde se vkládá skleněná nebo křemenná kapilára. Dále se skládá z mikrovlnného detektoru a silného elektromagnetu, kterým je možné měnit magnetické pole v rozsahu 0,3 T. Jednotka magnetické indukce je u EPR signálu udávána buď v mT, nebo v G. Přepočítání mezi těmito jednotkami ukazuje rovnice 12.

$$1 \text{ mT} = 10 \text{ G.} \quad (12)$$

EPR spektrum dostaneme záznamem absorpce mikrovlnného záření v závislosti na velikosti magnetického pole. U EPR spektrometrie je zajímavý zvláštní vzhled spektra. Spektra jsou zaznamenávána pomocí první derivace, jelikož je detekční technika citlivá na směrnici přímky odezvy detektoru (Obrázek 7), (Atkins 2013).



**Obrázek 7.:** Ukázka signálu z elektronové paramagnetické resonance a jeho záznam pomocí první derivace. Převzato z [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/21/EPR\\_lines.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/21/EPR_lines.png)

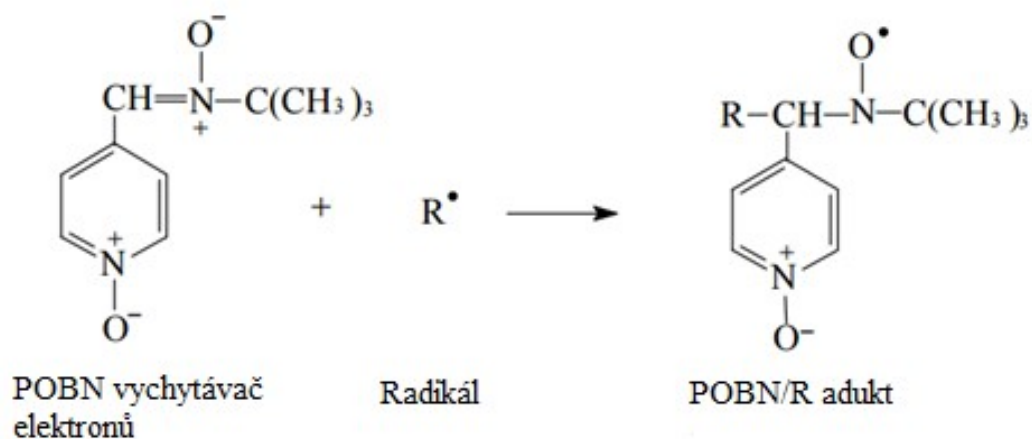
EPR spektrometrie je svým principem podobná nukleární magnetické rezonanci, liší se ale detekcí spinu. Zatímco EPR metodou detekujeme elektronový spin, nukleární magnetickou rezonancí detekujeme jaderný spin, liší se taky aplikacemi i technickým vybavením. Nepárový elektron se chová jako magnet a reaguje tedy s vnějším magnetickým polem.

## 2.4.2 Spin trapping

Spin trapping je nedílnou součástí práce při měření volných radikálů EPR spektrometrií. Doba života volných radikálů mohou být řádově milisekundy, mikrosekundy, ale i nanosekundy, je proto nutné přechod z radikálové formy nějak pozastavit, k tomu právě slouží sloučeniny nazývané vycytávače elektronů, které už mají relativně dlouhou dobu života (minuty až hodiny). Vycytávače elektronů tvoří s radikály kovalentní vazbu tzv. spin adukty, které jsou tedy stabilní a měřitelné EPR spektrometrem. Vycytávače elektronů jsou specifické pro různé typy radikálu, proto jich je více druhů jako například PBN (alpha-phenyl N-tertiary-butylnitron), POBN, DMPO (5,5-dimethylpyrroline-1-oxid), EMPO (5-(ethoxycarbonyl)-5-methyl-1-pyrrolin N-oxid), BMPO (5-tert-butoxycarbonyl 5-methyl-1-pyrroline N-oxid) a jiné (Qian a kol. 2000).

### 2.4.2.1 Spektra aduktů lipidových radikálů s vycytávačem elektronů POBN

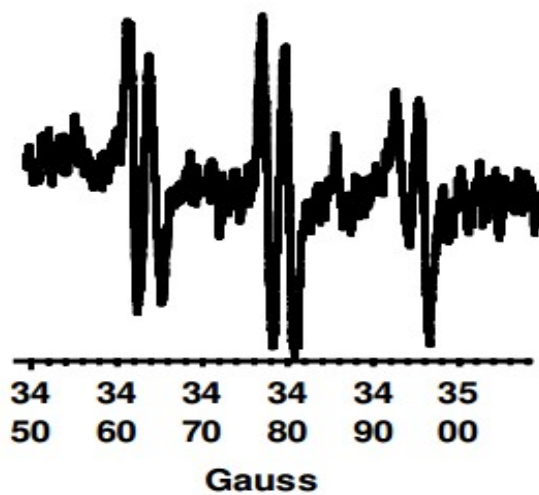
Vycytávač elektronů POBN je schopný detekovat organické radikály ( $R^\bullet$ ), nejlépe z nich detekuje lipidové radikály s nepárovým elektronem na uhlíku například  $L^\bullet$  (Halliwell a Gutteridge 1999). Doba života POBN/L aduktů mohou být hodiny až dny. Vycytávač elektronů POBN je schopen detekovat i radikály s nepárovým elektronem na kyslíku, například  $HO^\bullet$ , ale jejich doba života je velmi krátká například u aduktu POBN/OH je po 10 sekundách počet radikálů poloviční (Venkataram a kol. 2004). Jakým způsobem volné radikály reagují s POBN je znázorněno na Obrázku 8.



**Obrázek 8.:** Reakce vycytávače elektronů POBN s volným radikálem. Vzniká časově stabilnější adukt detekovatelný pomocí elektronové paramagnetické rezonance. Upraveno a převzato z Xu a kol. 2012.

V porovnání s ostatními vycytávači elektronů má POBN vysokou vycytávací schopnost a uspokojivou rozpustnost v biologických médiích. Je vhodný k detekci volných radikálů vytvořených peroxidací lipidů *in vitro* i *in vivo* (Xu a kol. 2012).

Hlavním nedostatkem vycytávače elektronů POBN je, že jeho adukty při peroxidaci lipidů mají velmi podobné štěpící konstanty ( $a^{\text{N}} \approx 14,4 - 16,1 \text{ G}$  a  $a^{\text{H}} \approx 2,2 - 2,8 \text{ G}$ ), (Xu a kol. 2012), těmi se charakterizují signály získané pomocí EPR. Štěpící konstanty jsou si podobné, protože je nejvíce ovlivňuje přítomnost atomu dusíku a vodíku. Naproti tomu, typ radikálu ovlivňuje štěpící konstanty jen v malé míře. Kvůli podobnosti štěpících konstant nelze snadno rozlišit jednotlivé spektra signálu lipidových radikálů (Boveris a kol. 2000). Ze spekter signálu z EPR (Obrázek 9) je možné určit množství volných radikálů, ale i o jaký radikál se jedná. Určení typu radikálu ve vzorku je snazší, pokud se detekuje pouze jeden volný radikál (Venkataram a kol. 2004).



**Obrázek 9.:** EPR spektrum typického volného radikálu s nepárovým elektronem na uhlíku (Venkataram a kol. 2004).



## **3. Praktická část**

### **3.1 Materiál metody**

#### **3.1.1 Chemikálie**

médium RPMI 1640 s antibiotiky, trypanová modř, trypsin, kataláza,  $\alpha$ -tokoferol, L-askorbát, propyl galát, POBN,  $H_2O_2$ ,  $FeSO_4$ , glukóza, glukóza oxidáza.

#### **3.1.2 Přístrojové vybavení**

Laminární box s vertikálním prouděním vzduchu, automatické pipety, analytické váhy, automatický počítač buněk, inkubátor atmosféry  $CO_2$ , EPR spektrometr Miniscope MS 400 (Magnettech, Berlín, Německo), vortex, chladicí box a mrazicí box.

#### **3.1.3 Biologický materiál**

Buněčná linie A2780 byla kultivovaná při teplotě 37 °C a při 5%  $CO_2$  atmosféře. Pro kultivaci bylo použito médium RPMI-1640 s antibiotiky.

#### **3.1.4 Příprava biologického materiálu**

Přisedavé buňky A2780 je nutné oddělit od povrchu. Pro přípravu vezmeme zásobní nádobu s buňkami do laminárního boxu a odlijeme kultivační médium do odpadní láhve. Přidáme 3 ml trypsinu, který naruší proteiny na povrchu buněk a uvolní je z povrchu nádoby. Po třech minutách účinkování trypsinu přidáme 3 ml média RPMI-1640

s antibiotiky. Nyní máme 6 ml roztoku média s uvolněnými buňkami a můžeme opustit laminární box.

### **3.1.5 Určení počtu buněk**

K určení počtu buněk použijeme počítací buněk. Smícháme 10  $\mu\text{l}$  buněčného suspenze a 10  $\mu\text{l}$  trypanové modři, takto připravenou směs nanese na speciální destičku, kterou vložíme do počítací buněk. Výsledek se zobrazí na displeji přístroje. Za dostatečný počet buněk jsme zvolili 1 000 000 buněk na 1 ml.

### **3.1.6 Měření signálu hydroxylového radikálu**

První měření jsme ověřovali vznik  $\text{HO}^\bullet$ . To probíhalo čistě na chemickém systému bez buněk. Hydroxylový radikál vzniká tzv. Fentonovou reakcí. Výsledný objem kapilár pro měření na přístroji EPR je 30  $\mu\text{l}$ . K 18  $\mu\text{l}$  destilované vody přidáme 5  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (o výsledné koncentraci 41,6 mM) a 1  $\mu\text{l}$   $\text{FeSO}_4$  (o výsledné koncentraci 8,3 mM). Následně ještě přidáme 6  $\mu\text{l}$  POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). Před měřením roztok promícháme na vortexu a nanese do kapiláry pro měření na EPR.

### **3.1.7 Měření signálů organických radikálů**

Při tomto měření necháme  $\text{HO}^\bullet$  reagovat s buňkami. K 17  $\mu\text{l}$  roztoku buněk v médiu přidáme 5  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (o výsledné koncentraci 41,6 mM) a 1  $\mu\text{l}$   $\text{FeSO}_4$  (o výsledné koncentraci 8,3 mM). Nyní roztok promícháme na vortexu a necháme jej 15 minut inkubovat v ledu. Po uplynutí doby inkubace přidáme 1  $\mu\text{l}$  katalázy (10 jednotek). Následně ještě přidáme 6  $\mu\text{l}$  POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). Před měřením roztok promícháme na vortexu a nanese do kapiláry pro měření na EPR.

Další měření spočívá v použití antioxidantů, které by měly přispět k lepší charakterizaci R<sup>•</sup>. K 14  $\mu$ l roztoku buněk v médiu přidáme 5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (o výsledné koncentraci 41,6 mM) a 1  $\mu$ l FeSO<sub>4</sub> (o výsledné koncentraci 8,3 mM). Nyní roztok promícháme na vortexu a necháme jej 15 minut inkubovat v ledu. Po uplynutí doby inkubace přidáme 1  $\mu$ l katalázy (10 jednotek). V tomto okamžiku přidáváme 3  $\mu$ l antioxidantu (vždy o výsledné koncentraci 50  $\mu$ M). Jako antioxidanty používáme  $\alpha$ -tokoferol, L-askorbát a propyl galát. Pro měření vždy používáme pouze jeden z těchto antioxidantů. Následně ještě přidáme 6  $\mu$ l POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). Před měřením roztok promícháme na vortexu a nanese do kapiláry pro měření na EPR spektrometru.

Poslední použitá metoda spočívala v zamezení oxidačních procesů, tudíž v odstranění O<sub>2</sub> z roztoku. K tomu využijeme enzym glukóza oxidáza. K 8  $\mu$ l roztoku buněk v médiu přidáme 1  $\mu$ l FeSO<sub>4</sub> (o výsledné koncentraci 8,3 mM), následně přidáme 3  $\mu$ l glukózy (o výsledné koncentraci 5  $\mu$ M) a 3  $\mu$ l glukóza oxidázy (8 jednotek). Až nyní přidáváme 5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (o výsledné koncentraci 41,6 mM), následně roztok promícháme na vortexu a necháme jej 15 minut inkubovat v ledu. Po uplynutí doby inkubace přidáme 1  $\mu$ l katalázy (10 jednotek). Následně ještě přidáme 6  $\mu$ l POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). Před měřením roztok promícháme na vortexu a nanese do kapiláry pro měření na EPR.

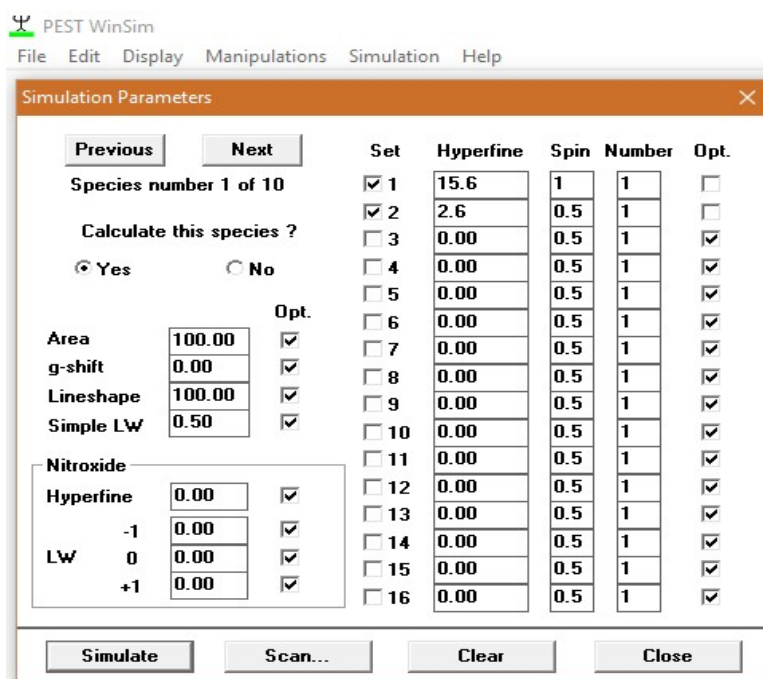
### **3.1.8 Způsob měření na EPR spektrometru pomocí programu Miniscope Control**

Použitý EPR spektrometr je schopen měřit v rozsahu 50 až 450 mT. Tento EPR spektrometr má vysokou citlivost a umí tedy detekovat i  $8 \cdot 10^9$  jednotek spinů za 0,1 mT. EPR spektrometr je propojen s počítačem, který se nachází ve stejné místnosti. V místnosti je pokojová teplota a běžné osvětlení. EPR spektrometr je ovládán programem Miniscope Control (verze 6.51). Před samotným měřením je třeba nastavit parametry. B<sub>0</sub>-field nastavíme na 335,781 mT, hodnotu sweep 8,95 mT, sweep time na 60 sekund. Po nastavení hodnot použijeme v programu tlačítko „Apply parameters“, tím se nastaví zadané hodnoty. V tento okamžik vkládáme kapiláru se vzorkem do otvoru pro ni určený.

Po umístění vzorku použijeme v programu tlačítko „MW Adjust“. Tím se najde rezonanční podmínka a my jsme schopni začít měřit pomocí tlačítka „Start“. Přístroj zaznamená 4096 dat, ty vyexportujeme a následně zpracujeme do grafů.

### 3.1.9 Simulace EPR signálů

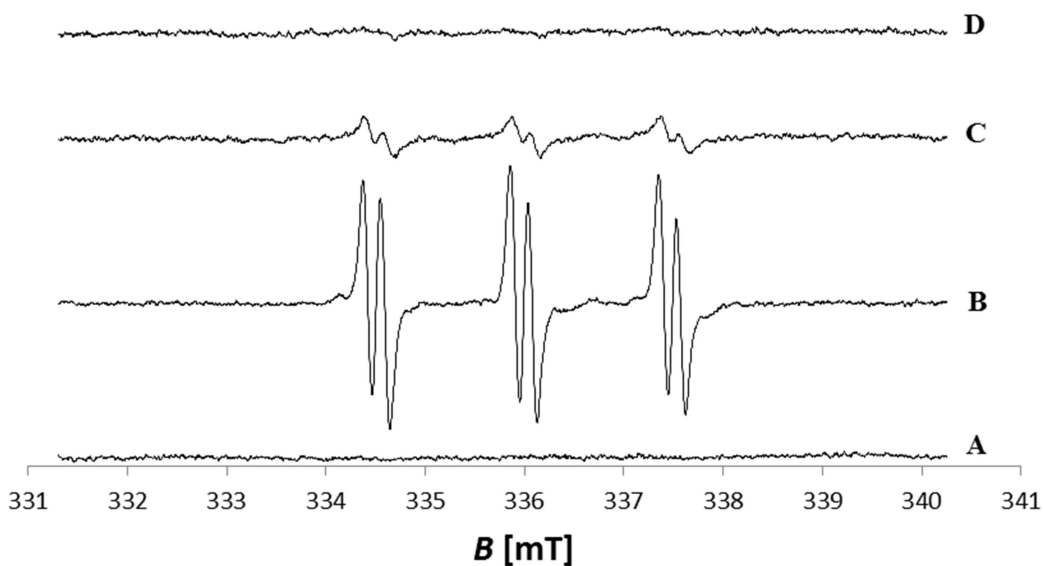
Simulace signálů probíhala v programu WINSIM. Program můžeme vidět na Obrázku 10. V programu zadáváme parametry do okna „Parameters“. Pro simulaci signálů je nutné znát štěpící konstanty radikálu, který bychom rádi simulovali. Štěpící konstanty zadáme do políčka „Hyperfine“ a označíme funkcí „Set“, a tím je zahrneme do simulace. Upravíme kolonku „Spin“ podle spinu prvku, který daný radikál ovlivňuje. Pro POBN je to například pro dusík 1 a vodík 0,5. Označíme „Yes“ u funkce „Calculate this species?“. Nyní spustíme simulaci pomocí „Simulate“. V programu si otevřeme vyexportovaná data z měření. Nyní zvolíme funkci „Optimize“, která nám bude měnit „g-shift“ a „Simple LW“ a tím se co nejvíce přiblíží našemu naměřenému signálu. Poté už jen vyexportujeme data a vyhodnotíme v programu Microsoft Excel.



Obrázek 10.: Program WINSIM a ukázka zadaných parametrů pro simulování spekter volných radikálů.

## 3.2 Výsledky

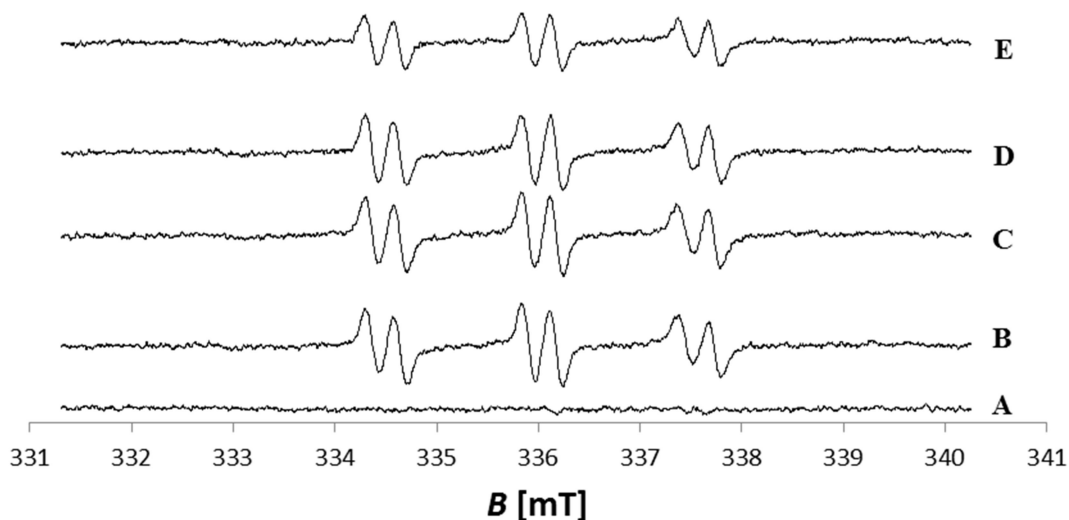
Byl detekován  $\text{HO}^\bullet$  vytvořený Fentonovou reakcí pomocí EPR spektroskopie za použití vychytávače elektronů POBN. Obrázek 11 ukazuje EPR spektra POBN/OH aduktu vzniklý přidáním  $\text{H}_2\text{O}_2$  a dvojmocného železa. Signál dvojmocného železa s vychytávačem elektronů POBN bez  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Měřili jsme po 10 min od smíchání reagensů (A). Pozorujeme vysokou intenzitu spektra POBN/OH, reakce dvojmocného železa s  $\text{H}_2\text{O}_2$ , přidán vychytávač elektronů POBN. Měřili jsme po 10 min od smíchání reagensů. Výsledné spektrum je triplet dubletů a jeho píky mají téměř stejnou velikost. (B). Nízká intenzita spektra POBN/OH, reakce dvojmocného železa s  $\text{H}_2\text{O}_2$  a s katalázou, přidán vychytávač elektronů POBN. Měřili jsme okamžitě po smíchání reagensů. Výsledné spektrum je triplet dubletů a jeho píky mají téměř stejnou velikost. (C). Utlušený signál POBN/OH, reakce dvojmocného železa s  $\text{H}_2\text{O}_2$  a s katalázou, přidán vychytávač elektronů POBN. Měřili jsme po 2 min od smíchání reagensů (D).



**Obrázek 11.:** EPR spektrum s vychytávačem elektronů POBN, radikál produkovaný Fentonovou reakcí. (A) Signál pozadí, za který jsme zvolili destilovanou vodu a přidali  $\text{FeSO}_4$  (o výsledné koncentraci 8,3 mM) a POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). (B) Signál  $\text{HO}^\bullet$  vznikající s Fentonovy reakce. Měřeno po 10 minutách od smísení  $\text{H}_2\text{O}_2$  (o výsledné koncentraci 41,6 mM),  $\text{FeSO}_4$  (o výsledné koncentraci 8,3 mM) a POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). Měření proběhlo po 10 minutách od smíchání výše uvedených reagensů. (C) Ukázka utlumení signálu  $\text{HO}^\bullet$  vznikající s Fentonovy reakce pomocí katalázy. Měřeno okamžitě po smísení  $\text{H}_2\text{O}_2$  (o výsledné koncentraci 41,6 mM),  $\text{FeSO}_4$  (o výsledné koncentraci 8,3 mM), kde jsme následně přidali katalázu (10 jednotek)

a POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). **(D)** Ukázka utlumení signálu HO• vznikající s Fentonovy reakce pomocí katalázy. Měřeno po 2 minutách od smísení H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (o výsledné koncentraci 41,6 mM), FeSO<sub>4</sub> (o výsledné koncentraci 8,3 mM), kde jsme následně přidali katalázu (10 jednotek) a POBN (o výsledné koncentraci 50 mM).

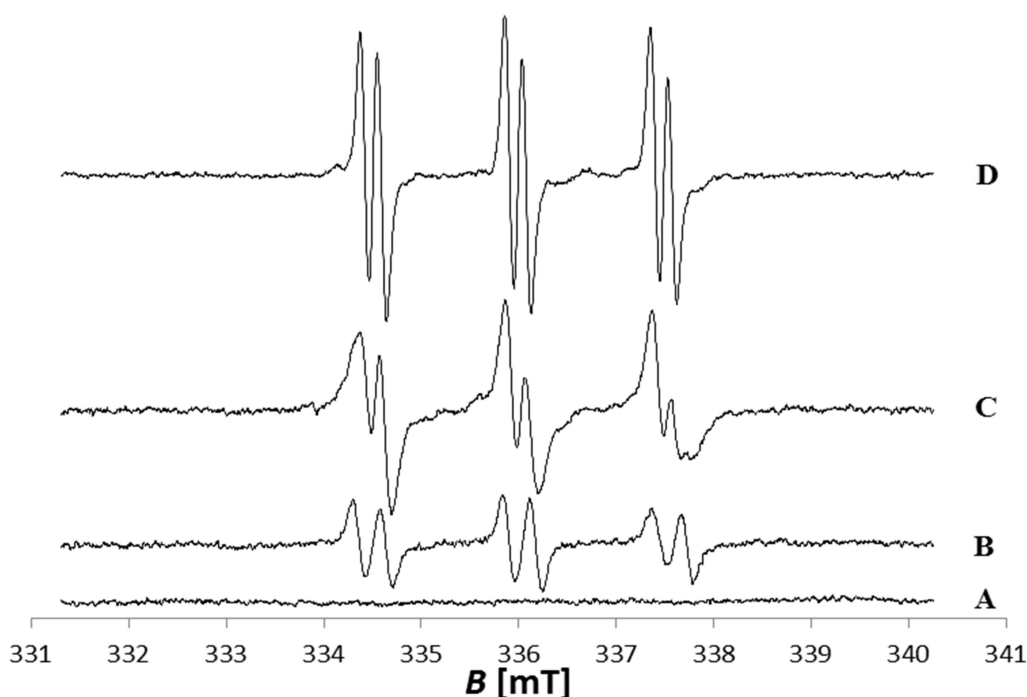
Byl detekován R• pomocí EPR spektrometrie za použití vychytávače elektronů POBN. Obrázek 12 ukazuje EPR spektra POBN/R aduktu vzniklý přidáním H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dvojmocného železa a katalázy do média s buňkami. Signál buněk v médiu po přidání dvojmocného železa s vychytávačem elektronů POBN bez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a bez katalázy. Měřili jsme po 10 min od smíchání reagensů (A). Pozorujeme spektrum POBN/R, reakce dvojmocného železa s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v médiu s buňkami, po 15 min inkubaci v ledu přidána kataláza a vychytávač elektronů POBN. Měřili jsme okamžitě po smíchání reagensů (B). Pozorujeme spektrum POBN/R, reakce dvojmocného železa s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v médiu s buňkami, po 15 min inkubaci v ledu přidána kataláza a vychytávač elektronů POBN. Měřili jsme okamžitě po smíchání reagensů. Měřili jsme po 10 min od smíchání reagensů (C). Pozorujeme spektrum POBN/R, reakce dvojmocného železa s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v médiu s buňkami, po 15 min inkubaci v ledu přidána kataláza a vychytávač elektronů POBN. Měřili jsme okamžitě po smíchání reagensů. Měřili jsme po 25 min od smíchání reagensů (D). Pozorujeme spektrum POBN/R, reakce dvojmocného železa s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v médiu s buňkami, po 15 min inkubaci v ledu přidána kataláza a vychytávač elektronů POBN. Měřili jsme okamžitě po smíchání reagensů. Měřili jsme po 45 min od smíchání reagensů (E). Tvary ani velikosti píků se v čase nemění. Výsledné spektra jsou triplet dubletů a jejich třetí dublet je zřetelně nejvyšší.



**Obrázek 12.:** EPR spektrum s vychytávačem elektronů POBN, radikál produkován Fentonovou reakcí. **(A)** Signál pozadí, za který jsme zvolili buňky A2780 v médiu a přidali POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). **(B)** signál z buněk v médiu po přidání  $H_2O_2$  (o výsledné koncentraci 41,6 mM),  $FeSO_4$  (o výsledné koncentraci 8,3 mM), kde jsme po 15 minutové inkubaci v ledu přidali katalázu (10 jednotek) a POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). Měření proběhlo okamžitě po smíchání výše uvedených reagensů. **(C)** signál z buněk v médiu po přidání  $H_2O_2$  (o výsledné koncentraci 41,6 mM),  $FeSO_4$  (o výsledné koncentraci 8,3 mM), kde jsme po 15 minutové inkubaci v ledu přidali katalázu (10 jednotek) a POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). Měření proběhlo po 10 minutách od smíchání výše uvedených reagensů. **(D)** signál z buněk v médiu po přidání  $H_2O_2$  (o výsledné koncentraci 41,6 mM),  $FeSO_4$  (o výsledné koncentraci 8,3 mM), kde jsme po 15 minutové inkubaci v ledu přidali katalázu (10 jednotek) a POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). Měření proběhlo po 25 minutách od smíchání výše uvedených reagensů. **(E)** signál z buněk v médiu po přidání  $H_2O_2$  (o výsledné koncentraci 41,6 mM),  $FeSO_4$  (o výsledné koncentraci 8,3 mM), kde jsme po 15 minutové inkubaci v ledu přidali katalázu (10 jednotek) a POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). Měření proběhlo po 45 minutách od smíchání výše uvedených reagensů.

Obrázek 13 ukazuje EPR spektra POBN/R a POBN/OH aduktů. Tvary i velikosti píků se navzájem liší. Signál buněk v médiu po přidání dvojmocného železa s vychytávačem elektronů POBN bez  $H_2O_2$  a bez katalázy. Měřili jsme po 10 min od smíchání reagensů (A). Pozorujeme spektrum POBN/R, reakce dvojmocného železa s  $H_2O_2$  v médiu s buňkami, po 15 min inkubaci v ledu přidána kataláza a vychytávač elektronů POBN. Měřili jsme po 10 min od smíchání reagensů. Výsledné spektrum je triplet dubletů a jeho třetí dublet je zřetelně nejvyšší (B). Pozorujeme překryté spektra

POBN/R a POBN/OH, reakce dvojmocného železa s  $H_2O_2$  v médiu s buňkami, po 15 min inkubaci v ledu jsme přidali vychytávač elektronů POBN. Nebyla zde přidána kataláza. Měřili jsme po 10 min od smíchání reagensů. Výsledné spektrum je triplet dubletů a jeho píky jsou nepravidelné. (C). Pozorujeme vysokou intenzitu spektra POBN/OH, reakce dvojmocného železa s  $H_2O_2$ , přidán vychytávač elektronů POBN. Měřili jsme po 10 min od smíchání reagensů. Výsledné spektrum je triplet dubletů a jeho píky mají téměř stejnou velikost (D).

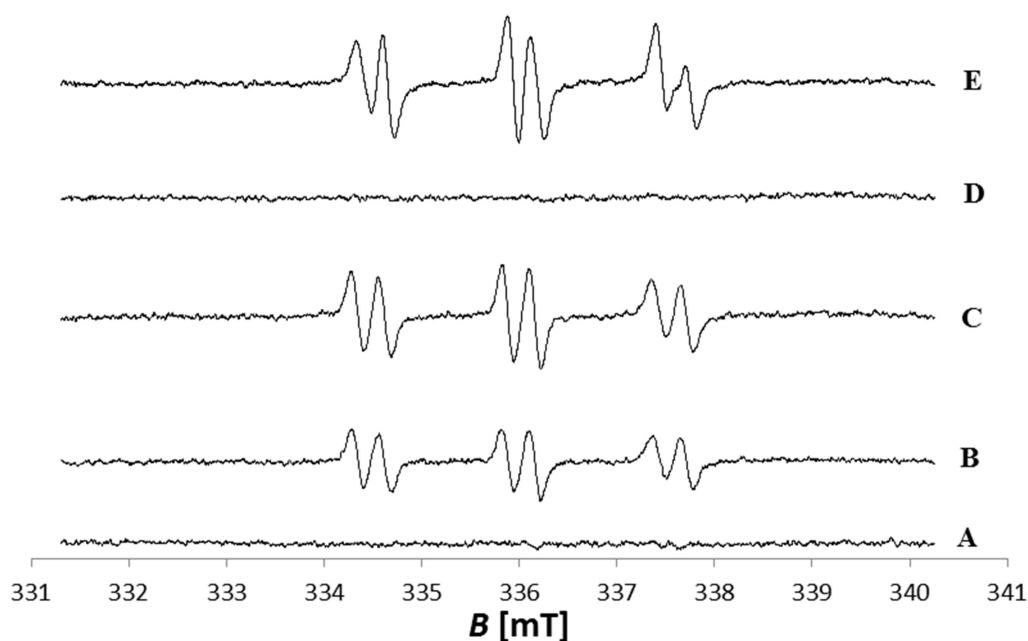


**Obrázek 13.:** EPR spektrum s vychytávačem elektronů POBN, radikál produkován Fentonovou reakcí. (A) Signál pozadí, za který jsme zvolili buňky A2780 v médiu a přidali POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). (B) Signál z buněk v médiu po přidání  $H_2O_2$  (o výsledné koncentraci 41,6 mM),  $FeSO_4$  (o výsledné koncentraci 8,3 mM), kde jsme po 15 minutové inkubaci v ledu přidali katalázu (10 jednotek) a POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). Měření proběhlo okamžitě po smíchání výše uvedených reagensů. (C) Signál z buněk v médiu po přidání  $H_2O_2$  (o výsledné koncentraci 41,6 mM),  $FeSO_4$  (o výsledné koncentraci 8,3 mM), kde jsme po 15 minutové inkubaci v ledu přidali POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). Měření proběhlo po 10 minutách od smíchání výše uvedených reagensů. (D) Signál  $HO^\bullet$  vznikající s Fentonovy reakce. Měřeno po 10 minutách od smísení  $H_2O_2$  (o výsledné koncentraci 41,6 mM),  $FeSO_4$  (o výsledné koncentraci 8,3 mM) a POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). Měření proběhlo po 10 minutách od smíchání výše uvedených reagensů.

Obrázek 14 ukazuje EPR spektra POBN/R aduktu vzniklý přidáním  $H_2O_2$ , dvojmocného železa a katalázy do média s buňkami v kombinaci s antioxidanty. Signál



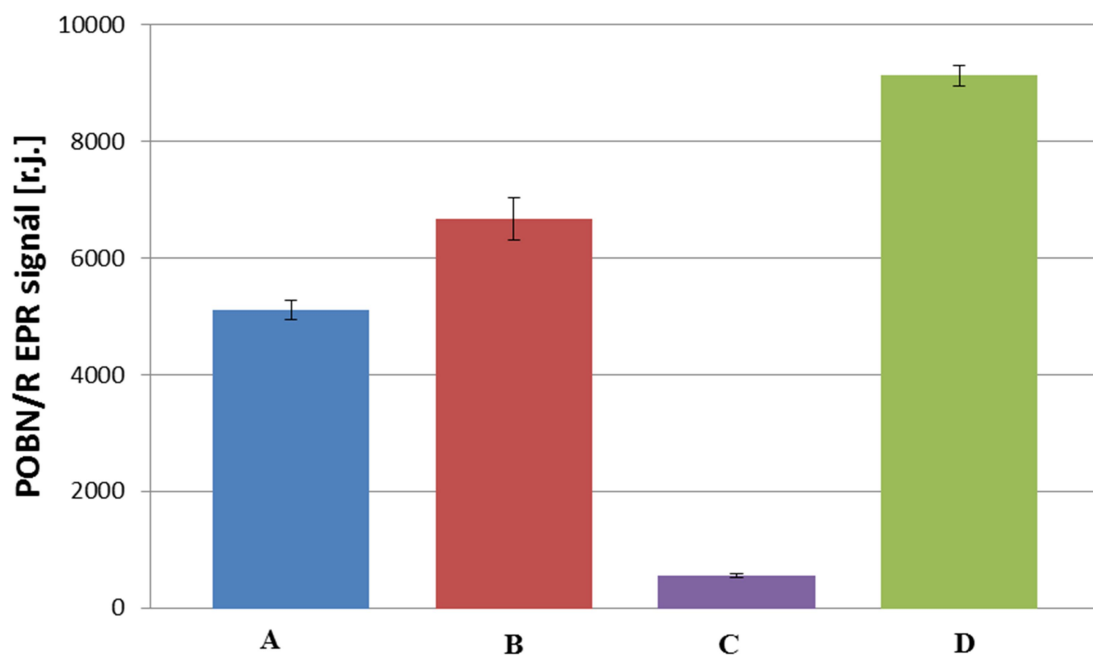
buněk v médiu po přidání dvojmocného železa s vychytávačem elektronů POBN bez  $\text{H}_2\text{O}_2$  a bez katalázy. Měřili jsme po 10 min od smíchání reagensů (A). Pozorujeme spektrum POBN/R, reakce dvojmocného železa s  $\text{H}_2\text{O}_2$  v médiu s buňkami, po 15 min inkubaci v ledu přidána kataláza a vychytávač elektronů POBN. Měřili jsme po 10 min od smíchání reagensů. Výsledné spektrum je triplet dubletů a jeho třetí dublet je zřetelně nejvyšší (B). Stejná příprava vzorku, ale před přidáním POBN jsme přidali antioxidant  $\alpha$ -tokoferol. Měřili jsme po 10 min od smíchání reagensů. Pozorujeme navýšení signálu v porovnání se vzorkem bez přidání antioxidantu. Výsledné spektrum je triplet dubletů a jeho třetí dublet je zřetelně nejvyšší (C). Stejná příprava vzorku, ale před přidáním POBN jsme přidali antioxidant L-askorbát. Měřili jsme po 10 min od smíchání reagensů. Pozorujeme úplný útlum signálu na úroveň signálu pozadí (D). Stejná příprava vzorku, ale před přidáním POBN jsme přidali antioxidant propyl galát. Měřili jsme po 10 min od smíchání reagensů. Pozorujeme navýšení signálu a změnu jeho tvaru v porovnání se vzorkem bez přidání antioxidantu. Výsledné spektrum je triplet dubletů (E).



**Obrázek 14.:** EPR spektrum s vychytávačem elektronů POBN, radikál produkovaný Fentonovou reakcí. **(A)** Signál pozadí, za který jsme zvolili buňky A2780 v médiu a přidali POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). **(B)** Signál z buněk v médiu po přidání  $\text{H}_2\text{O}_2$  (o výsledné koncentraci 41,6 mM),  $\text{FeSO}_4$  (o výsledné koncentraci 8,3 mM), kde jsme po 15 minutové inkubaci v ledu přidali katalázu (10 jednotek) a POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). Měření proběhlo po 10 minutách od smíchání výše uvedených reagensů. **(C)** Signál z buněk v médiu po přidání  $\text{H}_2\text{O}_2$  (o výsledné koncentraci 41,6 mM),  $\text{FeSO}_4$  (o výsledné koncentraci 8,3 mM), kde jsme po 15 minutové inkubaci v ledu přidali katalázu (10 jednotek),  $\alpha$ -tokoferol (o výsledné koncentraci 50  $\mu\text{M}$ ) a POBN (o výsledné

koncentraci 50 mM). Měření proběhlo po 10 minutách od smíchání výše uvedených reagensů. **(D)** Signál z buněk v médiu po přidání  $\text{H}_2\text{O}_2$  (o výsledné koncentraci 41,6 mM),  $\text{FeSO}_4$  (o výsledné koncentraci 8,3 mM), kde jsme po 15 minutové inkubaci v ledu přidali katalázu (10 jednotek), L-askorbát (o výsledné koncentraci 50  $\mu\text{M}$ ) a POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). Měření proběhlo po 10 minutách od smíchání výše uvedených reagensů. **(E)** Signál z buněk v médiu po přidání  $\text{H}_2\text{O}_2$  (o výsledné koncentraci 41,6 mM),  $\text{FeSO}_4$  (o výsledné koncentraci 8,3 mM), kde jsme po 15 minutové inkubaci v ledu přidali katalázu (10 jednotek), propyl galát (o výsledné koncentraci 50  $\mu\text{M}$ ) a POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). Měření proběhlo po 10 minutách od smíchání výše uvedených reagensů.

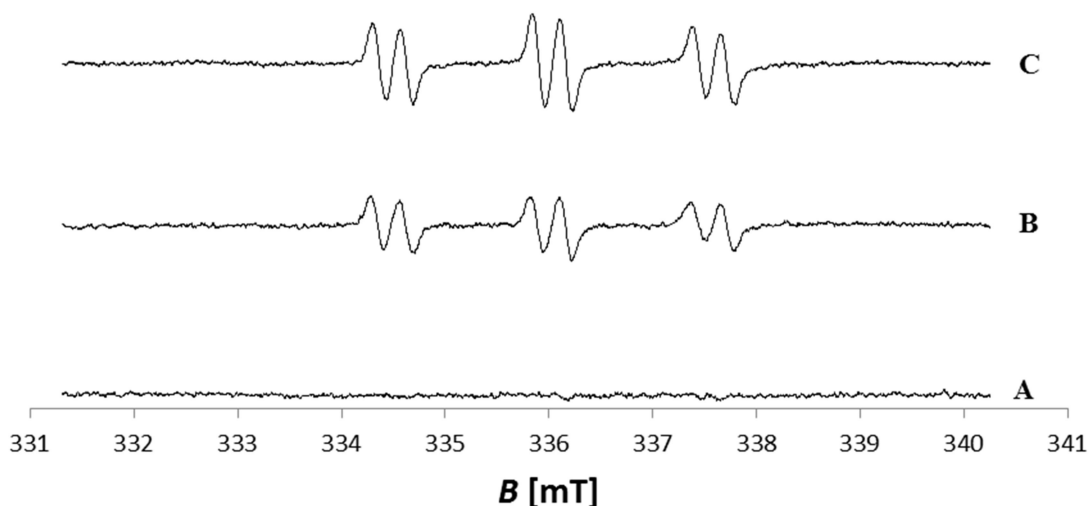
Obrázek 15 ukazuje velikosti intenzit spekter POBN/R vzniklý přidáním  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dvojmocného železa a katalázy do média s buňkami v kombinaci s antioxidanty. Pozorujeme velikost intenzity POBN/R, reakce dvojmocného železa s  $\text{H}_2\text{O}_2$  v médiu s buňkami, po 15 min inkubaci v ledu přidána kataláza a vychytávač elektronů POBN. Měřili jsme po 10 min od smíchání reagensů (A). Stejná příprava vzorku, ale před přidáním POBN jsme přidali antioxidant  $\alpha$ -tokoferol. Měřili jsme po 10 min od smíchání reagensů. Pozorujeme navýšení signálu o 30 % v porovnání se vzorkem bez přidání antioxidantu (B). Stejná příprava vzorku, ale před přidáním POBN jsme přidali antioxidant L-askorbát. Měřili jsme po 10 min od smíchání reagensů. Pozorujeme útlum signálu o 89 % v porovnání se vzorkem bez přidání antioxidantu (C). Stejná příprava vzorku, ale před přidáním POBN jsme přidali antioxidant propyl galát. Měřili jsme po 10 min od smíchání reagensů. Pozorujeme navýšení signálu o 78 % v porovnání se vzorkem bez přidání antioxidantu (D).



**Obrázek 15.:** Velikost EPR signálů organických radikálů produkovaných Fentonovou reakcí. Odečet hodnot byl proveden z prostředního dubletu. **(A)** Signál z buněk v médiu po přidání  $\text{H}_2\text{O}_2$  (o výsledné koncentraci 41,6 mM),  $\text{FeSO}_4$  (o výsledné koncentraci 8,3 mM), kde jsme po 15 minutové inkubaci v ledu přidali katalázu (10 jednotek) a POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). Měření proběhlo po 10 minutách od smíchání výše uvedených reagensů ( $n = 3, \pm \text{SD}$ ). **(B)** Signál z buněk v médiu po přidání  $\text{H}_2\text{O}_2$  (o výsledné koncentraci 41,6 mM),  $\text{FeSO}_4$  (o výsledné koncentraci 8,3 mM), kde jsme po 15 minutové inkubaci v ledu přidali katalázu (10 jednotek), tokoferol (o výsledné koncentraci 50  $\mu\text{M}$ ) a POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). Měření proběhlo po 10 minutách od smíchání výše uvedených reagensů ( $n = 3, \pm \text{SD}$ ). **(C)** Signál z buněk v médiu po přidání  $\text{H}_2\text{O}_2$  (o výsledné koncentraci 41,6 mM),  $\text{FeSO}_4$  (o výsledné koncentraci 8,3 mM), kde jsme po 15 minutové inkubaci v ledu přidali katalázu (10 jednotek), L-askorbát (o výsledné koncentraci 50  $\mu\text{M}$ ) a POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). Měření proběhlo po 10 minutách od smíchání výše uvedených reagensů ( $n = 3, \pm \text{SD}$ ). **(D)** Signál z buněk v médiu po přidání  $\text{H}_2\text{O}_2$  (o výsledné koncentraci 41,6 mM),  $\text{FeSO}_4$  (o výsledné koncentraci 8,3 mM), kde jsme po 15 minutové inkubaci v ledu přidali katalázu (10 jednotek), propyl galát (o výsledné koncentraci 50  $\mu\text{M}$ ) a POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). Měření proběhlo po 10 minutách od smíchání výše uvedených reagensů ( $n = 3, \pm \text{SD}$ ).

Obrázek 16 ukazuje EPR spektra POBN/R aduktu vzniklý přidáním  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dvojmocného železa a katalázy do média s buňkami v kombinaci s enzymem glukóza oxidázy. Signál buněk v médiu po přidání dvojmocného železa s vycytávačem elektronů POBN bez  $\text{H}_2\text{O}_2$  a bez katalázy. Měřili jsme po 10 min od smíchání reagensů (A). Pozorujeme spektrum POBN/R, reakce dvojmocného železa s  $\text{H}_2\text{O}_2$  v médiu s buňkami, po 15 min inkubaci v ledu přidána kataláza a vycytávač elektronů POBN.

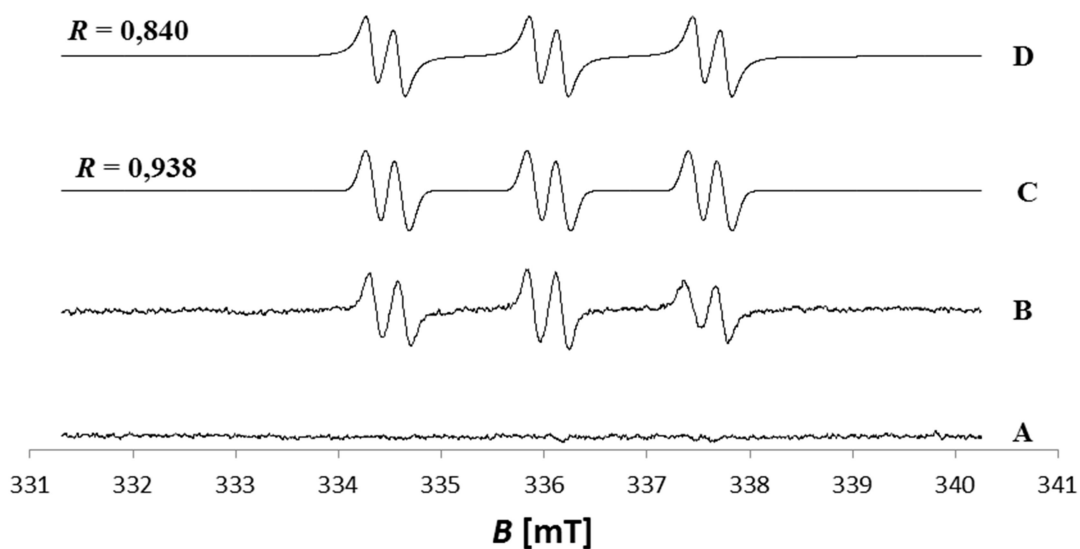
Měřili jsme po 10 min od smíchání reagensů. Výsledné spektrum je triplet dubletů a jeho třetí dublet je zřetelně nejvyšší (B). Pozorujeme spektrum POBN/R, reakci dvojmocného železa, glukózy, glukóza oxidázy a  $H_2O_2$  v médiu s buňkami, po 15 min inkubaci v ledu přidána kataláza a vychytávač elektronů POBN. Měřili jsme po 10 min od smíchání reagensů. Pozorujeme navýšení signálu, na rozdíl od vzorku bez glukózy a glukóza oxidázy. Výsledné spektrum je triplet dubletů a jeho třetí dublet je mírně nižší, než zbylé dva dublety (C).



**Obrázek 16.:** EPR spektrum s vychytávačem elektronů POBN, radikál produkovaný Fentonovou reakcí. **(A)** Signál pozadí, za který jsme zvolili buňky A2780 v médiu a přidali POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). **(B)** Signál z buněk v médiu po přidání  $H_2O_2$  (o výsledné koncentraci 41,6 mM),  $FeSO_4$  (o výsledné koncentraci 8,3 mM), kde jsme po 15 minutové inkubaci v ledu přidali katalázu (10 jednotek) a POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). Měření proběhlo po 10 minutách od smíchání výše uvedených reagensů. **(C)** Signál z buněk v médiu po přidání  $FeSO_4$  (o výsledné koncentraci 8,3 mM), glukózy (o výsledné koncentraci 5  $\mu$ M), glukózy oxidázy (8 jednotek) a  $H_2O_2$  (o výsledné koncentraci 41,6 mM). Poté jsme po 15 minutové inkubaci v ledu přidali katalázu (10 jednotek) a POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). Měření proběhlo po 10 minutách od smíchání výše uvedených reagensů.

Obrázek 17 ukazuje EPR spektra POBN/R aduktu vzniklý přidáním  $H_2O_2$ , dvojmocného železa a katalázy do média s buňkami. Dále pak jsou na Obrázku 17 vyobrazena simulovaná spektra POBN/L a POBN/OOL aduktů. Signál buněk v médiu po přidání dvojmocného železa s vychytávačem elektronů POBN bez  $H_2O_2$  a bez katalázy.

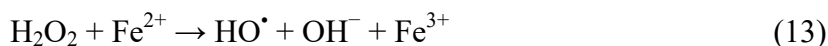
Měřili jsme po 10 min od smíchání reagensů (A). Pozorujeme spektrum POBN/R, reakce dvojmocného železa s  $\text{H}_2\text{O}_2$  v médiu s buňkami, po 15 min inkubaci v ledu přidána kataláza a vycytávač elektronů POBN. Měřili jsme po 10 min od smíchání reagensů. Výsledné spektrum je triplet dubletů a jeho třetí dublet je zřetelně nejnižší (B). Nasimulované spektrum POBN/L optimalizované na naměřené spektrum POBN/R. Použité štěpící konstanty byly  $a^{\text{N}} = 15,6 \text{ G}$   $a^{\text{H}} = 2,6 \text{ G}$ . Nasimulované spektrum POBN/L má s naměřeným spektrem POBN/R korelaci vyhodnocenou programem WINSIM  $R = 0,938$ . Výsledné spektrum je triplet dubletů (C). Nasimulované spektrum POBN/OOL optimalizované na naměřené spektrum POBN/R. Použité štěpící konstanty byly  $a^{\text{N}} = 15,8 \text{ G}$   $a^{\text{H}} = 2,6 \text{ G}$ . Nasimulované spektrum POBN/OOL má s naměřeným spektrem POBN/R korelaci vyhodnocenou programem WINSIM  $R = 0,840$ . Výsledné spektrum je triplet dubletů (D).



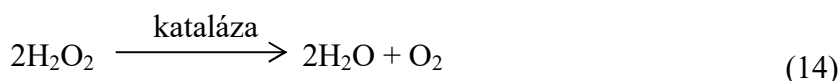
**Obrázek 17.:** EPR spektrum s vycytávačem elektronů POBN, radikál produkovaný Fentonovou reakcí. (A) Signál pozadí, za který jsme zvolili buňky A2780 v médiu a přidali POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). (B) Signál z buněk v médiu po přidání  $\text{H}_2\text{O}_2$  (o výsledné koncentraci 41,6 mM),  $\text{FeSO}_4$  (o výsledné koncentraci 8,3 mM), kde jsme po 15 minutové inkubaci v ledu přidali katalázu (10 jednotek) a POBN (o výsledné koncentraci 50 mM). Měření proběhlo po 10 minutách od smíchání výše uvedených reagensů. (C) Simulace spektra POBN/L, použité štěpící konstanty byly  $a^{\text{N}} = 15,6 \text{ G}$   $a^{\text{H}} = 2,6 \text{ G}$ . (D) Simulace spektra POBN/OOL, použité štěpící konstanty byly  $a^{\text{N}} = 15,8 \text{ G}$   $a^{\text{H}} = 2,6 \text{ G}$ .

## 4. Diskuze

Podle předpokladů pomocí Fentonovy reakce vznikal  $\text{HO}^\bullet$  (Merz a Waters 1947), rovnice 13, který se nám podařilo detekovat pomocí vychytávače elektronů POBN, Obrázek 11 (B).



Pro další použití systému Fentonovy reakce na buňky v médiu bylo nutné tento signál eliminovat, aby nám nepřekrýval signál organických radikálů. Příklad překryvu  $\text{R}^\bullet$  a  $\text{HO}^\bullet$  pozorujeme na Obrázku 13 (C). Útlum  $\text{HO}^\bullet$  pomocí katalázy je založen na převedení  $\text{H}_2\text{O}_2$  na  $\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{O}_2$ , rovnice 14. Následně se  $\text{HO}^\bullet$  velmi rychle vyčerpá z důvodu doby života. Hydroxylový radikál má poločas doby života menší než  $1 \mu\text{s}$  (Ferretti 2012).



Adukt POBN/OH má dobu života v řádech sekund (Venkataram a kol. 2004). To potvrzují výsledky na Obrázku 11. Při měření okamžitě po smíchání  $\text{H}_2\text{O}_2$  a dvojmocného železa pozorujeme znatelně nižší spektrum (C) a u měření po 2 minutách úplný útlum signálu (D). Tím usuzujeme na nestabilitu aduktu POBN/OH a je pravděpodobné, že podobně nestabilní budou i adukty ostatních volných radikálů s nepárovým elektronem na kyslíku (například POBN/OOL). My jsme však schopni  $\text{HO}^\bullet$  detekovat a to z důvodu jeho neustále tvorby. Intenzita EPR spektra POBN/OH aduktu (B) poukazuje na vysokou koncentraci  $\text{HO}^\bullet$ , díky čemuž se bude indukovat větší množství organických radikálů po použití tohoto systému na buňkách v médiu.

Na Obrázku 12 (B - E) můžeme pozorovat spektra aduktu POBN/R, který vznikl reakcí  $\text{HO}^\bullet$  s buňkami v médiu, rovnice 15.



Spektra aduktu POBN/R z Obrázku 12 mají i po 45 min stále stejnou intenzitu. Adukt POBN/R je tedy mimořádně stabilní. Takhle stabilní adukty mají s POBN typicky volné radikály s nepárovým elektronem na uhlíku, tedy například POBN/L (Venkataram a kol. 2004).

Spektrum aduktu POBN/R (Obrázek 13, B – C) má jiný tvar a šířku píků a nedetekujeme tedy HO<sup>•</sup>. Jelikož jsou píky spektra POBN/R aduktu širší (B a C), mají tudíž tato spektra jiné štěpící konstanty než adukt POBN/OH (D). U spektra aduktu POBN/R lze pozorovat menší třetí dublet. Tohle zjištění nám dává první informaci o typu radikálu, jelikož tuto vlastnost mají adukty POBN s nepárovým elektronem na uhlíku (Nort a kol. 1992). Navíc HO<sup>•</sup> byl po přidání katalázy velmi rychle eliminován, jak pozorujeme na Obrázku 11 (B).

Při použití antioxidantů, Obrázky 14 a 15, jsme očekávali snížení signálu a tím lepší charakterizaci R<sup>•</sup>. Signál obdržený po přidání L-askorbátu byl utlumen na úroveň signálu pozadí. L-askorbát utlumil všechny volné radikály detekovatelné pomocí vychytávače elektronů POBN. Jelikož L-askorbát reaguje s velmi širokou škálou volných radikálů (Halliwell a Gutteridge 1999), není tedy možné přesně určit, o jaký typ radikálu se jedná. Další antioxidanty  $\alpha$ -tokoferol a propyl galát oproti tomu spektrum aduktu POBN/R zvýšili.  $\alpha$ -Tokoferol a propyl galát pravděpodobně převedli volné radikály, které nejsou pomocí vychytávače elektronů POBN dobře detekovatelné (proteinové radikály), na jiný typ radikálů. Narušili tak rovnováhu ve prospěch radikálů, které lze pomocí vychytávače elektronů POBN detekovat (HO<sup>•</sup>, L<sup>•</sup> a LOO<sup>•</sup>).

Vychytávač elektronů POBN nejlépe reaguje s lipidovými radikály, které mají nepárový elektron na uhlíku (Xu a kol. 2012, Halliwell a Gutteridge 1999), proto by námi detekovaný R<sup>•</sup> mohl ve skutečnosti být L<sup>•</sup>. Tohle tvrzení podporuje i simulace signálů, Obrázek 17 (B, C), kde jsme simulovali spektra POBN/L a POBN/OOL aduktů. Experimentální spektrum má se simulovaným spektrem POBN/L korelaci  $R = 0,938$ . Zatímco se simulovaným spektrem POBN/OOL má experimentální spektrum korelaci pouze  $R = 0,840$ . Je zřejmé, že L<sup>•</sup> je zde zastoupen minimálně ve větším množství, než LOO<sup>•</sup>. Může zde však být přítomen pouze L<sup>•</sup>, jelikož štěpící konstanty si jsou velmi podobné. Tudíž by i simulovaná spektra L<sup>•</sup> a LOO<sup>•</sup> vykazovala mezi sebou určitou korelaci.

Pro lepší charakterizaci radikálu, který vychytávač elektronů POBN v tomto případě detekuje, jsme se rozhodli zamezit oxidaci odstraněním kyslíku ze směsi, rovnice 16.



Zvýšení spektra aduktu POBN/R po zamezení oxidace, Obrázek 16 (C), značí zvýšení počtu neoxidovaných forem tedy pravděpodobně L<sup>•</sup>.

North a kol. 1992 také detekovali L<sup>•</sup>, ale na buňkách U937. Produkci L<sup>•</sup> vyvolali pomocí HO<sup>•</sup> a k detekci používali shodně vychytávač elektronů POBN. Měli, ale mírně upravenou metodiku, jelikož do směsi přidávali kyselinu dokosaheptaenovou, kvůli vyšší intenzitě signálu, což u nás nebylo potřeba.

Naše výsledky tedy souhrnně dávají informaci, že pomocí vychytávače elektronů POBN detekujeme adukt POBN/L. Pro potvrzení těchto výsledku by bylo vhodné použít například některou ze separačních technik, jako je hmotnostní spektrometrie nebo HPLC.



## 5. Závěr

Vysvětlení tvorby produktů peroxidace lipidů je v současnosti velice zkoumaným tématem. Znalost těchto principů by vedla například k lepšímu pochopení fluidity membrán a prostupnosti molekul skrze buněčné membrány.

Cílem této práce bylo vyvolat peroxidaci lipidů a charakterizovat o jaký typ volného radikálu se jedná. K tomu jsme využívali EPR v kombinaci s vychytávačem elektronů POBN, který je v detekci lipidových volných radikálů nejpoužívanější.

Vytvořili jsme HO<sup>•</sup> pomocí Fentonovy reakce, a tento systém jsme aplikovali na buňky A2780 v médiu (Obrázek 11 – 17). Díky tomu se nám povedlo vyvolat lipidovou peroxidaci a s největší pravděpodobností detekovat L<sup>•</sup>. O tomto závěru nás přesvědčuje simulace spektra POBN/L aduktu (Obrázek 17 C), se kterou má naměřené spektrum korelaci  $R = 0,938$ . Dále stabilita aduktu volného radikálu s POBN v čase. Následně tvar spektra naměřeného aduktu, kde pozorujeme typický nejnižší třetí dublet. A nakonec vzrůst intenzity signálu při zamezení další oxidace pomocí enzymu glukóza oxidázy.

Dále jsme provedli měření s antioxidanty (Obrázek 14 a 15). Použili jsme antioxidanty  $\alpha$ -tokoferol, L-askorbát a propyl galát. L-askorbát volné radikály eliminoval až o 89 %, ale z důvodu účinku L-askorbátu na velké množství různých typů volných radikálů nemůžeme usoudit, který volný radikál byl ve směsi přítomen. Po přidání  $\alpha$ -tokoferolu a propyl galátu byla navýšena intenzita signálu o 30 %, respektive o 78 %. Nebyly tedy eliminovány všechny volné radikály a měření s antioxidanty nám nedává potřebné informace.

Pokračování v této práci by se týkalo potvrzení hypotézy, že námi detekovaný R<sup>•</sup> je L<sup>•</sup>. Pro potvrzení této hypotézy by byla vhodná kombinace EPR s HPLC a hmotnostním spektrometrem.

## 6. Seznam literatury

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) Molecular Biology of the Cell. Garland Science, New York.

Atkins PPJ (2013) Fyzikální chemie. VŠCHT, Praha.

Aust SD, Morehouse LA, Thomas CE (1985) Role of metals in oxygen radical reactions. Free Radic Biol Med 1, 3-25

Berliner LJ (2016) The evolution of biomedical EPR (ESR). Biomedical Spectroscopy and Imaging 5, 5–26

Boveris AD, Galatro A, Puntarulo S (2000) Effect of nitric oxide and plant antioxidants on microsomal content of lipid radicals. Biological Research 33, 159-166

Brash AR (1999) Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. J. Biol. Chem. 274, 23679-23682

Buettner GR (1987) Spin Trapping: ESR PARAMETERS OF SPIN ADDUCTS. Free Radical Biology & Medicine 3, 259-303

Buettner RG (2008) Molecular targets of photosensitization – some biological chemistry of singlet oxygen. Free radical and Radiation Biology & ESR Facility, Iowa city.

Cacabelos D, Ayala V, Ramírez-Nunez O, Granado-Serrano AB, Boada J, Serrano JCE, Cabré R, Nadal-Rey G, Bellmunt MJ, Ferrer I, Pamplona R, Portero-Otin M (2014) Dietary Lipid Unsaturation Influences Survival and Oxidative Modifications of an Amyotrophic Lateral Sclerosis Model in a Gender-Specific Manner. Neuromol Med 16, 669-685

Ferretti U (2012) Stanovení antioxidační aktivity rostlinných extraktů in-vitro. Bakalářská práce, Ostravská Univerzita v Ostravě

Girotti AW (1998) Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. J. Lipid Res. 39, 1529-1542

Grinna LS (1977) Age related changes in the lipids of the microsomal and the mitochondrial membranes of rat liver and kidney. *Mech Ageing Dev.* 6, 197-205

Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. Oxford

Katan MB, Zock PL, Mensink RP (1994) Effects of fats and fatty acids on blood lipids in humans: An overview. *Am. J. Clin. Nutr.* 60, 1017-1022

Koolman J, Röhm KH (2012) *Barevný atlas biochemie*. Grada Publishing, Berlin  
Leyton J, Drury PJ, Crawford MA (1987) Differential oxidation of saturated and unsaturated fatty-acids *invivo* in the rat. *British Journal of Nutrition* 57, 383-393

Lodish H, Berk A, Zipursky LS (2000) *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman, New York.

Murray RK, Cranner DK, Mayes PA, Rodwell VW (2001) *Harperova biochemie*. H&H, Jinočany

Merz JH, Waters WA (1947) Electron-transfer reactions. The mechanism of oxidation of alcohols with Fenton's reagent. *Faraday Soc.* 2, 179-188

North JA, Spector AA, Buettner GR (1992) Detection of Lipid Radicals by Electron Paramagnetic Resonance Spin Trapping Using Intact Cells Enriched with Polyunsaturated Fatty Acid. *The Journal of Biological Chemistry* 267, 5743-5746

Piterková J, Tománková K, Luhová L, Petřivalský M, Peč P (2005) Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chem. Listy* 99, 455 – 466

Porter NA, Caldwell SE, Mills KA (2011) Mechanisms of free-radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* 30, 277-290

Qian SY, Wang HP, Schafer FQ, Buettner GR (2000) EPR Detection of lipid-derived free radicals from PUFA, LDL and cell oxidations. *Free Radical Biology & Medicine* 29, 568-579

Roche HM (1999) Unsaturated fatty acids. *Proceedings of the Nutrition Society* 58, 397-401

- Roche HM (1999) Unsaturated fatty acids. *The Nutrition Society* 58, 397-401
- Sandip BB, Mahesh VB, Singhal RS, Ananthanarayan L (2009) Glucose oxidase – An overview. *Biotechnology Advances* 27, 489-501
- Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Croninc MTD, Mazura M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 44-48
- Venkataraman S, Schafer FQ, Buettner GR (2004) Detection of Lipid Radicals Using EPR. *Antioxidants & Redox Signaling* 6, 631-638
- Venkataraman S, Schafer FQ, Buettner GR (2004) Forum review: Detection of Lipid Radicals Using EPR. *Antioxidants & Redox Signaling* 3, 631-638
- Widengren J, Chmyrov A, Eggeling Ch, Löfdahl PA, Seidel CAM (2007) Strategies to Improve Photostabilities in Ultrasensitive Fluorescence Spectroscopy. *J. Phys. Chem. A* 111, 429-440
- Xu Y, Gu Y, Qian SY (2012) An Advanced Electron Spin Resonance (ESR) Spin-Trapping and LC/(ESR)/MS Technique for the Study of Lipid Peroxidation. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 14648-14666
- Yin H, Porter NA (2011) Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chemical Reviews* 111, 5944-5972
- Yu BP (1994) Cellular Defenses Against Damage From reactive Oxygen Species. *Physiol Rev* 75, 139-162

**Internetové zdroje:**

[http://sydney.edu.au/science/chemistry/~hamble\\_t/anticanceragents.html](http://sydney.edu.au/science/chemistry/~hamble_t/anticanceragents.html) - dostupné květen 2016

[http://www.aldebaran.cz/bulletin/2010\\_16/membrana.jpg](http://www.aldebaran.cz/bulletin/2010_16/membrana.jpg) - dostupné květen 2016

<http://www.cyberlipid.org/images/pict138.GIF> - dostupné květen 2016

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/93112519?lang=en&region=CZ&clid=Cj0KEQjw2sO3BRD49-zdzfb8iLwBEiQAFZgZfLDeewJs7HgD8hLOjQNLDEqLwqppq7F5VOdFSDNz0BIwaAiq a8P8HAQ> - dostupné květen 2016

[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/21/EPR\\_lines.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/21/EPR_lines.png) - dostupné květen 2016