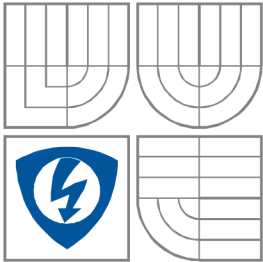


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND
COMMUNICATION

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

SLEDOVÁNÍ ANTIOXIDAČNÍCH UKAZATELŮ U DĚTÍ SE ZHOUBNÝMI NÁDORY

MEASUREMENT OF ANTIOXIDANT MARKERS AT CHILDREN WITH MALIGNANT TUMOURS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S PROJECT

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

LENKA HOŘAVOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. IVO PROVAZNÍK, Ph.D.

BRNO 2011



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor

Biomedicínská technika a bioinformatika

Studentka: Lenka Hořavová

ID: 119708

Ročník: 3

Akademický rok: 2010/2011

NÁZEV TÉMATU:

Sledování antioxidačních ukazatelů u dětí se zhoubnými nádory

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

Seznamte se s metodami zpracování vzorků přes jejich extrakci, homogenizaci, laboratorní přípravu až po měření, vyhodnocování a interpretaci získaných dat. Práce bude zaměřena na spektrofotometrické stanovení antioxidační aktivity a polyfenolických látek v biologických vzorcích na pracovišti Mendelovy univerzity.

Provedte sadu experimentů měření antioxidační aktivity a biochemických parametrů v krvi onkologických pacientů. Data statisticky zpracujte, provedte vyhodnocení.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] GAZDIK, Z.; KRŠKA, B.; ADAM, V.; SALOUN, J.; POKORNA, T.; REZNICEK, V.; HORNA, A.; KIZEK, R. Electrochemical Determination of the Antioxidant Potential of Some Less Common Fruit Species. *Sensors* 2008, 8, 7564-7570.

[2] RICEEVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 1996, 20, 933-956.

Termín zadání: 7.2.2011

Termín odevzdání: 27.5.2011

Vedoucí práce: prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

Abstrakt

Nádorová onemocnění patří mezi nejdůležitější zdravotní problémy dnešní doby. Hledání nových indikátorů pro rozpoznání počátku onemocnění je klíčovou úlohou dnešního výzkumu. Je známo, že oxidační stres souvisí s nerovnováhou mezi koncentrací prooxidantů a antioxidačních mechanismů. Navíc se ukazuje, že tyto změny jsou velmi významné u patofyziologii kriticky nemocných pacientů. Přímé měření reaktivních kyslíkových radikálů nebo markerů oxidačního stresu je v klinické medicíně stále obtížné. Hladina oxidativního stresu je sledována jako změna antioxidační aktivity nebo alternativně jako antioxidační status.

Práce bude zaměřena na spektrofotometrické stanovení antioxidační aktivity a markerů signalizujících poškození organismu. K získání experimentálních dat bude využíváno automatizovaného fotometrického analyzátoru. Data budou statisticky zpracována.

Klíčová slova

antioxidační aktivita, metody měření antioxidační aktivity, oxidační stres, rakovina, nádory dětského věku

Abstract

Tumour disease belongs to one of the most serious health problems of our time. Finding of new indicators to recognise the beginning of the illness is the key role for today's research. Oxidative stress is known to be related to the disharmony between the prooxidant concentration and antioxidant mechanisms. Moreover, it is shown that these changes are very important for patients. Further it appears that these changes are very significant with path physiologically critically ill patients. Direct measuring of the reactive oxygen radicals or oxidative stress' markers is still very hard in clinical medicine. The oxidative stress' level is watched as the change of the antioxidant activity or alternatively as the antioxidant status.

Work is focused on the spectrophotometric fixing of the antioxidant activity and markers signalling the damage of organism. The automated photometric analyzer is going to be used to gain the experimental data. Data will be processed statically.

Keywords

Antioxidant activity, methods determine to antioxidant activity, oxidative stress, cancer, tumours in children

Bibliografická citace:

HOŘAVOVÁ, L. *Sledování antioxidačních ukazatelů u dětí se zhoubnými nádory*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2011. 72 s, 2 přílohy. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D..

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma Sledování antioxidačních ukazatelů u dětí se zhoubnými nádory jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne

.....
podpis autorky

Poděkování

Děkuji vedoucímu bakalářské práce prof. Ing. Ivo Provazníkovi, Ph.D. za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé bakalářské práce.

V Brně dne

.....
podpis autorky

Obsah:

1	Úvod.....	9
2	Historie výzkumu rakoviny.....	11
3	Etiologie a patogeneze nádorového procesu.....	13
3.1	Definice nádoru.....	13
3.2	Vlastnosti nádorových buněk.....	14
3.3	Teorie kancerogeneze.....	15
3.4	Molekulární podstata rakoviny.....	16
3.5	Genetické změny.....	17
3.6	Nádory dětského věku.....	18
3.7	Vybrané typy nádorů.....	19
3.8	Léčba nádorového onemocnění.....	23
4	Oxidativní stres a rakovina.....	25
4.1	Přehled reaktivních forem kyslíku.....	26
5	Antioxidační aktivita.....	28
5.1	Antioxidanty.....	28
6	Metody stanovení antioxidační aktivity.....	30
6.1	Metody založené na eliminaci radikálů.....	30
6.2	Metody založené na hodnocení redoxní vlastností látek.....	34
7	Cíle bakalářské práce.....	37
8	Experimentální část.....	37
8.1	Materiál a metody.....	37
9	Výsledky.....	43
9.1	Rozdělení podle diagnózy.....	43
9.2	Analýza distribuce sledovaných parametrů u jednotlivých metod.....	50

9.3	Analýza antioxidační aktivity v intervalu několika aplikovaných terapií	53
10	Závěr	56
11	Seznam použitých zkratk	58
12	Seznam literatury	60
13	Přílohy	66
13.1	Příloha č. 1: Obsah přiloženého CD	66
13.2	Příloha č. 2: Četnostní tabulky pro celkový soubor pacientů	68

1 Úvod

Rakovina představuje druhou nejvýznamnější příčinu úmrtí a nemocnosti po kardiovaskulárních onemocněních v Evropě, v roce 2004 bylo více než 3 miliony nových případů a ačkoli 40% úmrtí na rakovinu lze zabránit, mortalita stoupá. V České republice byl zaznamenán rostoucí trend onemocnění plic, konečníku a tlustého střeva. Jedním z důvodů je to, že délka života se neustále zvyšuje a většina nádorů je častější u stárnoucí populace. Větší význam má globální problém nezdravého životního stylu. Především uživatelé tabákových výrobků a alkoholu tvoří populaci s vysokým rizikem rakoviny a představují 40% z celkového počtu onemocnění. Spolu s obezitou, nevhodnou stravou a nedostatkem fyzické aktivity procento onemocnění rakovinou v důsledku nezdravého životního stylu vzroste na 60% [24]. V rámci primární prevence tedy existuje mnoho pozitivních kroků snižující pravděpodobnost onemocnění.

Statistiky přežití rakoviny ukazují, že klíčovým faktorem pro snížení mortality a zlepšení prognózy pacientů je důležitá zejména včasná diagnostika. Hledání nových indikátorů k dřívějšímu a přesnějšímu zachycení onkologických onemocnění je cílem současných výzkumů, protože většina pacientů je v časných stádiích rakoviny asymptotická. K dispozici je jen málo klinických testů, které jsou efektivní, navíc bývají často invazivní a omezené jen na několik málo typů rakoviny. Jako indikátory rakoviny byly navrženy genetické markery. Nejznámější a široce využívaný je prostatický specifický antigen PSA pro diagnostiku rakoviny prostaty z krevních testů, dále BRCA1 a BRCA2 u karcinomu prsu a CDH1 pro karcinom žaludku [2]. Užitečným nástrojem v určení správné diagnózy a zvolení nejvhodnější léčby je chromozomální analýza (cytogenetika). Základním principem této metody je skutečnost, že chromozomální aberace a patognomické genetické změny charakterizují určité nádory. Tato technika umožňuje vyšetřovat nádorové buňky na úrovni jednotlivých bází. Proteomická analýza nádorových buněk je využívána k hledání nových biomarkerů, které umožňují upřesnění prognózy u onkologických pacientů a predikci léčby [12]. Pro určité druhy rakoviny je specifické, že některé jejich metabolické a signální dráhy jsou abnormálně aktivované nebo deaktivované. Nádorová buňka má zvýšenou aerobní glykolýzu na úkor oxidativní fosforylace, je schopná přežít za podmínek hypoxie a zvýšeného oxidačního stresu. Tato bakalářská práce je zaměřena na spektrofotometrické stanovení

antioxidační aktivity a markerů signalizujících poškození organismu. Významnou roli ve vzniku nádorových onemocnění má i oxidační stres související s nerovnováhou volných radikálů a antioxidačních mechanismů. V klinické medicíně je přímé stanovení reaktivních kyslíkových radikálů nebo markerů oxidačního stresu stále obtížné. Velká část je věnována analýze a interpretaci takto získaných informací a jejich možnému využití ke stanovení vhodných terapeutických postupů, diagnostice akutních komplikací protinádorové léčby a prevenci zajištěnou dispenzarizací pacientů patřící do rizikových skupin ohrožených snadnějším vznikem nádorového onemocnění [8].

V bakalářské práci nebyly na návrh konzultanta práce a po schválení vedoucího práce stanovovány polyfenolické látky, neboť stanovení antioxidační aktivity se ukázalo být značně rozsáhlou problematikou.

2 Historie výzkumu rakoviny

Název rakovina („cancer“) je odvozen od latinského slova označujícího kraba, protože tohoto živočicha starým Řekům připomínaly výběžky šedé hmoty nádoru (řecky: karcinos = krab, onkos = rak). Z řeckých kořenů je také odvozen termín onkologie. Jako první popsali rakovinu athénský lékař Hippokrates a Galén, kteří ji považovali za výsledek zánětu způsobený „černou žlučí“. Historie výzkumu je proto nesmírně dlouhá a obsahuje tři významné kroky.

Za prvé buněčnou teorii, která se rychle rozvíjela s objevením mikroskopu a vyslovením teorie buňky Theodorem Schwannem roku 1838. Její hlavní stoupenec byl Rudolf Virchow, popularizátor aforismu „omnis cellula e cellula“ (každá buňka pochází z jiné buňky). Díky této koncepci byla leukémie a lymfomy uznány jako rakovina. Tvorbu nádoru popsal Wilhelm Waldeyerův. Byl také mezi prvními, kdo začal rozlišovat benigní a maligní tumor. Pravděpodobně nejdůležitější experimentální důsledek této teorie byl pokus o první transplantaci nádoru provedený J. Doutrelepontem v roce 1868, následovaný M. Novinsky, A. a H. Morau Hanau, a mnoho dalších. Tyto rané studie otevřely cestu výzkumu o úloze imunitního systému a hormonů v nádorovém bujení.

V průběhu 19. století a první poloviny 20. století se původ a mechanismy nádorových onemocnění hledal v oborech, které se v té době rozvíjely - mikrobiologie, biochemie, genetika, endokrinologie atd. Příkladem může být hledání bakterie způsobující rakovinu a to navzdory skutečnosti, že se zjevně nejedná o nakažlivou nemoc. Tato studie byla podmíněna úspěchy Roberta Kocha a Louise Pasteura. Objev Antoine Lacassagne v roce 1932, že injekce estrogenu u samců myši vyvolává vznik nádorů prsu, vedlo k mnoha studiím o účincích hormonů, zvláště pohlavních hormonů, na vývoj nádoru. Následně bylo prokázáno, že některé formy rakoviny prsu nebo prostaty reagovali na hormonální léčbu.

Hypotéza, že rakovina může být podmíněna přítomností sloučenin v životním prostředí, nebylo nic nového. Už v roce 1775 se ukázala souvislost rakoviny šourku u kominíků, kteří začali pracovat jako chlapi. V roce 1920 E. Kennaway izoloval polycyklické aromatické uhlovodíky z uhlénoho dehtu a prokázal jejich karcinogenní účinek. Na konci druhé světové války po svržení atomové bomby na Nagasaki a Hirošimu byl potvrzen

rozsáhlou lékařskou studií karcinogenní vliv záření a radioaktivních látek. Role cigaretového kouře na vyvolání rakoviny plic byla oficiálně založena na dvou epidemiologických studiích, první v Anglii v roce 1962 a druhá ve Spojených státech o dva roky později.

Druhým významným krokem ve výzkumu rakoviny byla představa Lucien Cuénot po objevení Mendelových zákonů, že se geny podílejí na vzniku rakoviny. Ve stejné době se začíná využívat k léčbě X-záření a radioaktivní látky (radium), po té co se proliferující nádorové buňky ukázaly být na toto záření citlivější než normální buňky. Během roku 1970 docházelo k zvyšování výskytu rakoviny, částečně v důsledku změn životního prostředí, ale především prodlužováním délky života a zánikem nebo poklesem jiných onemocnění. Výsledkem byl zvyšující se zájem západní společnosti o výzkum rakoviny, který vedl k nové vizi rakoviny jako molekulární nemoci. Vypracování nové koncepce se soustředilo na roli onkogenů, anti – onkogenů a tumor supresorových genů. Změny v expresi nebo funkci těchto genů byly považovány odpovědné za buněčnou transformaci a vznik nádorů. Naděje, že tento objev pomůže při diagnostice, je jen částečně splněna. *BRCA1* a *BRCA2* genů jsou široce používány pro odhad rizika rakoviny prsu a na jejich základě se vyvíjí lék inhibující enzym tyrosin kinasu, který je specificky aktivován u některých forem rakoviny. Počet onkogenů a tumor supresorových genů neustále roste. I počet kategorií genů a mutací, které se podílejí na vzniku nádorů, se zvýšil. Molekulární popis rakoviny je stále složitější. Každý typ nádoru má své specifické vlastnosti, každá rakovina je jedinečná a má svou vlastní vývojovou historii. Tento nový přístup k boji proti rakovině stimuloval vývoj nových nástrojů jako DNA čipy - microarrays , které umožňují v jednom experimentu odhadnout činnosti desítek tisíc genů. Také bylo prokázáno, že některé špatně charakterizované formy rakoviny mají specifický molekulární profil. Můžeme si představit, že za pár let bude diagnóza rakoviny plně automatický proces [7].

3 Etiologie a patogeneze nádorového procesu

3.1 Definice nádoru

Rakovina je onemocnění způsobené zhoubným nádorem. Je to komplexní genetická choroba, která je způsobena především faktory životního prostředí. Nádor vzniká jako důsledek kumulace kritického množství mutací v genech, které regulují buněčné chování, včetně míry proliferace, programované buněčné smrti, replikační potenciál a rovněž geny, odpovědné za opravu poškozené deoxyribonukleové kyseliny (DNA), tzv. reparační geny. Tyto mutace vznikají spontánně, jejich frekvence (10^{-6} na jedno buněčné dělení) je vzhledem k celkovému počtu buněčných dělení člověka během života (10^{16}) velmi nízká, proto jsou za vznik mutací odpovědné i zevní faktory (mutageny) [5]. Na nádorové onemocnění pohlížíme jako na geneticky podmíněný neregulovaný růst buněčné tkáňové hmoty klonálního charakteru, která jeví známky abnormality a není v koordinaci s růstem okolních tkání a rovnovážným stavem organismu. Takto postižená tkáň může stlačovat okolní struktury, má sklon k invazi do mízního a krevního systému a metastazování [2].

Nádory dělíme z hlediska jejich biologického chování na benigní (nezhoubné) a maligní (zhoubné). Benigní nádory jsou obecně pomalu rostoucí expanzivní masy neinvadující okolní tkáň. Jejich buněčný povrch není výrazně odlišný proti jiným proliferujícím buňkám organismu, mají organoidní stavbu a jsou homologní. Nádory tohoto typu jsou často vazivově opouzdřené, což umožňuje jejich snadné chirurgické odstranění. Jako takové nepředstavují velkou hrozbu, kromě případů, kdy rostou ve stísněném prostoru (CNS). Nicméně některé benigní nádory mají maligní potenciál, zejména ty které se vyskytují v tlustém střevě, zde je nutná včasná chirurgická resekce [8].

Zhoubné tumory rostou agresivně vůči okolní tkáni a mají schopnost metastazování. Nejsou lokálně ohraničené a opouzdřené, proto je jejich chirurgické odstranění obtížné. Atypie buněčných povrchů vedou k propagaci intersticiem normální okolní tkáň – infiltrativnímu růstu. Schopnost invazivního růstu je podmíněna aktivním uvolňováním proteáz a enzymů štěpících proteoglykany, kolagen a glykosaminoglykany. Právě jejich prostřednictvím nádorová buňka proniká bazální membránou. Maligní nádory jsou

klasifikovány podle výchozí tkáně jejich vzniku na karcinomy, sarkomy, lymfomy, gliomy a germinální nádory [2, 11].

3.2 Vlastnosti nádorových buněk

3.2.1 Imortalizace

Většina somatických buněk má omezený počet mitotických cyklů tzv. Hayflickův limit, který se pohybuje v rozmezí 50 – 70 replikací. Proliferační kapacitu určuje zkracování telomer. Maligní nádorové buňky pokračují v dělení, i když přesáhli kritickou mez pro normální buňku. Tato schopnost neomezené replikace souvisí s aktivací enzymu telomerázy.

3.2.2 Autokrinní stimulace

Nádorová buňka se vyznačuje autonomním chováním, produkuje vlastní autokrinní a parakrinní hormony ovlivňující růst. Má snížené nároky na nutriční faktory.

3.2.3 Kontaktní inhibice

U nádorových buněk dochází ke ztrátě kontaktní inhibice. Po dotyku s okolními buňkami jsou schopny pokračovat v růstu a vytvářet vícevrstevné formace.

3.2.4 Anchorage independence

Transformované buňky nejsou závislé na ukotvení k pevnému médiu.

Nádorové buňky se liší od normálních buněk kromě změn v genomu a pozměněným antigenním složením (antigenicitou) i morfologickými atypii jádra, cytoplazmy a mitóz [2, 5].

Tabulka 1: Morfologické rozdělení nádorů podle biologické povahy [2]

Atypie cytoplazmy	Atypie jádra	Atypie mitóz
změna velikosti buněk	absolutní zvětšení jádra	zvýšený počet mitóz
změna specializovaných struktur	změna nukleoplazmového modelu	tvarem abnormální mitózy
změna tvaru buněk	hyperchromazie jádra	počtem chromozomů
kanibalismus buněk	zmnožení a zvětšení jadérek	abnormální mitózy
změna barvitelnosti	mnohojaderné buňky	atypie chromozomů
strukturální přestavba	změny jaderné membrány a struktury chromatinu	a) náhodné - nespecifické b) stabilní - specifické

3.3 Teorie kancerogeneze

Kancerogeneze označuje vznik a průběh nádorového bujení, je to vícestupňový multifaktoriální proces. Rozvoj maligního fenotypu není výsledkem jen jedné somatické mutace, ale koincidencí nejméně čtyř po sobě jdoucích genetických změn v buňce. Celkem lze rozeznat 3 etapy:

3.3.1 Iniclace – zahájení procesu

Nastává první genetická změna účinkem onkogenních faktorů. Mutace buňky může být podkladem pro nádorové onemocnění, ale ve většině případů dochází k opravě genomu.

3.3.2 Promoce

Etapa, ve které se objevuje výrazná proliferace způsobená dlouhodobým působením promotoru. Mění se fenotyp buněk a vzniká maligní klon. V klinickém obraze se nachází karcinom in situ.

3.3.3 Progrese

Stadium plného ireverzibilního rozvoje nádorového onemocnění. Dochází k lokálnímu růstu tumoru a posléze i k jeho šíření mimo hranice primárního ložiska – metastazování.

Kancerogeny podílející se na vzniku nádorů můžeme podle jejich povahy rozdělit na chemické, biologické a fyzikální.

Existují dvě hlavní třídy genů zapojených do procesu kancerogeneze – protoonkogeny a antionkogeny. [4, 5, 6]

3.4 Molekulární podstata rakoviny

Ke vzniku nádorového onemocnění může vést akumulace genetických změn u tří skupin genů: protoonkogenů, tumor supresorových genů a reparačních genů tzv. caretaker genes, které byly navrženy teprve nedávno. Onkogeny byly původně objeveny studiem retrovirů způsobující nádory u zvířat, kde byly označeny jako v-onc (virové onkogeny). C-onkogeny (buněčné onkogeny) vznikají transformací normálních genů. Jsou to patologické varianty protoonkogenů, které regulují růst, proliferaci a diferenciaci buněk. Jejich produkty - onkoproteiny vyskytující se v abnormální formě nebo množství mohou indukovat maligní transformaci. Bylo objeveno více než 100 onkogenů. Lze je rozdělit podle typu regulačních pochodů, které onkogenem produkované onkoproteiny ovlivňuje do následujících hlavních kategorií: onkogeny kódující transkripční regulační faktory (*ski, fos, jun, myb, rel, myc*); nереceptorové kinázy (*abl, src, ras*) a receptory růstových faktorů (*c-erb-B2, fms*); růstové faktory (*c-sis, int-2, hst*); signální transduktory (*mos, raf*) a regulační faktory apoptózy (*bcl-2, rel*). Aktivace těchto genů je dána chromozomální aberací, genovou amplifikací, virovou transdukcí nebo inzercí a bodovou mutací [2, 9].

Tumor supresorové geny prostřednictvím svých produktů negativně regulují buněčnou transformaci a proliferaci. Mají tedy opačný účinek než onkogeny. Inaktivace jejich funkce znamená ztrátu kontrolních mechanismů nad buňkou a růst nádoru. Mutace příslušných genů jsou obvykle recesivní, aby došlo ke ztrátě funkčních schopností, jsou nezbytné defekty obou alel (knockout mutationst). Bylo stanoveno přes 50 antionkogenů. Zásadní roli jako nádorový supresor má protein p53, produkt genu p53 lokalizovaného na 17. chromozomu, jeho mutace jsou častým nálezem u mnoha druhu nádorů. Má mnohostranné účinky a je považován za „strážce genomu“. Jako transkripční faktor udržuje stabilitu, reguluje proces senescence a indikuje apoptózu. Aktivace p53 je spojena s nárůstem reaktivních forem kyslíku (ROS) v krvi před programovanou buněčnou smrtí. Ačkoli přesný mechanismus je do značné míry neznámý, rozsáhlé studie vedly k závěru, že p53 hraje důležitou roli v odpovědi buňky na různé stresové signály. Na základě míry a intenzity působení těchto negativních faktorů na buňku dochází k poškození, mezi které patří: dvojřetězcové zlomy DNA,

genové/chromozómové/genomové mutace a disregulace důležitých buněčných pochodů. Na tento stav rychle a specificky odpovídá protein p53 aktivací mechanismu udržující homeostázu a zabraňujících šíření aberantních buněk. Vysoký potenciál genu p53 pro eliminaci onkogenních transformací je v současné době testován s diagnostickým a terapeutickým cílem [4, 10, 13].

Třetí kategorie genů zajišťuje opravy chyb vzniklé při replikaci DNA. Nejsou přímo zapojeny do tvorby nádoru, nicméně jejich porucha usnadňuje maligní transformaci. Tvoří dvě hlavní skupiny: systém MMR a NER. Produkty genů systému MMR kontrolují správné párování bází v DNA. Soubor genů NER opravuje excitaci bází. Jejich mutací vzniká predispozice k nádorovému onemocnění, především jsou zodpovědné za rozvoj syndromu HNPCC [3, 11].

3.5 Genetické změny

V roce 1914 Theodor Bover jako první vyslovil hypotézu o souvislosti mezi chromozomálními změnami a neoplazií. Cytogenetické a molekulárně cytogenetické studie prokázaly, že klíčovou poruchou v patogenezi nádorového procesu jsou genetické transformace, které mají charakter chromozomálních abnormalit. Jsou specifické pro určité typy nádorových onemocnění a mohou sloužit jako marker k diagnostice i prognóze. Termínem primární chromozomové aberace označujeme specifické změny spojené s konkrétním nádorem, naopak sekundární aberace jsou získané během progresu nádoru a odrážejí klonální evoluci stadia onemocnění [22].

Existuje několik typů genetické nestability: *Bodová mutace* způsobena záměnou bází v DNA, jejich depurinací nebo deaminací. Tato situace může nastat prostřednictvím chemického poškození nebo účinkem záření; *Delece* znamená ztrátu genetického materiálu a projeví se ztrátou heterozygoty (LOH); *Inzerce* je přidání párů bází na témže chromozomu; *Inverze* vzniká převrácením určitého chromozomálního úseku, což následně ovlivní tvorbu chimérického abnormálního proteinu; *Translokace* je strukturní změna, při které dochází k vzájemné výměně částí nehomologních chromozomů. Výsledkem je produkce normálního proteinu v abnormálním množství nebo produkce proteinu chimérického. *Amplifikace* je abnormální proces zmnožení genetického materiálu, který působí aktivaci onkogenů a

zvýšenou produkci proteinů s normální funkcí. V některých případech způsobuje rezistenci na léčbu a je častým nálezem u solidních nádorů [15].

Somatické mutace nádorových supresorových a opravných genů mohou být, na rozdíl od mutací onkogenů, zodpovědné za dědičné nádorové syndromy. Predisponují ke vzniku určitého druhu rakoviny. U nosiče zárodečné mutace ztrátou zbývající funkční alely dojde k úplnému vyřazení tumor-supresorového genu a pravděpodobnost vzniku nádoru je vysoká. Tato teorie „druhé zásahu“ byla na základě studií retinoblastomu formulována Knudsonem. Zárodečné mutace v těchto genech v korelaci s mutací genů reparačních systémů jsou častým nálezem u familiárně vyskytujících se nádorů [3, 16].

Dědičné nádorové onemocnění představuje až 5 % ze všech zhoubných nádorů. U malignit lze vystopovat vrozenou dispozici a některé společné rysy: vyskytují se v mladším věku než nádory sporadické, jsou multifokální, duplicitní a nejčastější jsou autozomálně dominantní, patří mezi ně např. retinoblastom, syndrom Li-Fraumeniho (zvýšený výskyt nádorů měkkých tkání, mozkových nádorů a karcinomu prsu v rodinné anamnéze), syndrom von Hippel-Lindau (familiární predispozice k různým nádorům s progresí v mladším věku) a Wilmsův nádor (embryonální nádor ledvin, jeho predispozice je daná delecí několika genů, včetně WT-1. Podstatně vzácnější jsou autozomálně recesivní onemocnění, příkladem je Bloomův syndrom (výskyt nádorů GIT a lymfomů v dětském věku) a Fanconiova anémie (časté leukémie a hepatocelulární karcinomy) [3, 11].

V lidském organismu existuje systém obranných mechanismů, který zahrnuje opravné systémy DNA, stresové proteiny a antioxidanty. Jejich porucha představuje značné riziko vzniku mutací a poškození genetické informace v kritických lokusech.

3.6 Nádory dětského věku

Příznaky a průběh nádorových onemocnění u dětí a mladistvých jsou ve srovnání s nádory dospělých poněkud odlišné a vyžadují i jiné léčebné postupy. Incidence představuje méně než 1% z celkového výskytu nádorů. I přes vysoké procento vyléčených dětských onkologických pacientů (70%) je nádorové onemocnění druhou nejčastější příčinou úmrtí dětí, hned za traumaty. Nejčastější nádory u časného dětského věku do pěti let je akutní lymfoblastická leukémie, neuroblastom, nefroblastom, hepatoblastom, rhabdomyosarkom, retinoblastom a germinální nádory. Specifické nádory druhého pětiletí jsou mozkové a míšní.

Nádory měkkých tkání a kostí (osteosarkom a Ewingův sarkom) jsou specifické pro druhé decennium. Diference dětských onemocnění je nejen v lokalizaci, histogenetickém původu, biologickém chování, ale i v klinické symptomatologii a prognóze.

Zatímco u dospělých je charakteristický relativně pomalý růst a pozdní metastazování nádorů ektodermálního a entodermálního původu, většina dětských nádorů vzniká z krvetvorné tkáně, neuroektodermu a mezodermu. Jejich velká růstová frakce nepochybně souvisí s histogenetickým původem nádoru, který vzniká transformací pluripotentních buněk. Vyznačují se krátkým generačním a zdvojovacím časem a bohatou neovaskularizací. Symptomatologie nádorových onemocnění dětí je nespecifická, převládají paraneoplastické příznaky nad lokálními, které jsou časté u dospělých. Své odlišnosti má i protinádorová léčba. Může mít trvalé následky pro další somatický vývoj a život dítěte [1,3].

3.7 Vybrané typy nádorů

3.7.1 Nádory CNS

Incidence nádorů centrálního nervového systému dětí představuje 15-20% všech zhoubných onemocnění, jsou tedy nejčastějšími solidními novotvory. Jejich výskyt je často asociován s některými syndromy a vrozenými vývojovými vadami. Tumory této skupiny vycházejí z buněk embryonálního původu, patří sem gangliové buňky, gliové buňky a Schwannovy buňky. V patogenezi nádorů CNS se uplatňuje mutace genu p53 a zvýšená exprese PDGF. Pro dětský věk jsou typické gliové nádory (astrocytom), primitivní neuroektodermální nádory (meduloblastom) a germinální nádory, které primárně vznikají mimo CNS s lokalizací v pohlavních žlázách a jsou častější u dětí s vrozenými genetickými syndromy (Klinefelterův syndrom) [1,3,4].

3.7.2 Neuroblastom

Neuroblastom (NBL), nádor vycházející z nezralých a nediferencovaných buněk neurální lišty, které osídlují dřev nadledvin, paraganglia a sympatická ganglia. Je jedním z nejčastějších solidních nádorů dětského věku a představuje 15% všech dětských úmrtí na rakovinu. Jeho klinické chování je výrazně heterogenní. Často se vyskytuje u některých vrozených vad např. Sotův syndrom, „Ondinova kletba“ (centrální hypoventilační syndrom).

U pacientů do jednoho roku života představuje nízké riziko, často samovolně regreduje nebo spontánně diferenciuje v ganglioneuroblastom či benigní ganglioneurom. Naopak u pacientů starších než jeden rok je nádor vysoce maligní a má tendenci růst rychle a metastázovat – nejčastěji do mízních uzlin, kostí a kostní dřeně, u kojenců pak do jater a kůže. Nedávný vývoj chemoterapie výrazně zvýšil procento přežití pacientů, nicméně pokročilé fáze neuroblastomu, zejména s amplifikací protoonkogenu N-myc, jsou odolné proti jakékoli léčbě a prognóza pro pacienty je nepříznivá [14]. NBL spolu s Ewingovým sarkomem patří do skupiny primitivních neuroektodermálních nádorů. Cytogenetické abnormality uplatňující se v patogenezi neuroblastomu jsou inaktivace nádorových supresorů a aktivace onkogenů na chromozomu 1p36 [4, 17].

3.7.3 Ewingův sarkom

Jedná se o malobuněčný sarkom s vrcholem výskytu mezi 10. -15. rokem. Nádor typicky vzniká v dřevnaté dutině dlouhých kostí, osovém skeletu a pánevních kostech [3]. Pro většinu jsou specifické translokace chromozomů t (11;22) (q24;q12), které vedou k tvorbě fúzního genu spojující některé atributy genů EWS a FLI1. Tyto abnormality vedou spolu s dalšími chromozomálními změnami ke vzniku chimérického onkogenu, který působí jako transkripční aktivátor [19].

3.7.4 Osteosarkom

Osteosarkom, vysoce maligní nádor vycházející z kmenových mezenchymálních buněk, je nejčastějším nádorem kostí s vrcholem výskytu ve 2. a 3. dekádě. Incidence je častější u dívek, což může být spojeno s prudkým růstem kostí a hormonálními změnami. Etiologie nádoru je neznámá, přesto je zřejmé, že významným faktorem v procesu kancerogeneze je deregulace supresorového genu p53 na chromozomu 17p a alterace genu Rb na chromozomu 13q. U agresivních forem osteosarkomu je zvýšená exprese produktů protoonkogenů c-myc a FOS. Vysoké riziko představuje metastazování především do plic, u pacientů po radikálním chirurgickém zákroku a aplikaci chemoterapie je 80% šance na dlouhodobé přežití [1,3,23].

3.7.5 Retinoblastom

Retinoblastom je maligním nádorem oka vyskytující se výlučně u dětí nejčastěji ve věku do 2 let. Histologicky nádor vychází z neuroepitelových nediferencovaných buněk. Intraokulární postižení může být jednostranné nebo oboustranné. Prognóza pacientů s časnou detekcí je velmi příznivá, pět let přežívá 95-100% dětí. Nezbytná je celoživotní dispenzarizace, důvodem je vysoké riziko sekundárních malignit. Retinoblastom patří mezi autozomálně dominantní onemocnění, pozitivní rodinnou anamnézu má 10-15% pacientů. [18] Nosičem náhodné somatické nebo zárodečné mutace je gen Rb-1 lokalizován na dlouhém raménku 13. chromozómu (13q 14). U hereditární formy je mutovaná alela genu Rb-1 přítomna ve všech buňkách. Druhá mutace zbývající alely, primárně v buňkách sítnice, vzniká až během života. Pravděpodobnost vývoje retinoblastomu je vyšší než u sporadické formy, u které vedou k onemocnění dvě po sobě jdoucí somatické mutace [1,2].

3.7.6 Nefroblastom

Nefroblastom neboli Wilmsův nádor (WN) je jedním z nejčastějších solidních zhoubných nádorů dětského věku. Incidence se liší podle rasy, u kavkazské populace 8,1 onemocnění na 1 milion dětí mladších 15 let, u černošské populace je výskyt vyšší a dívky jsou postiženy o něco častěji než chlapci [3]. Většina nádorů je diagnostikována v prvních 5 letech života, s vrcholem výskytu onemocnění mezi 3. a 4. rokem. WN jsou velmi vzácné u novorozenců, dokumentovány jsou ovšem i případy výskytu tohoto onemocnění u dospělých pacientů. Nefroblastom je způsoben vrozenou nebo získanou mutací genu W-T1, která má obvykle charakter delece nebo bodové mutace. U familiárního výskytu byl identifikován další gen, podílející se na tvorbě nádoru, W-T3 lokalizován na 11. chromozomu. Jsou popsány i jiné abnormality jako ztráta heterozygotnosti na 16q a 1p36, představující agresivnější chování, progresi onemocnění a horší prognózu. Pro tento nádor je typická asociace s některými kongenitálními syndromy, jmenovitě Beckwithovým-Wiedemannovým, syndromem WAGR a s Denysovým-Drashovým syndromem. Procento přežití pacientů ovlivňuje řada faktorů (věk, léčba, velikost nádorů), u multimediální léčby je medián tříletého přežití téměř 80% [4, 14, 20].

3.7.7 Rabdomyosarkom

Rabdomyosarkom vychází z nediferencované mezodermové tkáně, histologicky lze rozlišit několik variant lišících se biologickým chováním a lokalizací: nejčastější je embryonální RMS s lokalizací v oblasti hlavy a krku, diagnostikován je u dětí do 15 let věku; alveolární RMS s podobnou distribucí jako u embryonálního RBS, s incidencí mezi prvním a druhým deceniem a nejméně častým typem je pleomorfní RMS [3]. V patogenezi převládají genetické faktory, nejvýznamnější chromozomální abnormalita je reciproká translokace mezi 2. a 13. chromozomem, díky které dochází k fúzi genu PAX-3 a genu FKHR. K vývoji nádoru přispívají i další poruchy, jako např. mutace genu p53, bodové mutace genů N-ras, K-ras a LOH na chromozomu 11p [4]. Prognóza je pro pacienty příznivá.

3.7.8 Maligní lymfomy

Spektrum maligních lymfomů je značně heterogenní. U dětí se prakticky vyskytují dvě chorobné jednoty: nehodgkinské lymfomy (NHL) a Hodgkinova choroba (MH). Postihují asi 10-13% dětských pacientů, zaujímají tak třetí místo mezi maligními nádory dětství [1].

Etiologie a patogeneze MH není známá, určitou roli hraje genetická predispozice v korelaci s primární nebo sekundární imunodeficiencí. V nádorové transformaci se uplatňuje infekce virem Epstein a Barrové (EBV) v buňkách Reedové-Sternberga, které představují základní diagnostický element, jejich prekurzory jsou tzv. Hodgkinovy buňky. Hodgkinův lymfom je charakteristický tím, že je tvořen relativně malým počtem maligních buněk, které jsou obklopeny reaktivní masou lymfocytů a histiocytů. MH je systémové onemocnění s věkovou distribucí v druhém decenniu a ve vysokém procentu je kurabilní [1,4,21].

Nehodgkinské lymfomy vznikají neoplastickou transformací buněk z B lymfoidní řady a z T nebo NT buněk. Vrchol výskytu onemocnění je kolem 10. roku, zvýšené riziko je u dětí s vrozenou nebo získanou imunodeficitou (AIDS) a autoimunitní chorobou (systémový lupus, celiakální sprue). U části pacientů je asociace s virem EB. V patogenezi NHL mají roli genetické alterace, které jsou specifické pro určité typy lymfomů a jejich stanovení je důležitým diagnostickým faktorem. Tyto procesy zahrnují chromozomální translokace. Procento vyléčených pacientů kolísá mezi 75-85% [3, 25].

3.8 Léčba nádorového onemocnění

Z hlediska léčebného cíle se v klinické praxi dělí protinádorová léčba na kurativní a nekurativní. Kurativní léčebná strategie má předpoklad totální odstranění nádoru, tedy vyléčit pacienta. U nekurativní léčby se nepředpokládá smrt všech nádorových buněk. Neusiluje o vyléčení, ale je zaměřena na prodloužení života pacienta a na zmírnění obtíží v průběhu nádorového onemocnění. Každý lékař indikující onkologickou léčbu musí zvažovat její přínos pro pacienta proti negativním alteracím kvality života.

Onkologická léčba má 4 terapeutické modalities:

- Operační léčbu
- Radiační léčbu
- Medikamentózní léčbu
- Podpůrnou léčbu

U většiny nádorů se postupně uplatňují všechny dostupné možnosti. Jedním z nejvíce využívaných postupů protinádorové léčby je chemoterapie.

3.8.1 Protinádorová chemoterapie

Protinádorová farmakologická léčba je široký pojem, který zahrnuje protinádorovou hormonální léčbu, protinádorovou chemoterapii, léčbu retinoly a stále více se uplatňují různé formy bioterapie využívající pokroky genetiky a molekulární biologie. Nejnovější farmakologickou léčbou je využití monoklonálních protilátek cílených proti některým nádorovým antigenům, která mohou nést toxin nebo radioaktivní prvek. Chemoterapií se v onkologii rozumí podávání léků s cytotoxickým účinkem. Tyto látky mají různou chemickou strukturu, mohou být syntetického původu nebo se jedná o deriváty látek získaných z plísní a rostlin. Jejich farmakokinetika je ovlivněna čtyřmi aspekty: absorpcí, distribucí, metabolismem a vylučováním. Cílem cytostatické léčby je dosáhnout ideálního stavu, kdy v intervalu po každém podání cytostatik dochází ke zmenšování počtu maligních buněk a zároveň modifikovat dávky tak, aby toxicita léčby byla co nejpříjemnější pro ostatní nenádorové buňky [49].

Všechny metody protinádorové terapie představují velkou zátěž pro organismus pacienta, mnohá léčiva jsou charakteristická svojí toxicitou, právě tato vlastnost vyžaduje

monitorování zdravotního stavu pacienta a tedy podmíněnou optimalizací léčby spolu s individuálním přístupem v průběhu onemocnění.

4 Oxidativní stres a rakovina

Termín oxidativní stres definuje nerovnováhu mezi volnými kyslíkovými radikály (ROS) a antioxidační obranou buňky. V posledních letech je věnována značná pozornost expozici ROS v roli kancerogeneze. Tento faktor nepochybně ovlivňuje vznik a progresi nádoru, některé poslední studie předpovídají i jeho terapeutický potenciál.

Volné radikály jsou vysoce reaktivní molekuly díky přítomnosti jednoho nebo více nepárových elektronů. Vznikají několika různými procesy: jako syntetizované enzymy (NADPH oxidáza a myeloperoxidázy) z fagocytární buňky k boji proti bakteriální infekci; působením ionizujícího záření na biologické molekuly a při buněčném dýchání - aerobní organismy jsou schopny dosáhnout mnohem větší účinnosti výroby energie ve srovnání s anaerobními organismy pomocí mitochondriálního respiračního řetězce, nicméně za cenu kontinuálního vzniku vedlejšího produktu superoxidu [27]. Skupina ROS zahrnuje několik typů reaktivních kyslíkových metabolitů: superoxidový anion, singletový kyslík, peroxyinitrit a dále non-radikály, jako je peroxid vodíku. Tyto molekuly hrají důležitou roli v mnoha fyziologických procesech, škodí v případě překonání kontrolních mechanismů. Nedochází-li dostatečně rychle k neutralizaci volných radikálů antioxidačními enzymy nebo neenzymatickými antioxidy, nastává poškození biomolekul a jejich buněčných membrán, kde vlivem přítomnosti polynenasycených mastných kyselin, nastává řetězová reakce vedoucí k oxidaci proteinů, ztrátě nebo oslabení funkce buněčné membrány a produkci aldehydů, jako je akrolein, HNE a malondialdehyd (MDH), který se využívá jako marker míry poškození oxidačním stresem. Přestože mají tyto látky důležitou roli v procesu buněčné proliferace, transformace, diferenciaci a apoptózy, jsou také silně karcinogenní [26]. Je nutné zmínit, že volné radikály nemají jen endogenní původ, kdy jsou produkovány organismem, ale i exogenní. Mezi nejvýznamnější zevní oxidanty patří ozon, barbituráty, genotoxické a negenotoxické karcinogeny a cigaretový kouř. I pasivní kouření je spojováno se zvýšenou produkcí volných radikálů (jeden obláček cigaretového kouře obsahuje celkem 1014 volných radikálů) [28]. Organismus je schopný bránit se nadměrné tvorbě ROS a udržet buňky ve stavu homeostázy využitím antioxidačních enzymů: superoxid dismutáza, glutation peroxidáza a katalázy. Efektivita antioxidačního systému je závislá na genetické predispozici

a genomová variabilita každého jedince je zodpovědná za rozdílnou klinickou manifestaci oxidačního stresu [29].

Řada studií v posledních letech popsala několik různých vztahů mezi mírou oxidativního stresu k vzniku a prognóze nádorového onemocnění. V etiologii rakoviny hrají významnou roli exogenní volné radikály a také prostředí chronického zánětu, kde dochází k dlouhodobému působení oxidačního stresu s následnou manifestací rakoviny (virová hepatitis - hepatocelulární karcinom). Snížená prevence v reparaci DNA vlivem akumulace mutagenního vlivu přispívá k procesu karcinogeneze. Zejména polymorfismy antioxidantních enzymů (AOE) vedou ke snížení schopnosti buňky eliminovat ROS a bránit se tak oxidativnímu stresu. Změna aktivity AOE u vytvořené malignity je hlavní příčina zvýšené produkce volných radikálů buňkami karcinomu v porovnání s okolní tkání. Volné radikály stimulují expanzi buněk zvýšením koncentrace intracelulárního Ca^{+2} , která následně aktivuje protoonkogeny, jako je *c-myc*, *c-fos* a *c-jun* nebo protein kinázy C, což vede k větší proliferaci a propagaci. Dle výzkumu Connie S. a kol. postnatální nádorová onemocnění korelují s nízkou úrovní antioxidantů a omezenou činností většiny antioxidantních enzymů u embrya. Tato snížená kapacita činí plod více senzitivní k vývojovým anomáliím v důsledku ROS [30]. Další úroveň poškození oxidačním stresem je mechanismus zrychleného zkrácení telomer. Telomery odpovídají za integritu a stabilitu genomu, jsou obzvláště citlivé na reaktivní formy kyslíku a byl prokázán vztah mezi jejich délkou a rizikem rakoviny. U onkologicky nemocných pacientů je významným zdrojem oxidativní zátěže i samotná radioterapie. Zatím není úplně objasněno, který faktor hraje dominantní roli v kancerogenezi, pravděpodobně jde o kombinaci všech [26,29].

4.1 Přehled reaktivních forem kyslíku

Superoxid $O_2 \cdot$

- Kontinuálně tvořen několika procesy, především v rámci dýchacího řetězce mitochondrií nebo produkcí fagocytujících buněk
- Poškozuje enzymy s aktivním centrem Fe-S, což má za následek zahájení apoptózy

Peroxid vodíku H₂O₂

- Může vznikat spontánně z molekulárního kyslíku v peroxisomech nebo ze superoxidu katalytickou reakcí působením superoxid dismutázy (SOD)
- Vzniká z něj velmi reaktivní hydroxylový radikál
- Přes jeho menší reaktivitu ve srovnání s jinými ROS hraje významnou roli v kancerogenezi, je schopený inaktivovat některé enzymy

Hydroxylový radikál OH•

- Vzniká prostřednictvím Fentonovy reakce
- Nejškodlivější forma ROS, je schopený poškozovat purinové a pyrimidinové báze v nukleových kyselinách

Oxid dusnatý NO•

- Radikál s krátkým poločasem rozpadu
- Je tvořen enzymem syntázou oxidu dusnatého a vyskytuje se ve třech formách
- Má významné fyziologické účinky (neurotransmitér parasymptiku, účastní se likvidace bakterií)
- Podílí se na fázi progresu nádoru zvýšením angiogeneze
- Reakcí se superoxidem vytváří velmi silný a difúzní oxidant peroxynitrit ONOO⁻, který reaguje s proteiny, lipidy a DNA

[26, 31]

5 Antioxidační aktivita

5.1 Antioxidanty

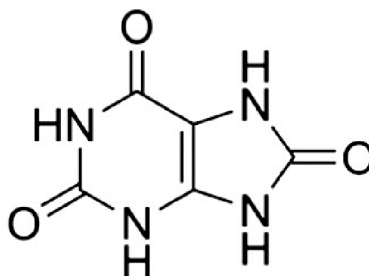
Vlivem evolučního tlaku se vyvinula řada antioxidačních strategií chránící před oxidativním poškozením. Existuje řada obranných systémů založených na principu regulace exprese a aktivity enzymů eliminujících VR nebo na zachycení a odstranění již vzniklých endogenních či exogenních VR. Součástí obranných mechanismů jsou specifické enzymy jako je katalasa, superoxiddismutasa, glutathionreduktasa, glutathionperoxidasa a dále nízkomolekulární látky, které se mohou vyskytovat v membráně (lipofilní) – tokoferoly a karotenoidy a látky nemembránového původu (hydrofilní) - glutathion, thioly, feritin, kyselina askorbová, cystein, ceruloplasmin, transferin, albumin, kyselina močová a bilirubin. Antioxidanty můžeme definovat jako sloučeniny schopné předcházet oxidaci substrátu za podmínky, že jejich koncentrace je nižší než koncentrace oxidovatelného substrátu. Lze je rozdělit podle působení na primární, sekundární a terciární [36].

5.1.1 Hlavní antioxidanty krevní plazmy

Albumin (*referenční rozmezí 34-38 g/l*) je hlavní protein krevní plazmy s klíčovou antioxidační funkcí. Je tvořen jedním polypeptidovým řetězcem o 585 aminokyselinách, včetně 35 cysteinových zbytků. Ve své struktuře obsahuje SH-skupinu, která reaguje s peroxylovými radikály a váže měď. Experimentální data získaná pokusy *in vitro* prokázala jeho významný antioxidační potenciál, ovšem při testování *in vivo* dochází k jeho vysoké oxidaci.

Kyselina močová (*referenční rozmezí 140-340 μmol/l*) je konečným produktem odbourávání purinů. Představuje nejběžnější extracelulární antioxidant a dlouho byla považována pouze za inertní metabolický odpad. V plazmě je KM obsažena ve velké koncentraci, což souvisí s absencí enzymu urikasy, který by katalyzoval její přeměnu na allantoin, ale během evolučního vývoje se přestal tvořit. Její antioxidační účinky jsou založeny zejména na reakci s hydroxylovými radikály a kyselinou chlornou. Dokáže stabilizovat ionty železa a mědi do formy nepodporující radikálové reakce. Reakcí s hydroxylovým radikálem

se sama mění v potenciálně nebezpečný radikál. Spolu s kyselinou askorbovou a albuminem tvoří více než 85% celkové antioxidační kapacity plazmy.



Obrázek 1: Kyselina močová [35]

Bilirubin (referenční rozmezí: dospělí: do 20 $\mu\text{mol/l}$, novorozenci do 205 $\mu\text{mol/l}$, přímý bilirubin do 5 $\mu\text{mol/l}$) je degradačním produktem sloučenin obsahující hem (katalasa, myoglobin, hemoglobin...). V plazmě se typicky vyskytuje ve vazbě na albumin v poměru 1:1, tím se mění na biliverdin nerozpustným ve vodě. Chrání vitamin A před autooxidací a vychytáváním peroxylových radikálů zabraňuje inhibici kyseliny linolové. Jeho antioxidační role u dospělých a dětí není významná, ovšem u novorozenců kompenzuje nedostatečnou kapacitu antioxidačních mechanismů zejména v prvních dnech života při fyziologické žloutence.

[34, 36, 37, 50]

6 Metody stanovení antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita se definuje jako eliminační kapacita sloučeniny schopné inhibovat radikály. V posledních desetiletí byla vyvinuta řada analytických metod k jejímu stanovení. Z hlediska jejich principu je můžeme rozdělit do dvou skupin. První skupina zahrnuje metody založené na sledování zhášení radikálových částic antioxidačními sloučeninami. Testy v této skupině mají různá provedení a zahrnují hodnocení celkové antioxidační kapacity (TEAC, ORAC, FRAP, DPPH). Druhá skupina obsahuje metody založené na hodnocení schopnosti vzorku eliminovat radikály (cyklická volumetrie). Se studiem antioxidační kapacity koreluje i oxidační poškození organismu, stanovení volných radikálů je vzhledem k jejich nízké stabilitě velmi náročné, proto se spíše měří ukazatele jejich působení na biomolekuly nebo produkty radikálových reakcí a celkové změny v antioxidační aktivitě [37].

S rostoucím trendem zájmu o působení, zejména škodlivých, volných radikálů je spjat i paralelní nárůst metod pro odhad účinnosti těchto látek. Stanovení jednotlivých LMWA (low molecular weight antioxidant) v tělních tekutinách, potravinách apod. představuje poměrně složitý analytický problém. V této části budou shrnuty nejznámější postupy pro jejich stanovení. Ty, jež jsou využity k měření této práce, budou podrobněji popsány v experimentální části.

6.1 Metody založené na eliminaci radikálů

U těchto metod hodnotíme schopnosti vzorku vychytávat volné radikály. Ty mohou být v reakční směsi generovány nebo přidány. Jedná se o kyslíkové radikály (hydroxyl, peroxy, superoxidový anion-radikál) nebo syntetické stabilní radikály (DPPH, ABTS⁺, galvinoxyl) [39].

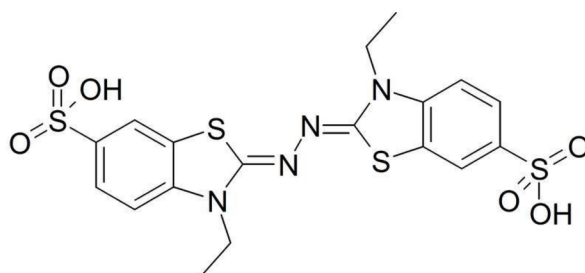
6.1.1 ABTS metoda-TEAC Trolox equivalent antioxidant capacity

Využívá se jako jedna z nejzákladnějších a nejpoužívanějších metod pro celkové stanovení antioxidační aktivity. Princip je založen na vzniku radikálu ferryl myoglobinu, jež je tvořen z metmyoglobinu a peroxidu vodíku. Tento radikál může oxidovat s ABTS (2,2 – bis – anizino (3 – ethyl –2,3 –dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)) a vytvářet kation-radikál ABTS⁺,

který je zelené barvy a může být měřen pomocí absorbance při 670 nm. Vzhledem k tomu, že výsledná aktivita je srovnávána s antiradikálovou aktivitou syntetické látky Troloxu (6hydroxy-2,5,7,8tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), je někdy označována jako metoda TEAC [40,43].

počáteční reakce: $\text{metmyoglobin} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{ferryl myoglobin} + \text{H}_2\text{O}$

následující reakce: $\text{ABTS} + \text{ferryl myoglobin} \rightarrow \text{ABTS}^+ + \text{metmyoglobin}$



Obrázek 2: ABTS [41]

6.1.2 Dimethyl-p-fenylendiamin - DMPD

Je to metoda využívající hydrofilní sloučeniny N, N-dimethyl-p-fenylendiaminu (DMPD). V přítomnosti antioxidantů lze pozorovat zbarvení roztoku díky radikálnímu kationtu této směsi. Tento test vychází ze schopnosti radikálního donoru vodíku zhášet jeden elektron z DMPD^+ .

Barevný radikál je tvořen přidáním chloridu železitého k DMPD ($\text{Fe}^{3+} : \text{DMPD}$ v poměru 1:10). Absorbance tohoto je měřena při 505 nm a je konstantní při pokojové teplotě až 12 hodin. Antioxidační aktivita se vypočítá jako procentní podíl z nespoutaného radikálu podle rovnice:

$$\text{antioxidační aktivita (\%)} = [1 - (E_{505\text{sample}} / E_{\text{DMPD}^+})] * 100$$

[48]

6.1.3 Oxygen radical absorbance capacity -ORAC

Je založena na zpomalení oxidační degradace fluorescenční molekuly (buď beta-phycoerythrin nebo fluorescein), po smísení generátoru volného radikálu, jako je azo-iniciátor sloučeniny. Ten může vznikat zahřáním radikálu peroxy, který poškozuje fluorescenční molekuly, což má za následek ztrátu fluorescence. Antioxidant je schopen tyto molekuly chránit. Stupeň ochrany se zaznamenává na tzv. Decay křivky - intenzita fluorescence v závislosti na čase [39, 42].

6.1.4 Vychytávání OH- radikálů

Principem metody je vytváření volných OH-radikálů a antioxidanty je eliminovat. Generování OH-radikálů může probíhat např. Fentonovou reakcí, UV fotolýzou peroxidu vodíku nebo fotolýzou syntetických derivátů.

Možné postupy vychytávání:

- salicylová kyselina - produkty se kvantifikují metodou HPLC a detekují UV
- 2,2dimethyl-2H-pyrrol-1-oxid (DMPO) - kvantifikace pomocí ESR (Electron Spin Resonance) nebo HPLC-ECD
- deoxyribosa - degradační produkty jsou sledovány thiobarbiturovou kyselinou (TBA)
- specifickou chemiluminiscenční sondou indoxyl- β -glukuronidem (IBG) [39]

6.1.5 Diphenylpicrylhydrazyl – DPPH

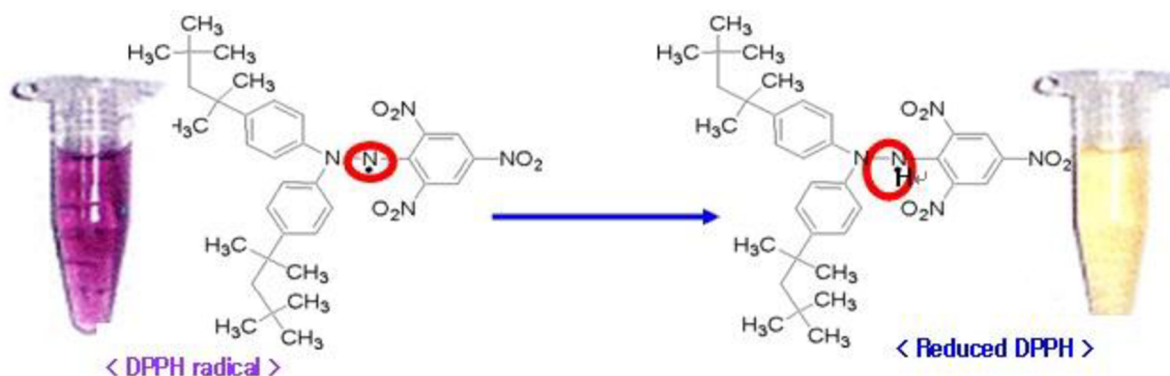
Jedna z populárních metod je založena na využití volných radikálů diphenylpicrylhydrazyl a dále její ekvivalentní koncentraci s 50% - ním efektem – EC50, jež je momentálně používána pro experimentální výklad metody. Zhášení radikálu u DPPH testu probíhá dvěma reakčními mechanismy a to přenosem atomu vodíku (HAT - Hydrogen Atom Transfer) a přenosem elektronu (SET - Single Electron Transfer). Vyhodnocení můžeme provádět spektrofotometricky při 517 nm buď po uplynutí konstantního času, nebo kineticky. Jako standart pro tuto metodu se využívá trolox nebo kyselina askorbová.

Původní metoda Blois

První postup byl představen již téměř před 50. lety Marsdenem Bloisem pracujícím na Stanfordské Univerzitě. Jeho model používá antioxidant thiol - obsahující aminokyselinu cystein. Repräsentující DPPH radikál $Z\cdot$ a cystein molekuly RSH. Počáteční reakce je pak: $Z\cdot + RSH = ZH + RS$.

1. Redukovaná forma volných radikálů

Je charakterizována díky schopnosti stabilního volného radikálu (2,2-difenyl-1-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl) přemísťovat elektrony přes celou molekulu bez schopnosti dimerze, tedy vytvoření sloučenin, jak by tomu v ostatních případech nastalo, což vyvolá fialovou barvu. Pokud je roztok DPPH smíchan s látkou, která může darovat donor vodíku (HAT - Hydrogen Atom Transfer) dojde k redukované formě barvy světle žluté. Repräsentující DPPH radikál $Z\cdot$ a donor molekuly AH. Počáteční reakce je pak: $Z\cdot + AH = ZH + H\cdot$, kde ZH je redukovaná forma a $H\cdot$ je volný radikál produkovaný v prvním kroku [38].



Obrázek 3: Princip metody DPPH - redukovaná forma volných radikálů[44]

6.1.6 Metoda Free Radicals

U této metody je využíváno schopnosti chlorofylinu (sodno-mědnatá sůl chlorofylu) přijímat a odevzdávat elektrony za současné stabilní změny absorpčního maxima. Tento děj je podmíněn alkalickým prostředím a přidavkem katalyzátoru [45].

6.1.7 Chrom peroxid - CrO₅

Chrom peroxid (Cr (O₂)₂.H₂O nebo zkráceně CrO₅) je extrémně silný oxidant. Tato sloučenina je produktem reakce: $(NH_4)_2Cr_2O_7 + 4H_2O_2 + 2H^+ \rightarrow 2Cr(O_2)_2 \cdot H_2O + 4H_2O + \text{sůl amonná}$. Je to temně modrý produkt, stabilní v organických rozpouštědlech. Rozsah zabarvení, spektrograficky měřené při 596 nm, představuje antioxidační kapacitu [47].

6.1.8 Metoda používající galvinoxyl

Metoda spočívá v redukci stabilního radikálu galvinoxylu (2,6di-terc-butyl-4-[(3,5di-terc-butyl-4-oxocyklohexa-2,5dien-1-yliden)methyl]fonoxyl) látkou poskytující vodík, podobně jako u DPPH. Reakci můžeme sledovat při vlnové délce 428 nm nebo na základě ESR [39].

6.1.9 Metody hodnotící eliminace lipidové peroxidace

Lipidová peroxidace je jedna z nejvýznamnějších patologických pochodů v organismu. Ve zkratce je to oxidační degradace lipidů, kdy volné radikály "kradou" elektrony lipidům, čímž dochází k poškození buněk. Látky, které potlačují lipidovou peroxidaci mohou eliminovat iniciační kyslíkové radikály (OH•) i druhotně vzniklé radikálové meziproducty. K detekci vlivu antioxidantů na lipidovou peroxidaci se využívá mnoho jednoduchých fázových systémů, ale i složité molekuly simulující situaci *in vivo*.

- detekce produktů linolové kyseliny – iniciátorem je AAPH, sledováno při 234 nm
- spřažená oxidace β-karotenu a linolové kyseliny vzdušným kyslíkem - sledováno při 470 nm
- metoda TBA-MDA - stanovení malondialdehydu na základě jeho reakce s kyselinou thibarbiturovou, sledováno při 532 nm

[39, 40, 46]

6.2 Metody založené na hodnocení redoxní vlastností látek

Na antioxidační aktivitu lze nahlížet jako na posouzení redukční schopnosti látek. Neenzymové antioxidanty mohou reagovat s oxidanty, redukují je a tím je inaktivují. Můžeme je tedy charakterizovat jako redukční činidla.

6.2.1 Ferric reducing antioxidant potential - FRAP

Je založena na principu redoxní reakce, při níž je u antioxidantů měřena spíše redukční schopnost. V průběhu analýzy antioxidanty redukuje ze vzorku komplex Fe^{3+} -2,4,6-tri(2pyridyl-1,3,5triazin)-TPTZ. Výsledky získáváme jako absorbanci při 593 nm, jež je mírou aktivity vzorku odpovídající množství komplexu Fe^{2+} -TPTZ. Tato metoda je rychlá a jednoduchá a je možno ji automatizovat. Výsledky snížení aktivity nemusejí ovšem nutně vyjadřovat antioxidační kapacitu, odráží pouze schopnost látek redukovat ion Fe^{3+} . Měření probíhá při nefyziologicky nízké hodnotě pH (3,6). Původní využití bylo původně pro plazmu, ale později se rozšířila a používá se i u jiných biologických tekutin, rostlin, potravin aj. [40, 46, 39].

6.2.2 Cyklická voltametrie

Redoxní vlastnosti lze touto metodou hodnotit u látek, jež indikují schopnost odštěpovat elektrony. Na pracovní elektrodu se vkládá potenciálový pulz s určitou rychlostí polarizace a současně se sledují proudové odezvy v roztoku analyzované látky. Redukční schopnost látky určují dva parametry. Prvním z nich je potenciál anodického oxidačního píku E_A , jež vyjadřuje ochotu látky odevzdávat elektron - čím je hodnota nižší, tím může být látka lepší antioxidant. Druhým je anodický proud I_A , z jehož výšky určíme koncentraci látek. V řadě případů hodnoty potenciálu E_A korelují s antioxidační aktivitou určenou jinými metodami, např. DPPH [39, 40].

6.2.3 HPLC metoda s elektrochemickou detekcí

Elektroaktivní látky můžeme velmi přesně detekovat za použití amperometrických nebo coulochemických detektorů při analýze HPLC-ECD. Na pracovní elektrodu se vloží určitý kladný potenciál. Jen tehdy, pokud je při tomto potencionálu látka oxidována, se projeví pík [39].

6.2.4 Elektronová spinová rezonance

Elektronová spinová rezonance určuje na základě změny spinového stavu, jak antioxidanty inhibují zahájení procesu volných radikálů. Hydroxylový radikál je generován

buď Fentonovou reakcí, nebo fotochemicky – homolytickým štěpením peroxidu vodíku při UV záření. Antioxidanty zmenšují signál ESR, který je závislý na jejich aktivitě. K analýze antioxidačního potenciálu různých koření použil tuto techniku Lindberg Madsen (1996), také Gardner ji využil k testování antioxidačního potenciálu u černého a zeleného čaje [48].

7 Cíle bakalářské práce

Tato bakalářská práce bude primárně zaměřena na spektrofotometrické stanovení antioxidační aktivity a markerů oxidačního stresu představující indikátory poškození organismu nádorovým onemocněním u dětí a mladistvých.

Dílčím cílem mé studie bude určení vztahu mezi parametry získaných dat a onkologickou charakteristikou pacientů v korelaci s léčbou.

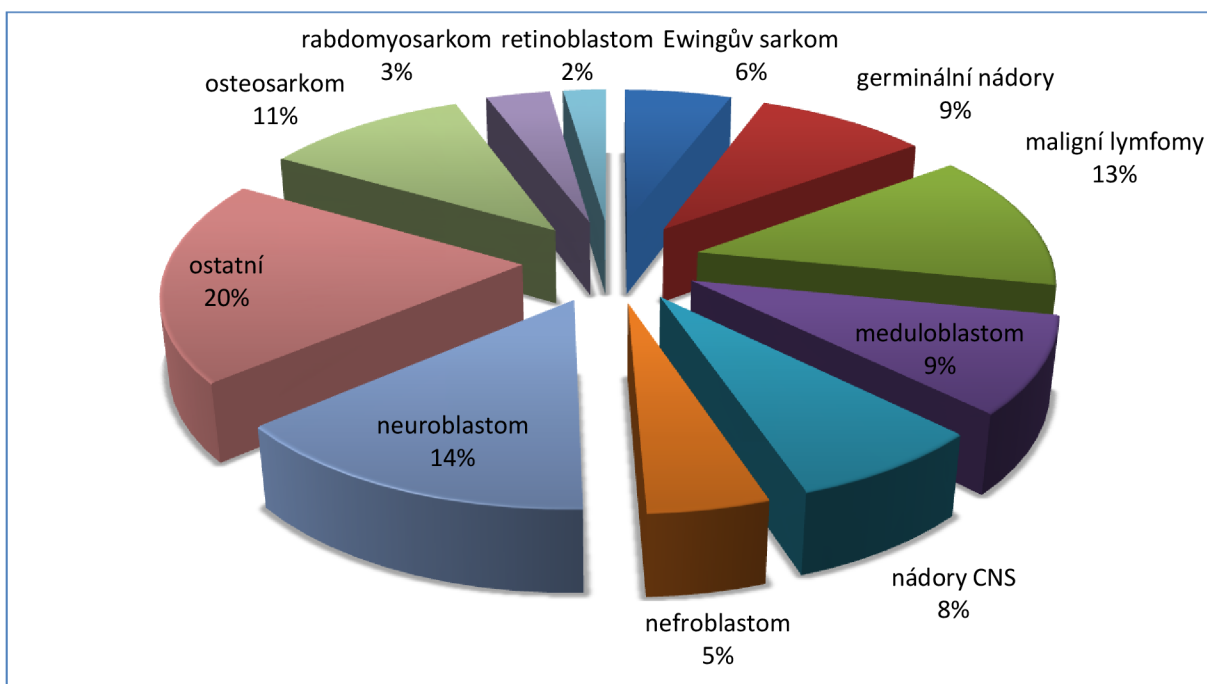
8 Experimentální část

8.1 Materiál a metody

8.1.1 Charakteristika souboru vzorků

Do prospektivní studie bylo zahrnuto celkem 190 dětských onkologických pacientů (72 žen, 118 mužů, průměrný věk 12 let, minimální a maximální věk 2 a 25 let) léčených na Klinice dětské hematologie a onkologie fakultní nemocnice v Motole. S diagnózou nádorů specifických pro děti a mladistvé (graf 1). Všechny vzorky byly zpracovány pod kódovým značením.

Graf 1: Diagnóza



8.1.2 Příprava vzorků

Vzorky krve, získané opakovaným odběrem, byly následně zpracovány za stejných laboratorních podmínek centrifugací po dobu 10 min při $2000 \text{ rpm} \cdot \text{min}^{-1}$, po té byla separovaná plazma sbírána do mikrozkušavek a ředěna fosfátovým pufrům pH 7 v poměru 1:12 (vzorek plazmy:fosfátový pufr) na požadovaný objem 400 μl . Takto zpracované vzorky byly podrobeny analýze.

Během experimentálního řešení bakalářské práce byla analýza biologických vzorků rozšířena o stanovení biochemických parametrů v krevním séru. Přehled jednotlivých parametrů včetně charakteristik shrnuje tabulka:

Tabulka 2: Biochemické parametry v krevním séru [50, 51]

analyt	referenční rozmezí	klinický význam
albumin	34-38 g/l	snížená koncentrace, tedy hypoalbuminémie, provází řadu jaterních chorob, může být příznakem ascitu nebo i nádorů
bilirubin celkový	20 $\mu\text{mol/l}$, 205 $\mu\text{mol/l}$ (novorozenci)	hyperbilirubinémie vzniká při poškození jaterních buněk, hemolytických procesech a dědičných poruchách
bilirubin přímý	5 $\mu\text{mol/l}$	
glukosa	3,9-5,6 mmol/l	diagnostika poruch sacharidového metabolismu, diabetu mellitu a idiopatické hypoglykémie
kreatinin	27-60 $\mu\text{mol/l}$	sledování onemocnění ledvin a celkového zdravotního stavu lidského organismu
stanovení proteinů reakcí s biuretovým činidlem	2 g/l	souhrnná informace se změnami doprovázející patologické stavy (u pacientů s myelomem je zjišťována hyperproteinémie)

8.1.3 Příprava pracovních roztoků

Příprava reagensie pro metodu ABTS

7 mmol.l⁻¹ ABTS• (navážka: m = 0.03841 g/10 ml) a 4.95 mmol.l⁻¹ peroxidisíran draselný (navážka: m = 0,01338 g/10 ml) byly smíchány a rozpuštěny v ACS vodě. Roztok byl po té naředěn s ACS vodou v poměru 1:9 a inkubován po dobu 12 h ve tmě.

Příprava reagensie pro metodu DMPD

Roztok 1: acetátový pufr (0,2 mol.l⁻¹, pH 5.25)

- 2,17 g octanu sodného trihydrát bylo rozpuštěno v 80 ml ASC vody, 300 μl koncentrované kyseliny octové (>99,5 %, v/v) bylo zředěno na objem 20 ml s ACS vodou, tyto dva roztoky byly následně smíchány k dosažení pH 5,5

Roztok 2: 0,74 mmol.l⁻¹ chlorid železitý

- 1 mg FeCl₃·6H₂O byl rozpuštěn v 5 ml ACS vody

Roztok 3: DMPD

- 25 mg DMPD bylo rozpuštěno v 5 ml ASC vody

Tyto tři roztoky (roztok 1, 2 a 3) byly smíchány v poměru 20:1:1 (v/v/v).

Příprava reagensie pro metodu FRAP

Roztok 1: 10 mmol.l⁻¹ roztok TPTZ

- 0,07802 g TPTZ bylo rozpuštěno v 25 ml kyselině chlorovodíkové (40 mM)

Roztok 2: 20 mM roztok FeCl₃·6H₂O

- 0,13513 g FeCl₃·6H₂O bylo rozpuštěno v 25 ml ACS vody

Roztok 3: 20mM acetátový pufr, pH 3,6

- 0,27216 g octanu sodného trihydrát bylo smícháno se 100 ml ACS vody a následně upraveno pH pomocí kyseliny octové

Tyto tři roztoky (roztok 1, 2 a 3) byly smíchány v poměru 1:1:10 (v/v/v). Získaná reagensie byla uchována při teplotě 4°C v temném prostředí.

Příprava reagensie pro metodu Free radicals

5 ml reakčního pufru ($100 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ HCL}$) bylo zředěno 45 ml ACS vody, do tohoto reakčního pufru bylo přidáno 100 μl chlorofylinu a po jeho kompletním rozpuštění bylo přidáno 0,25 ml katalyzátoru. Získaná reagensie byla skladována při teplotě 2 - 8 °C v temném prostředí.

8.1.4 Stanovení vybraných biochemických parametrů v krevním séru

Pro stanovení albuminu, bilirubinu, glukosy, kreatininu a proteinů byl použit automatický spektrofotometr BS-400 (Mindray, China), který se skládá z kyvetového prostoru (temperovaný na $37 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$), reagenčního prostoru s karuselem pro reagensie a přípravu vzorků (temperovaný na $4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) a optického detektoru. Zdrojem světla je halogeno-wolframová žárovka. Přenos vzorků a reagensí zabezpečuje robotické rameno s dávkovací jehlou. Obsah kyvet je promíchán automatickým míchadlem ihned po přidání činidla nebo vzorku o objemu 2-45 μl . Kontaminace je minimalizována díky proplachování jak dávkovací jehly, tak míchadla MilliQ vodou. Pro detekci bylo možné využít vlnových délek: 340, 380, 412, 450, 505, 546, 570, 605, 660, 700, 740, 800 nm.

- Do plastových kyvet bylo pipetováno 200 μl reagensie pro stanovení a) bílkovin, b) glukosy, c) kreatininu. Následně bylo přidáno 20 μl měřeného vzorku.
- Absorbance byla měřena 10 minut při: a) bílkoviny $\lambda = 570 \text{ nm}$, b) glukosy $\lambda = 505$, c) kreatinin $\lambda = 505 \text{ nm}$.
- Pro výpočet bylo použito hodnoty absorbance samotné reagensie a hodnoty absorbance po 10 minutové inkubaci se vzorkem.
- Hodnoty byly od sebe odečteny a výsledek přepočítán dle kalibrační křivky kyseliny galové na obsah daného parametru.

8.1.5 Stanovení antioxidační aktivity

Pro stanovení antioxidační aktivity byl použit automatický spektrofotometr BS-400 (Mindray, China).

Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody ABTS

- Do plastových kyvet bylo pipetováno 245 μ l reagentie ABTS^{*} s následným přidáním 5 μ l vzorku.
- Parametry měření absorbance: 670 nm po dobu 15 min
- Pro výpočet antioxidační aktivity byla použita hodnota absorbance samotné reagentie (A_0) a hodnota absorbance vzorku s reagentií po 15 minutách inkubace (A_{15})
- Vzorec pro výpočet výsledné hodnoty $A = A_{15} - A_0$

Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody DMPD

- Do plastových kyvet bylo pipetováno 200 μ l reagentie DMPD^{*} s následným přidáním 5 μ l vzorku.
- Parametry měření absorbance: 510 nm po dobu 15 min
- Pro výpočet antioxidační aktivity byla použita hodnota absorbance samotné reagentie (A_0) a hodnota absorbance vzorku s reagentií po 15 minutách inkubace (A_{15})
- Vzorec pro výpočet výsledné hodnoty $A = A_{15} - A_0$

Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody FRAP

- Do plastových kyvet bylo pipetováno 245 μ l reagentie FRAP^{*} metody s následným přidáním 5 μ l vzorku.
- Parametry měření absorbance: 578 nm po dobu 15 min
- Pro výpočet antioxidační aktivity byla použita hodnota absorbance samotné reagentie (A_0) a hodnota absorbance vzorku s reagentií po 15 minutách inkubace (A_{15})
- Vzorec pro výpočet výsledné hodnoty $A = A_{15} - A_0$

Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody Free radicals

- Do plastových kyvet bylo pipetováno 200 μ l připravené reagentie s následným přidáním 8 μ l vzorku.
- Parametry měření absorbance: 450 nm po dobu 560 s

- Pro výpočet antioxidační aktivity byla použita hodnota absorbance samotné reagencie (A_0) a hodnota absorbance vzorku s reagecím po 15 minutách inkubace (A_{15})
- Vzorec pro výpočet výsledné hodnoty $A = A_{15} - A_0$

9 Výsledky

Jako statistická metoda k analýze souboru dat byla zvolena četnost výskytu jednotlivých naměřených hodnot, byly vytvořeny tabulky četností (příloha č. 1: Obsah příloženého CD) s jejich grafickou reprezentací histogramy a distribuční funkce. Před výběrem vhodné popisné statistiky a pro získání primární znalosti o rozložení dat byly stanoveny směrodatné odchylky a průměry jednotlivých souborů naměřených hodnot. Vlastní analýze předcházelo vyčištění dat, které bylo klíčové pro jejich reprezentativnost.

9.1 Rozdělení podle diagnózy

Soubor pacientů byl rozdělen podle diagnózy, jako kontrolní skupina byl stanoven soubor vyléčených pacientů. Z důvodu nedostatku dat pro kvalitní statistickou výpověď, nemohlo být zpracováno porovnání u všech diagnóz.

9.1.1 Testování vazeb biochemických parametrů s onkologickým onemocněním

Byla srovnána distribuce biochemických parametrů krevního séra u jednotlivých diagnóz. Mezi skupinami pacientů se hodnoty albuminu signifikantně nelišili od referenční hodnoty (34-38 g/l) pro jednotlivá postižení. U kontrolní skupiny byla naměřena nejvyšší hodnota (2,93), nejnižší hodnota (2,20) byla zjištěna u pacientů s nefroblastomem.

Distribuce hodnot u dalšího sledovaného analytu – glukózy se v testovaném souboru významně nelišili od referenční hodnoty (3,9-5,6 mmol/l). U nádorového onemocnění neuroblastomu a osteosarkomu byly zjištěny souhlasné hodnoty (0,38), které představovaly maximální naměřenou hodnotu, kontrolní skupina měla naopak nejnižší zjištěnou hodnotu glukózy (0,32).

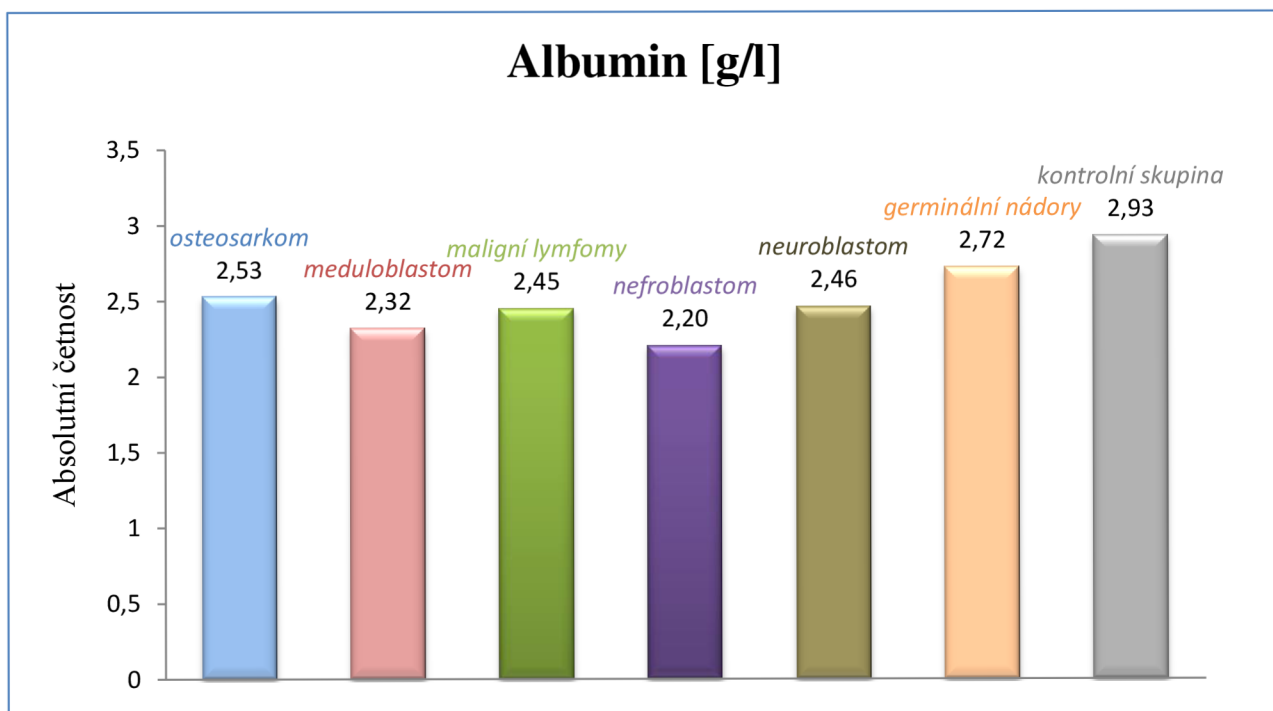
Dále byly srovnány hodnoty celkového bilirubinu mezi skupinami pacientů. U meduloblastomu (2,20) a germinálních nádorů (2,19) byly hladiny hodnot statisticky významně vyšší. U pacientů s maligními lymfomy byla naměřena nejnižší hodnota (2,04). Podobný trend byl pozorován u přímého bilirubinu, kde nejvyšší hodnota byla u meduloblastomu (0,78), osteosarkomu (0,70) a germinálních nádorů (0,65), naopak nejnižší naměřenou hodnotu měli pacienti s nefroblastomem (0,43).

Významná diference celkových proteinů byla u pacientů s nefroblastomem (3,84) a kontrolní skupiny (4,38), tento fakt může korelovat právě s lokací nádoru v těle pacienta.

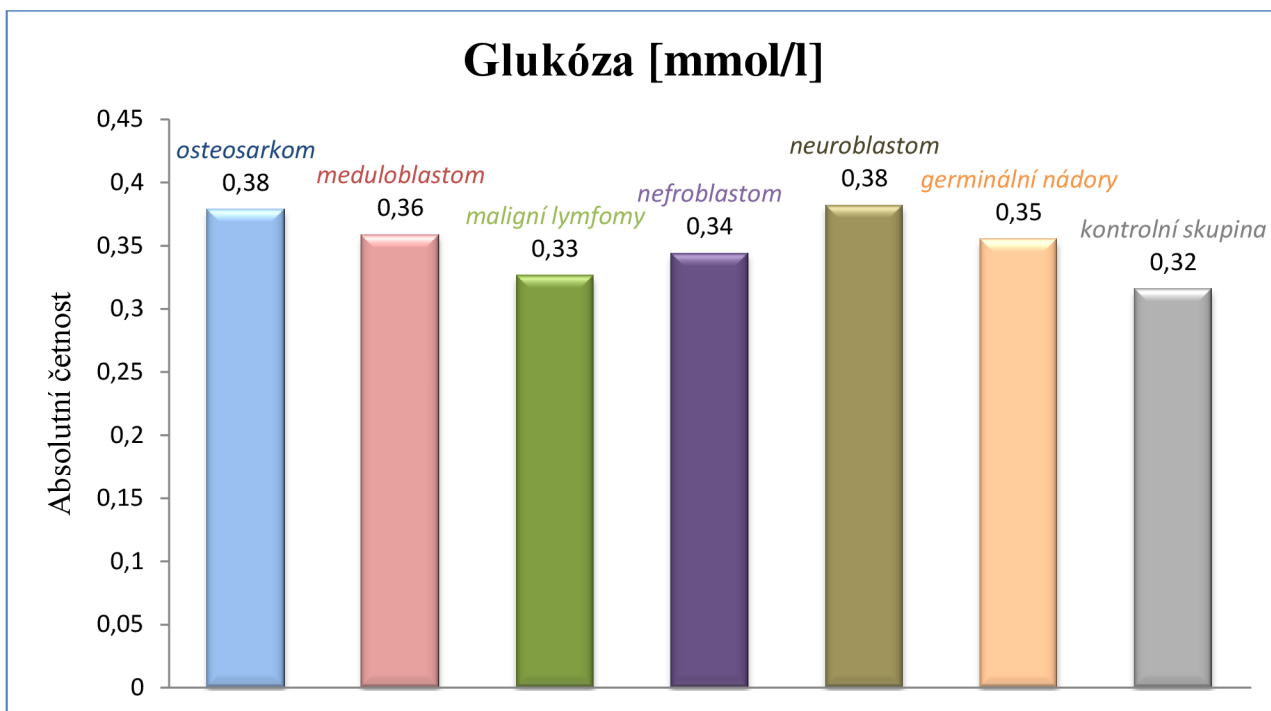
Hodnoty kreatininu (nefroblastom – 4,01, kontrolní skupina – 6,12) mají podobný trend jako u celkových proteinů, pravděpodobně souvisí s hypotézou citlivosti skupiny pacientů s nefroblastomem a jsou ovlivněny i faktory medikamentózního původu a svou roli zde má i bílkovinný stav organismu.

U sledovaných parametrů nebyla nalezena žádná významná statistická asociace.

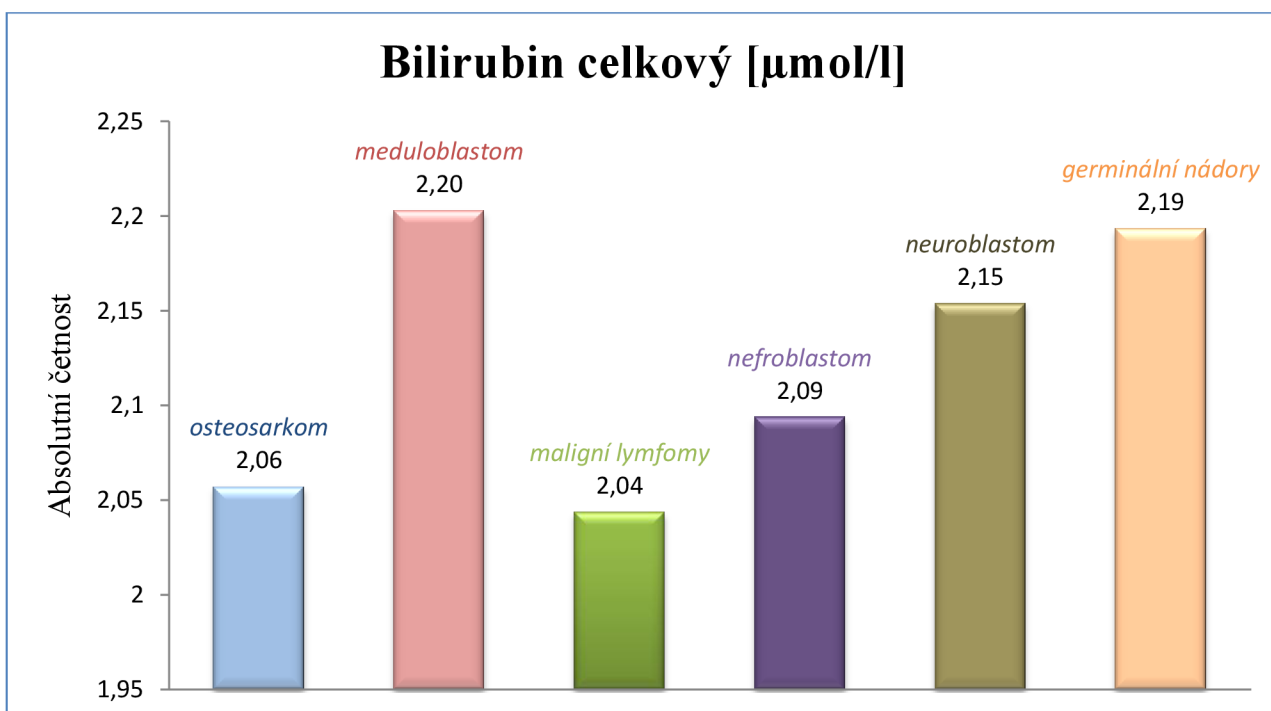
Graf 2: Histogram albuminu



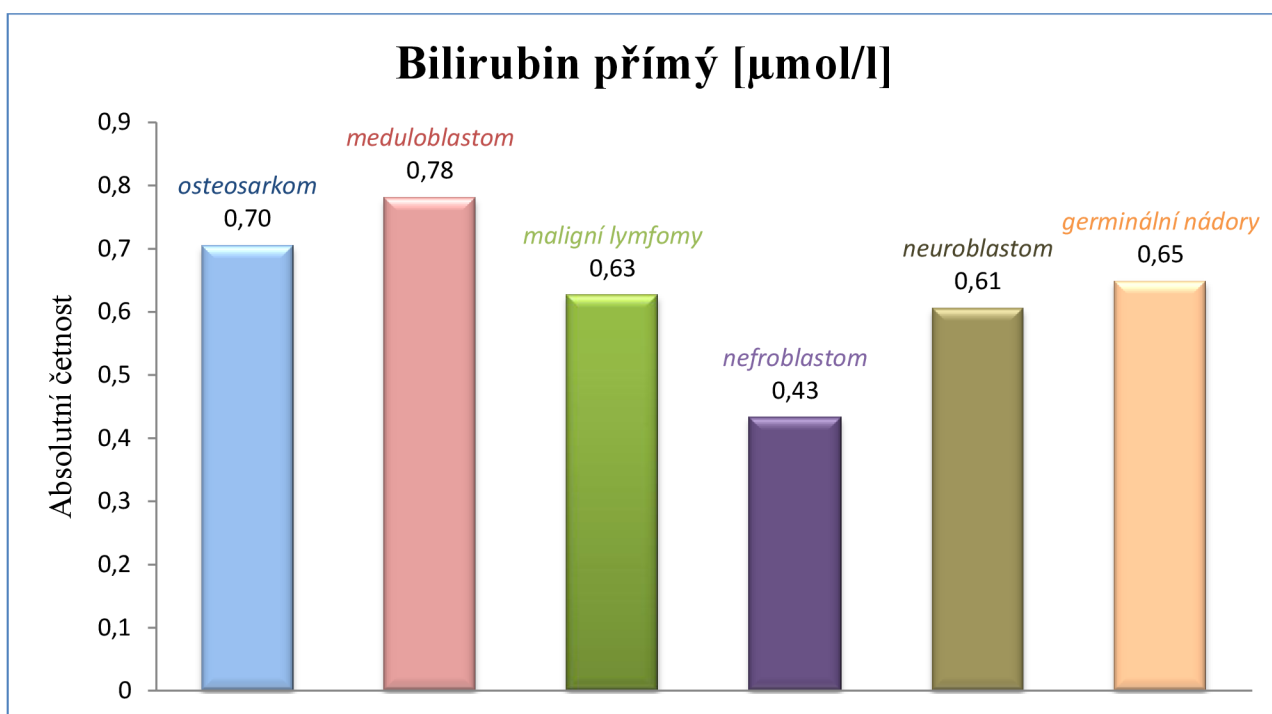
Graf 3: Histogram glukózy



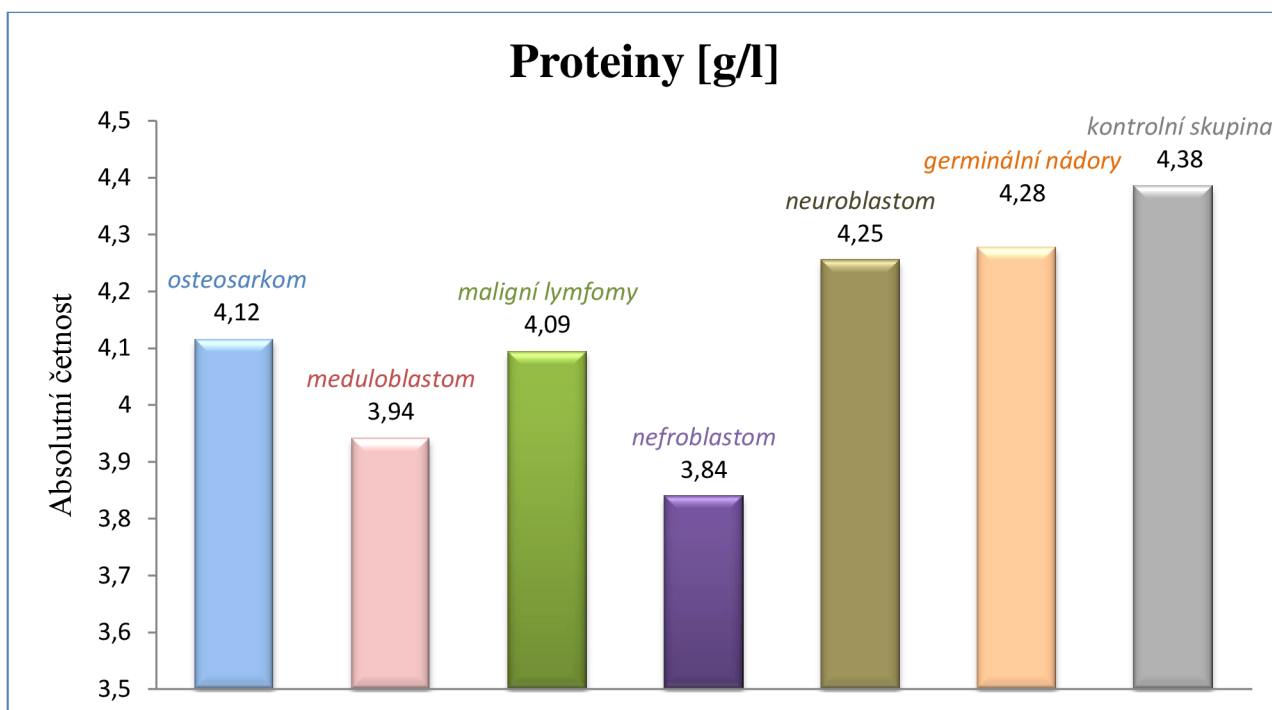
Graf 4: Histogram celkového bilirubinu



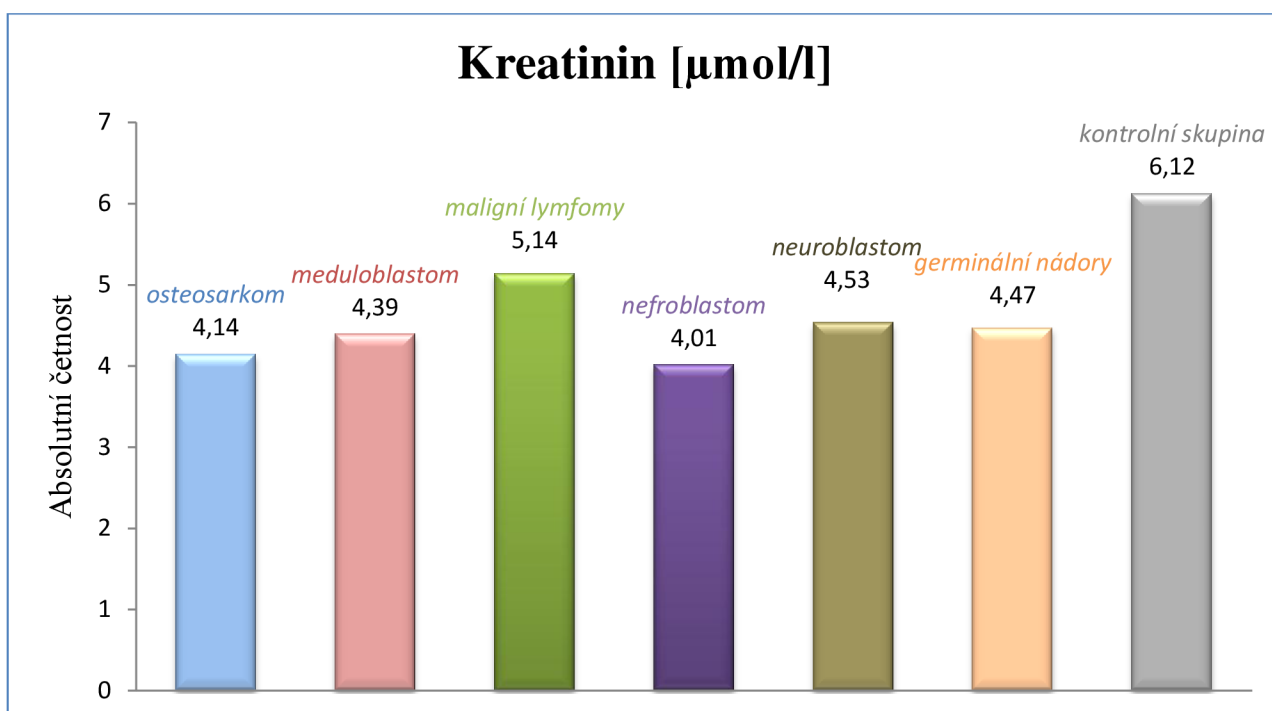
Graf 5: Histogram přímého bilirubinu



Graf 6: Histogram celkových proteinů



Graf 7: Histogram kreatininu



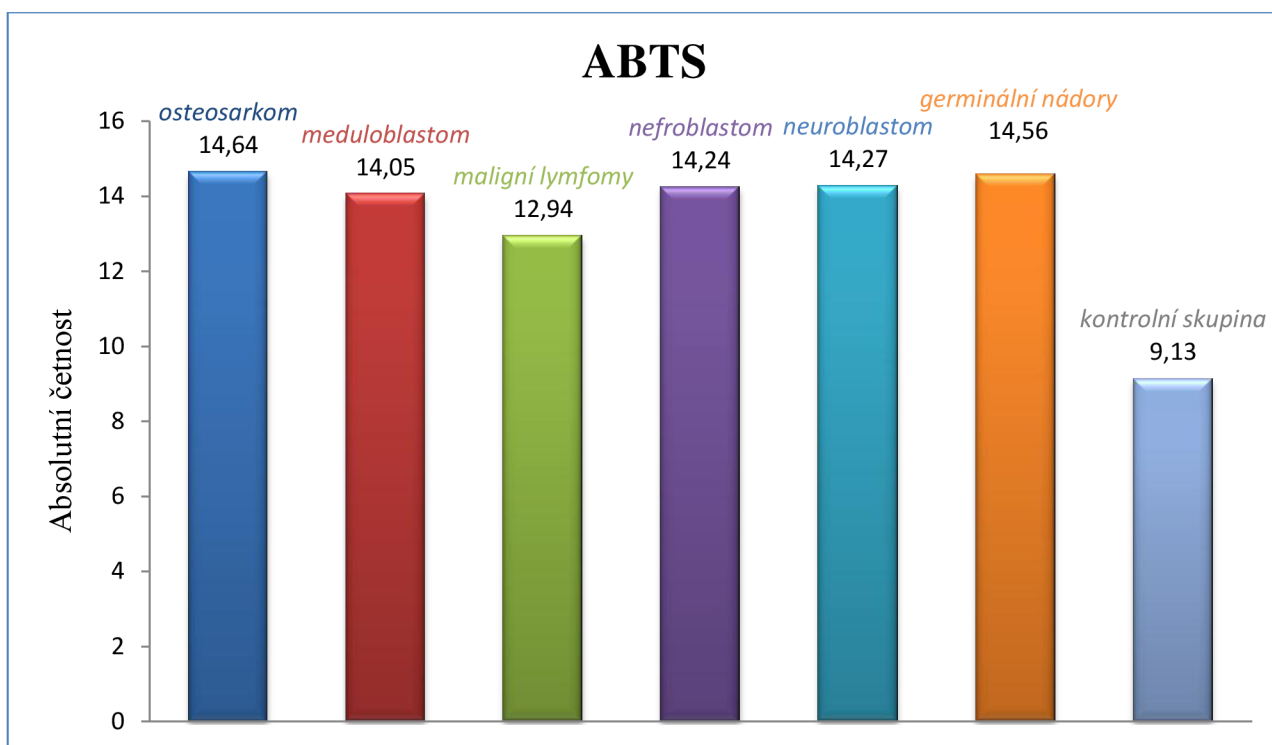
9.1.2 Testování vazeb antioxidační aktivity s onkologickým onemocněním

Byly srovnány frekvence zastoupení naměřených hodnot celkové antioxidační aktivity pro čtyři analytické metody ABTS, FRAP, Free radicals a DMPD. V celkovém souboru pacientů s onkologickým postižením u první metody ABTS byly hodnoty téměř totožné, při porovnání s kontrolní skupinou byl pozorován významný statistický pokles. Rozdíl mezi nejvyšší sledovanou hodnotou (osteosarkom 14,64) a nejnižší (kontrolní skupina 9,13) činil 5,51. Stejná diference mezi kontrolní skupinou a soubory pacientů s různými typy nádorů byla pozorována u metody FRAP, při srovnání nejvyšší hladiny sledované antioxidační aktivity u osteosarkomu (3,84) s kontrolní skupinou (0,39) byl zjištěn významný rozdíl 3,45.

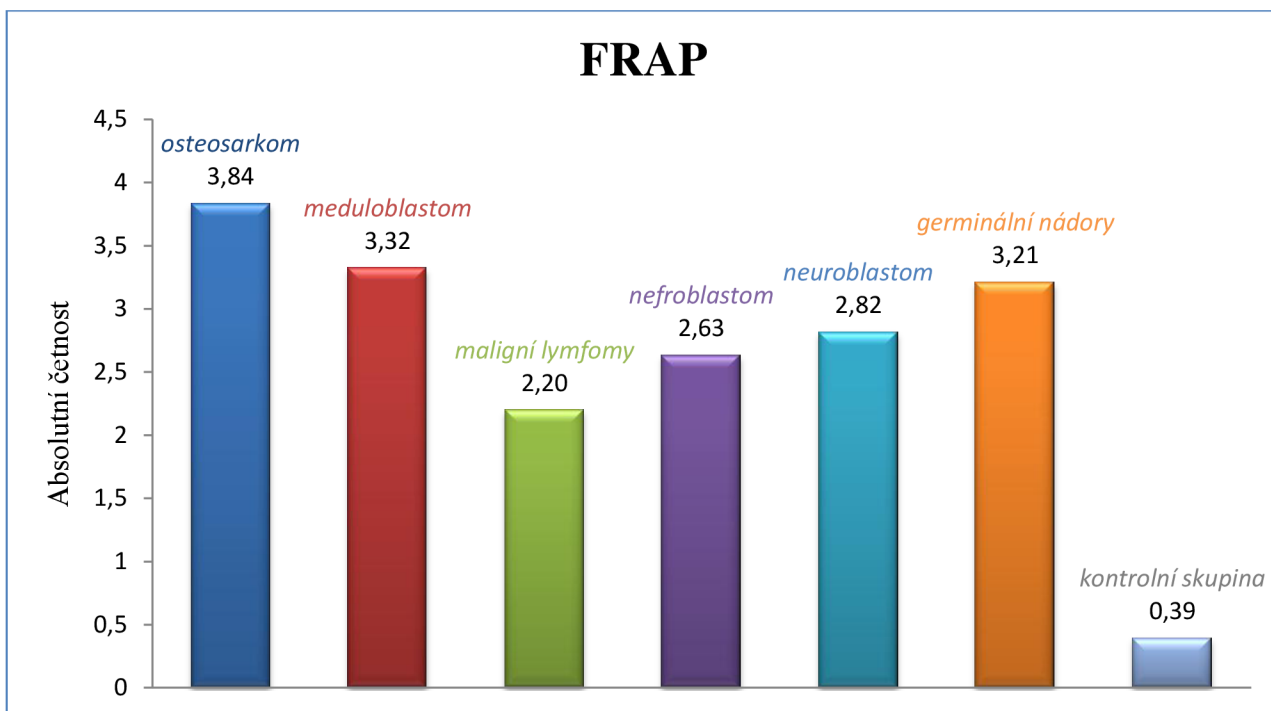
U metody Free radicals po srovnání nádorových onemocnění byla patrná variabilita mezi maligními lymfomy s nejvyšší zjištěnou hodnotou celkové antioxidační aktivity (125,03) a nefroblastomem (116,23), spolu s neuroblastomem (119,20). Osteosarkom (124,73), meduloblastom (123,09) a germinální nádory (123,59) nevykazovali významnou diferenci od hodnoty pro maligní lymfomy. Srovnáním sledovaných parametrů u metody DMPD nebyly

nalezeny statisticky významné rozdíly mezi hodnotami pro jednotlivé skupiny pacientů, jediná diference byla u hladiny neuroblastomu (17,37), jejíž hodnota byla nejnižší.

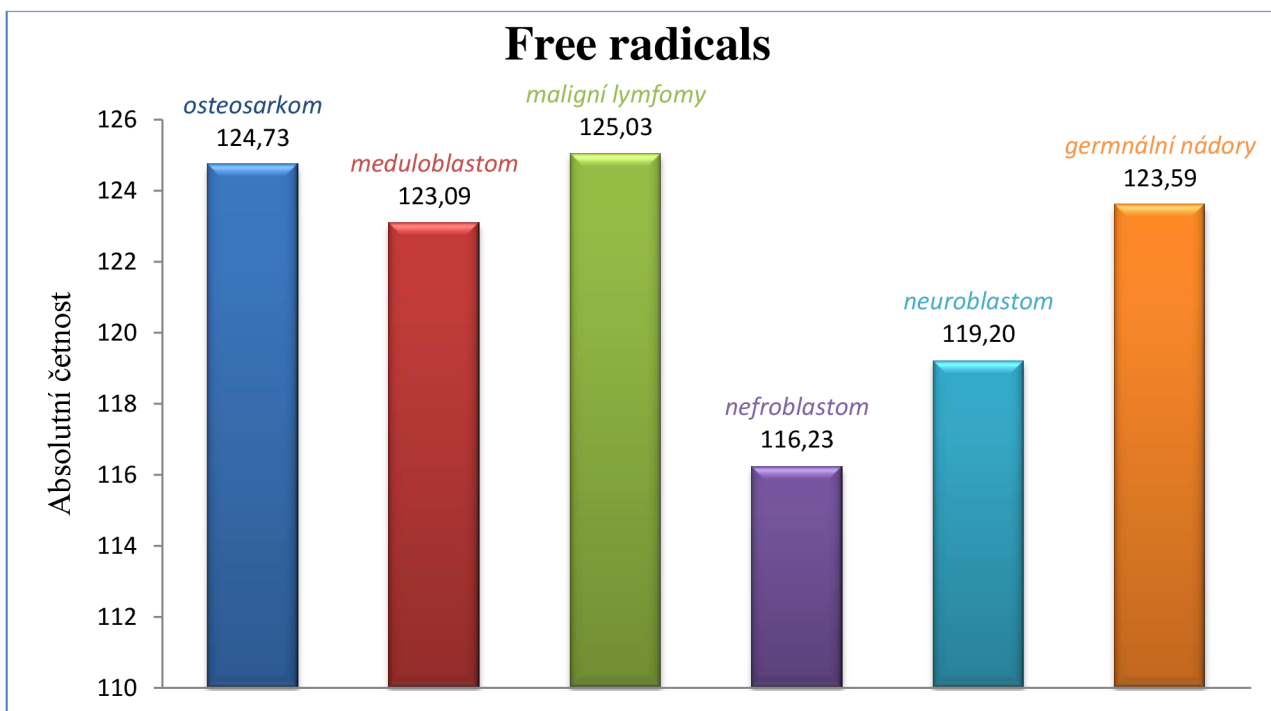
Graf 8: Histogram metody ABTS



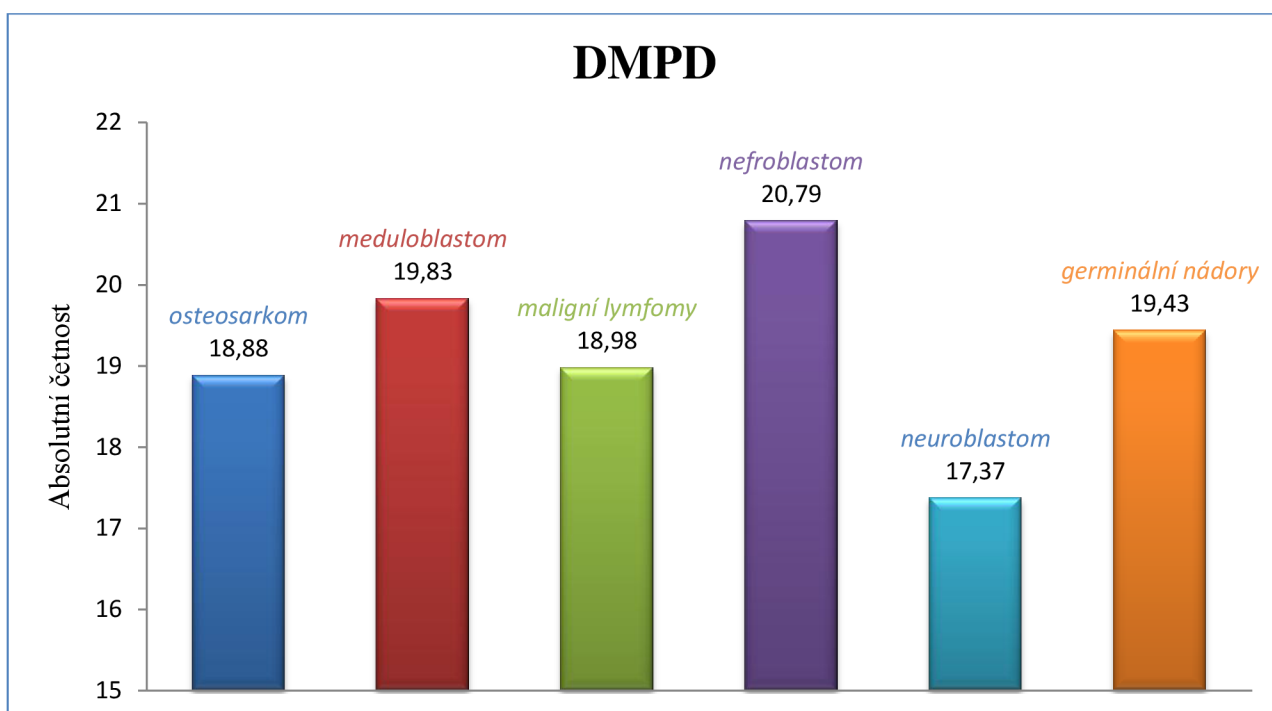
Graf 9: Histogram metody FRAP



Graf 10: Histogram metody Free radicals



Graf 11: Histogram metody DMPD



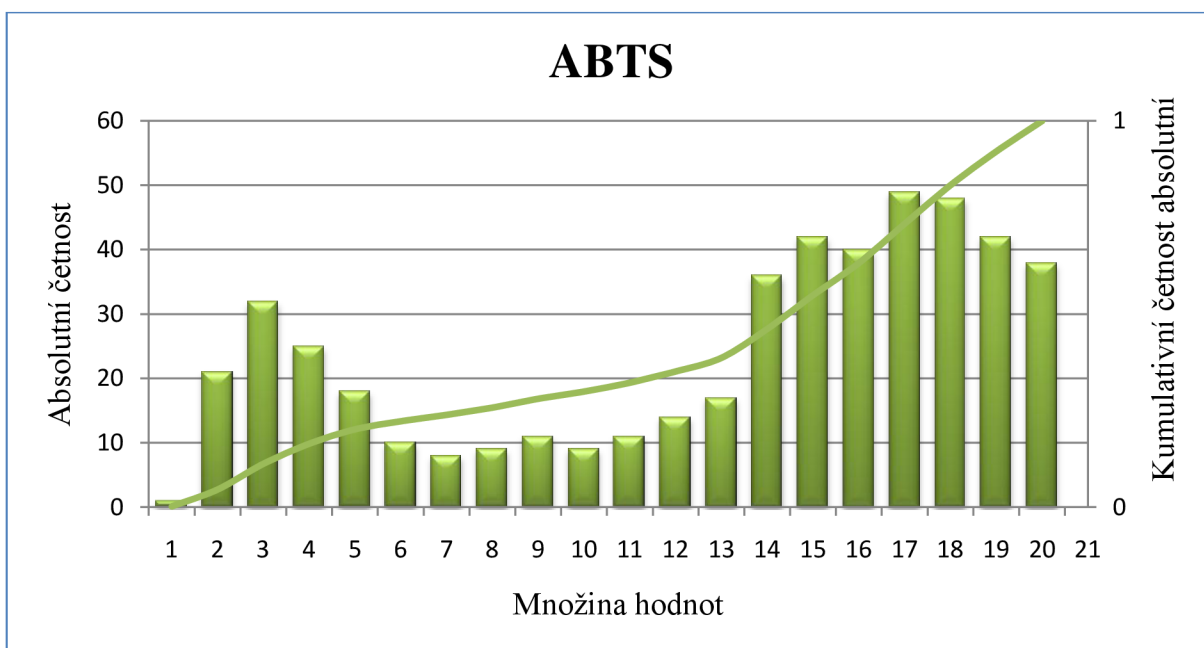
9.2 Analýza distribuce sledovaných parametrů u jednotlivých metod

Pro celkový soubor pacientů byly vytvořeny četnostní tabulky (příloha č. 2) a histogramy s distribuční funkcí, cílem této analýzy bylo získat obecnou informaci o rozložení sledovaných veličin.

U metody ABTS frekvence zastoupení dosahovala nejvyšší hodnoty u intervalu 17-18 (16,044-17,108). Druhý frekvenční pík, ale menší, byl pozorován u intervalu 3-4 (8,594-9,658). Existence dvou maxim je důkazem abnormality tohoto testu. Tento jev nastává i u metody DMPD, kde je nejvyšší intervalová četnost u hodnot třídy 16 (24,358-25,434) a u hodnot třídy 2 (9,290-10,367). Grafy naznačují možnost rozdělení souboru pacientů do dvou skupin a jejich srovnání, které by mohlo mít statistický význam i klinický dopad, tuto predikci by bylo nutné potvrdit dalším výzkumem.

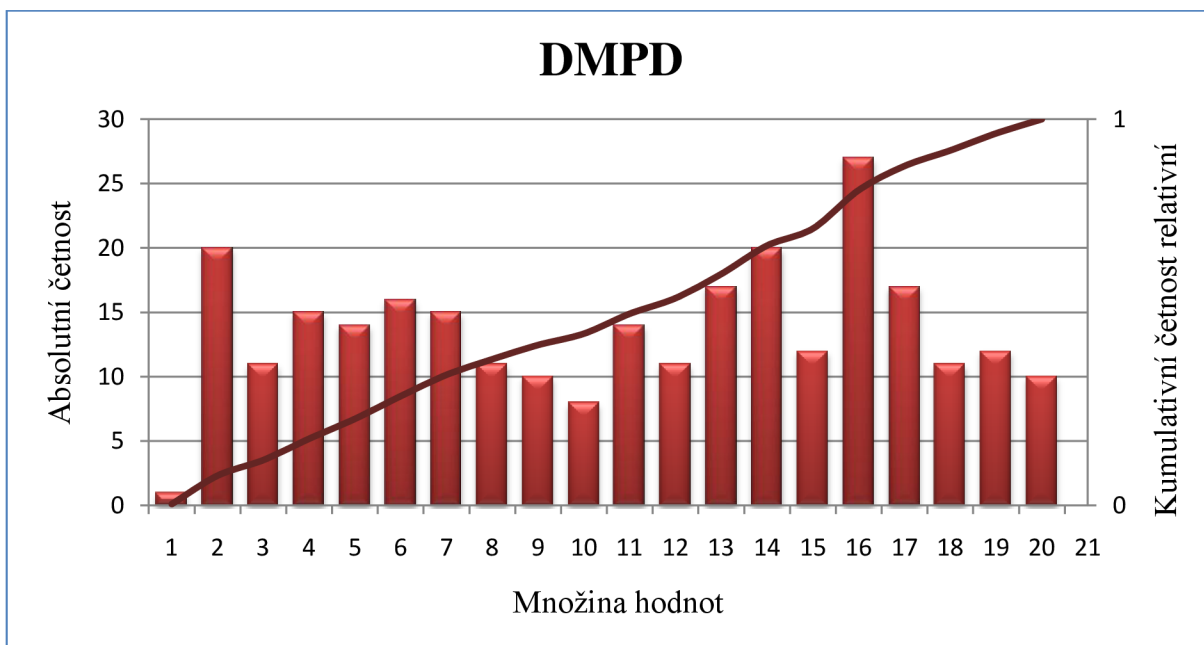
U metody Free radicals byla distribuce hodnot téměř symetrická pro hodnoty $> 95,514$, naopak u metody FRAP byla výrazná elevace u hodnot třídy 2, tedy intervalu 0,758-1,397, udáno v procentech - 49,42% pacientů mělo hodnotu 0,758.

Graf 12: Histogram s distribuční funkcí pro metodu ABTS



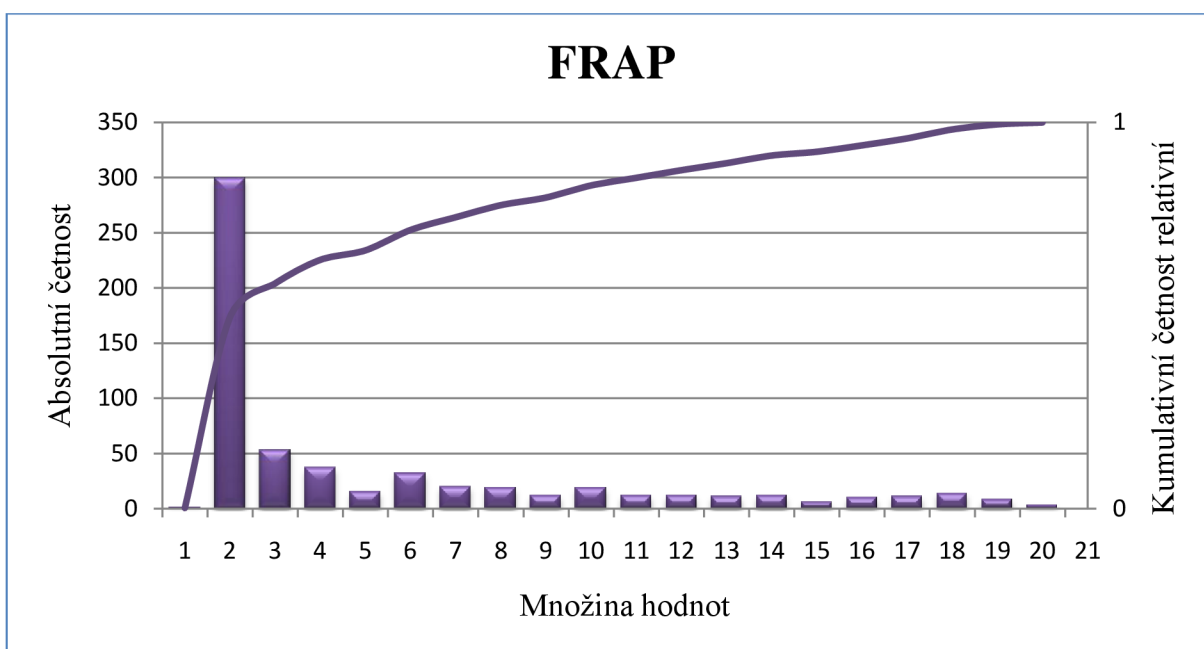
minimum	7,53
maximum	17,64
modus	16,044

Graf 13: Histogram s distribuční funkcí pro metodu DMPD



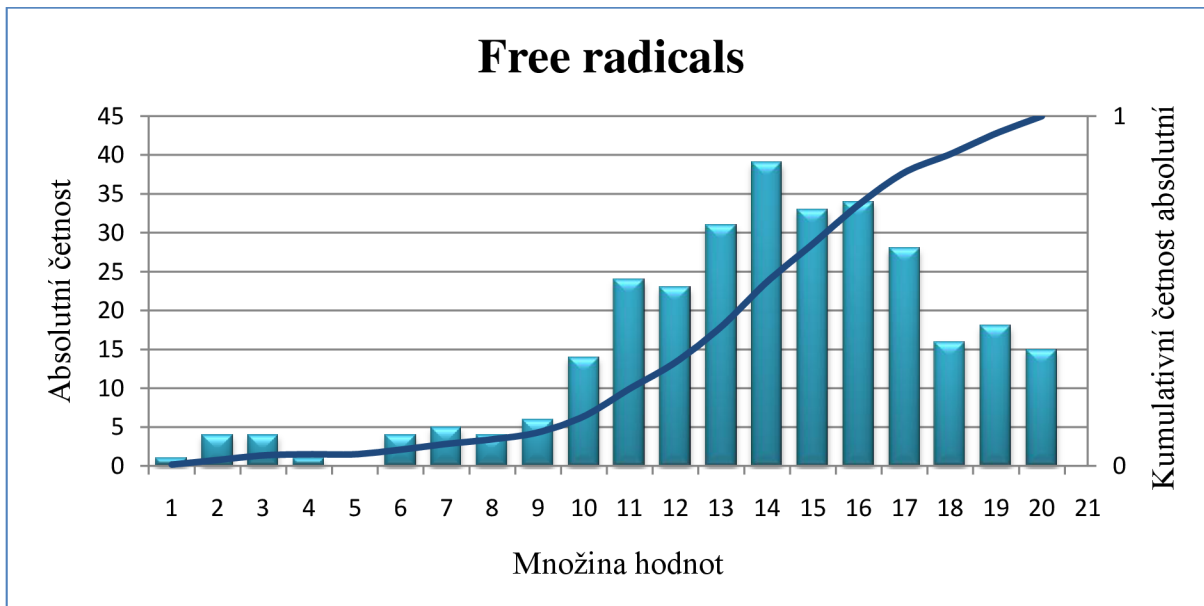
minimum	8,214
maximum	28,663
modus	24,358

Graf 13: Histogram s distribuční funkcí pro metodu FRAP



minimum	0,119
maximum	12,26
modus	0,758

Graf 15: Histogram s distribuční funkcí pro metodu Free radicals



minimum	33,93
maximum	163,94
modus	122,884

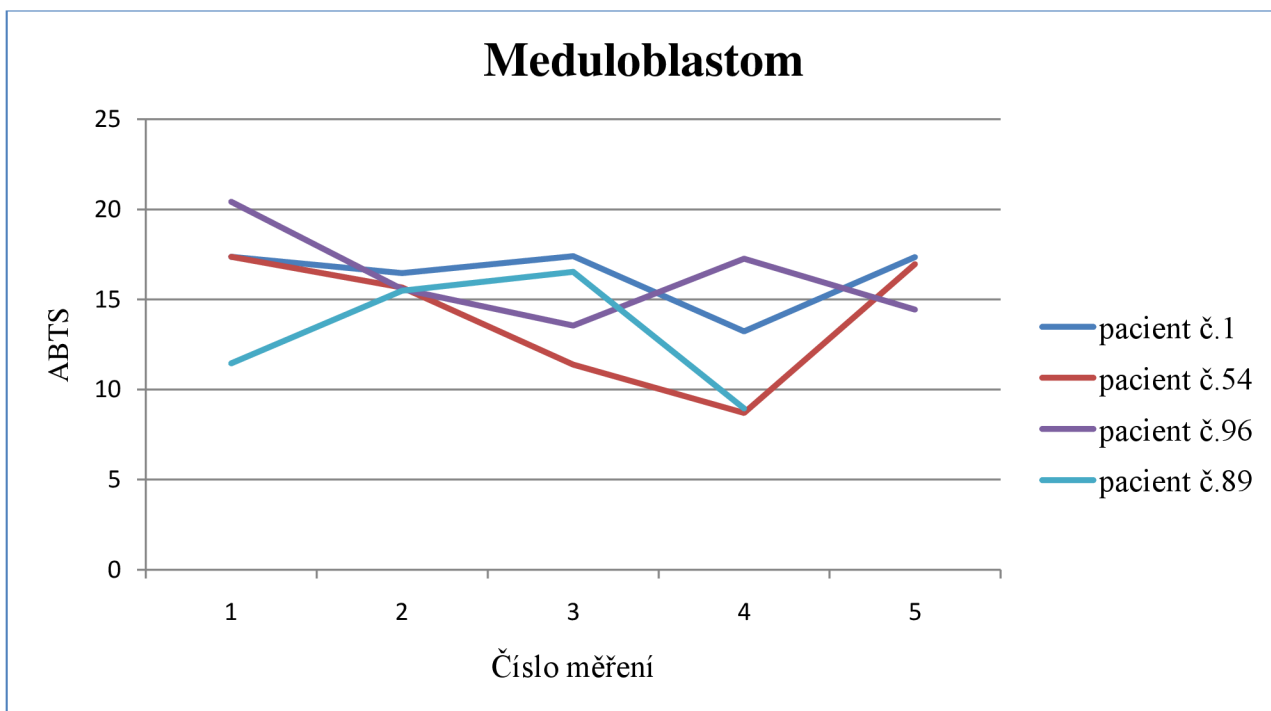
9.3 Analýza antioxidační aktivity v intervalu několika aplikovaných terapií

Do této prospektivní studie byly vybrány skupiny pacientů se shodnou onkologickou diagnózou, u kterých bylo možné doložit proběhlé terapie. Vzhledem k filtraci dat, jež vedla k vyřazení značného počtu měření, nebylo možné vytvořit přijatelnou statistickou analýzu.

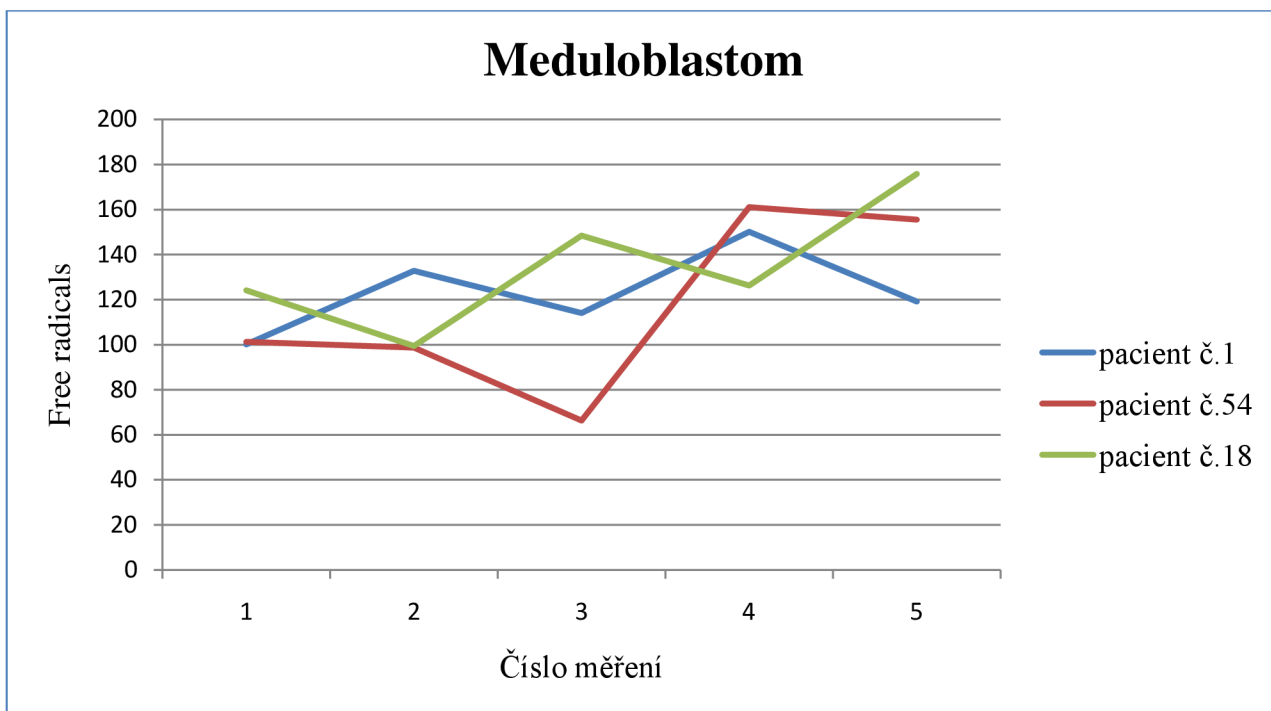
Cílem analýzy bylo zhodnotit vztah mezi aplikovanou terapií a vývojem hladiny antioxidační aktivity. V první sledované skupině byli pacienti s meduloblastomem, u kterých byla společná léčba chemoterapií a radioterapií a byli bez metastatického postižení. Celkem proběhlo 5 měření, kromě pacienta č. 89, kde nebyl indikován poslední odběr, měření č. 1 bylo provedeno vždy v době stanovení diagnózy. V druhé skupině byli pacienti s primárním nádorovým onemocněním osteosarkomem léčení chemoterapií, je nutné zmínit, že s výjimkou pacienta č. 77, nastalo u zbývajících pacientů úmrtí. Celkem proběhlo 6 měření.

Nepotvrdili jsme efekt terapie ve vztahu k antioxidační aktivitě a nenalezli žádnou signifikantní statistickou asociaci, v diferenci hodnot se pravděpodobně uplatňují individuální faktory. K získání definitivního výsledku jsme neměli reprezentativní data, která by splňovala vybraná kritéria pro tuto analýzu.

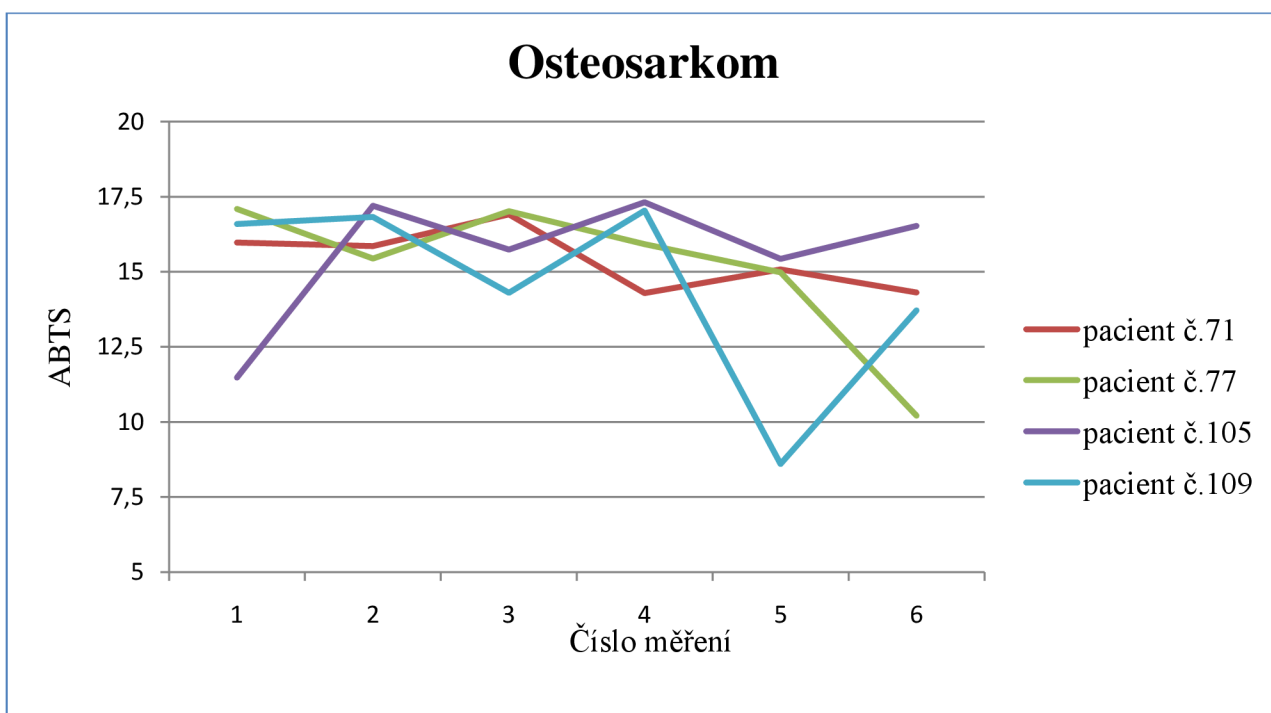
Graf 16: Soubor pacientů s meduloblastomem, metoda ABTS



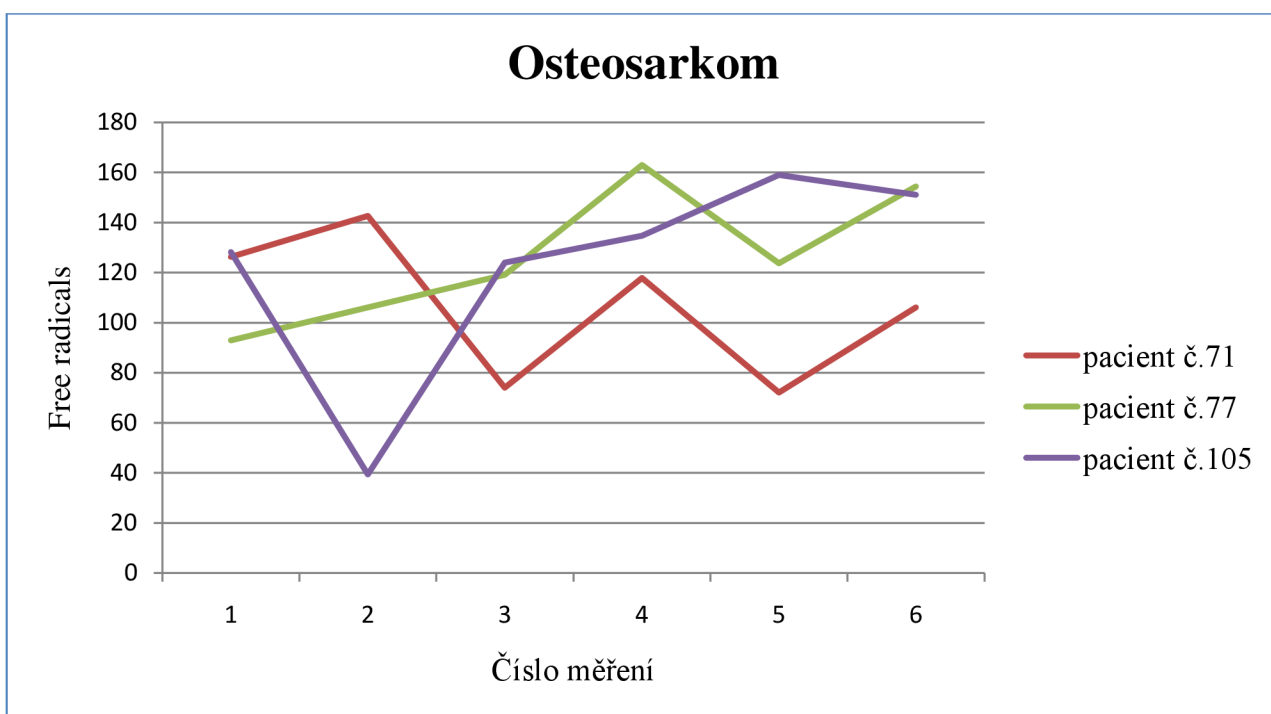
Graf 17: Soubor pacientů s meduloblastomem, metoda Free radicals



Graf 18: Soubor pacientů s osteosarkomem, metoda ABTS



Graf 19: Soubor pacientů s osteosarkomem, metoda Free radicals



10 Závěr

Měření antioxidační aktivity představuje významný aspekt v oblasti klinické medicíny. Cílem bylo využít potenciál této metody zejména v diagnostice onkologických onemocnění a potvrdit význam oxidativního stresu jako diagnostického markeru. V teoretické části byla popsána etiologie a patogeneze nádorového procesu. Značná část je věnována popisu rakoviny z různých hledisek – od její molekulární podstaty, genetických transformací až po manifestaci u skupiny pacientů dětského věku. Dále je uveden přehled nepoužívanějších metod pro stanovení antioxidační aktivity, jejich srovnání by bylo vhodnou náplní další studie.

Ze získaných dat vyplývá hypotéza založená zejména na informaci o jejich velkém rozptylu, že rozložení hodnot biochemických parametrů a antioxidační aktivity jsou významně ovlivněny celou řadou faktorů. Svou roli zde hraje kromě genetické predispozice pravděpodobně i přítomnost chorob, chronických zánětů a infekcí, které negativně narušují celkový zdravotní stav pacienta, dále lokace nádorů, metastázy i samotná léčba. Méně významnými faktory v našem souboru pacientů bylo pohlaví a věk. Pro další výzkum by bylo nutné všechny tyto aspekty monitorovat.

Řada studií prokázala, že karcinom má zvýšenou produkci volných radikálů v porovnání s okolní tkání a důsledkem tohoto chronického působení oxidačního stresu je snížení schopnosti antioxidačních obranných mechanismů. Nabízí se tedy možná interpretace závěru u kontrolní skupiny, tedy souboru vyléčených pacientů, že vlivem dlouhodobého působení oxidačního stresu došlo ke snížení celkové antioxidační aktivity.

Analýzou antioxidační aktivity v intervalu několika aplikovaných terapií nebyla prokázána žádná přímá kauzalita mezi léčbou a efektivitou antioxidační obrany, interpretace je zde ale velmi obtížná vzhledem k značné variabilitě mezi jednotlivými pacienty a různými druhy nádorů.

Nebyla nalezena žádná korelace mezi výsledky stanovenými různými metodami celkové antioxidační aktivity, pravděpodobně se zde uplatňuje variabilita metod, modulována reakčními mechanismy zhášení radikálových částic, průběhy těchto reakcí a jejich limity.

Nepodařilo se prokázat žádnou významnou statistickou asociaci, která by měla potenciální diagnostický přínos v klinické praxi. Ze závěrů usuzují, že stanovení antioxidační

aktivity nepředstavuje v problematice onkologických onemocnění senzitivní indikační parametr.

11 Seznam použitých zkratek

ABTS	diamonná sůl kyseliny 2,2'-azino-bis(3ethylbenzthiazolin-6-sulfonové), metoda stanovení antioxidační aktivity
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome (Syndrom získaného selhání imunity)
AOE	polymorfismy antioxidačních enzymů
CNS	centrální nervová soustava
DMPD	N, N-dimethyl-p-fenylendiamin, metoda stanovení antioxidační aktivity
DNA	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
DPPH	diphenylpicrylhydrazyl, metoda stanovení antioxidační aktivity
EBV	vir Epsteina a Barrové
ESR	Electron Spin Resonance (elektronová spinová rezonance)
FRAP	Ferric Reducting Antioxidant Potential, metoda stanovení antioxidační aktivity
GIT	gastrointestinální trak
HAT	Hydrogen Atom Transfer, přenos atomu vodíku
HNE	aldehyd trans-4-hydroxy-2-nonenal
HNPCC	Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom)
HPLC	performance liquid chromatography (vysokoučinná kapalinová chromatografie)
LMWA	low molecular weight antioxidant
LOH	loss of heterozygosity (ztráta heterozygosity)
MDH	malondialdehyd
MH	Hodgkinova choroba

MMR	Mismatch repair genes (Mutátorové reparační geny)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NBL	neuroblastom
NER	nucleotide excision repair system
NHL	Non-Hodgkinův lymfom
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity, metoda posouzení antioxidační aktivity
PDGF	platelet derived growth factor, růstový faktor krevních destiček
PSA	Prostate-specific antigen, prostatický specifický antigen
RMS	rabdomyosarkom
ROS	Reactive Oxygen Species, reaktivní formy kyslíku
SET	Single Electron Transfer, přenos elektronu
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, parametr sloužící ke srovnání aktivity antioxidantu s trollem
UV	ultraviolet spektrum (ultrafialová oblast spektra)
VR	volné radikály
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)
WN	Wilmsův nádor

12 Seznam literatury

- [1] KOUTECKÝ, J; KABIČKOVÁ, E; STARÝ, J.: *Dětská onkologie pro praxi*. Praha : TRITON, 2002. 179 s. ISBN 80-7254-288-5.
- [2] REJTHAR, A; VOJTĚŠEK, B.: *Obecná patologie nádorového růstu*. Praha : GRADA PUBLISHING, 2002. 206 s. ISBN 80-247-0238-X.
- [3] KLENER, P. *Klinická onkologie*. Praha : Galén, 2002. 686 s. ISBN 80-7262-151-3.
- [4] KOLÁŘ, Z.: *Molekulární patologie nádorů*. Olomouc: EPAVA Olomouc, 2003. 168 s. ISBN 80-86297-15-2.
- [5] BOLAND, R. *Encyclopedia of Life Sciences* [online]. leden 2006 [cit. 2010-11-11]. Tumor Formation: Number of Mutations Required. Dostupné z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0006050/full>>.
- [6] KIMMEL, M. *Evolution and Cancer: A Mathematical Biology Approach* [online]. duben 2009 [cit. 2010-11-5]. Cancer models, genomic instability and somatic cellular Darwinian evolution. Dostupné z WWW: <<http://www.biology-direct.com/content/5/1/19>>.
- [7] MORANGE, M. *Encyclopedia of Life Sciences* [online]. květen 2003 [cit. 2010-11-5]. History of Cancer Research. Dostupné z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0003088/full>>.
- [8] ALISON, M. R. *Encyclopedia of Life Sciences* [online]. duben 2001 [cit. 2010-9-28]. Cancer. Dostupné z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0001471/full>>.
- [9] BENVENUTI, S.; ARENA, S.; BARDELLI, A. Identification of cancer genes by mutational profiling of tumor genomes. *Febs Letters*. 2005, 579, s. 1884-1890.
- [10] WOLYNIEC, K.; HAUPT, S.; HAUPT, Y. *Encyclopedia of Life Sciences* [online]. prosinec 2009, [cit. 2010-11-18]. P53 and Cell Death. Dostupný z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0021824/full>>.

- [11] PETRUŽELKA, L.; KONOPÁSEK, B. *Klinická onkologie*. Praha : Karolinum, 2003. 274 s. ISBN 80-246-0395-0.
- [12] MITELMAN, F. *Encyclopedia of Life Sciences* [online]. září 2010 [cit. 2010-11-19]. Cancer: Chromosomal Abnormalities. Dostupné z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0005552.pub2/full>>.
- [13] GEIGER, T.; COX, J.; MANN, M. *PLoS genetiky* [online]. září 2010 [cit. 2010-11-19]. Proteomic Changes Resulting from Gene Copy Number Variations in Cancer Cells. Dostupný z WWW: <<http://www.plosgenetics.org/article/info:doi/10.1371/journal.pgen.1001090>>.
- [14] OHIRA, M.; NAKAGAWARA, A. *Cancer Science* [online]. červenec 2010 [cit. 2010-11-20]. Global genomic and RNA profiles for novel risk stratification of neuroblastoma. Dostupný z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1349-7006.2010.01681.x/full>>.
- [15] UCHIDA, K. *Encyclopedia of Life Sciences* [online]. leden 2006 [cit. 2010-11-22]. Gene Amplification and Cancer. Dostupné z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0006047/full>>.
- [16] MITELMAN, F. *Encyclopedia of Life Sciences* [online]. září 2010 [cit. 2010-11-22]. Cancer: Chromosomal Abnormalities. Dostupný z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0005552.pub2/full>>.
- [17] OHIRA, M.; NAKAGAWARA, A. *Cancer Science* [online]. listopad 2010 [cit. 2010-11-27]. Global genomic and RNA profiles for novel risk stratification of neuroblastoma. Dostupný z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1349-7006.2010.01681.x/full>>.
- [18] CANTY, C. A. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners* [online]. březen 2009 [cit. 2010-11-27]. Retinoblastoma: An overview for advanced practice nurses. Dostupný z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-7599.2008.00378.x/full>>.

- [19] MANGHAM, D. C.; WILLIAMS A; MCMULLAN D. J.; MCCLURE J.; SUMATHI V. P.; GRIMER R. J., DAVIES A. M. *Histopathology* [online]. březen 2006 [cit. 2010-11-27]. Ewing's sarcoma of bone: the detection of specific transcripts in a large, consecutive series of formalin-fixed, decalcified, paraffin-embedded tissue samples using the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Dostupný z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2559.2006.02318.x/full>>.
- [20] *Histopathology* [online]. 1998 [cit. 2010-11-27]. Renal tumours of childhood. Dostupný z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2559.1998.00344.x/full>>.
- [21] ALDINUCCI, D.; ANNUZIATA G.; PINTO A.; DE FILIPPE R.; CARBONE A. *The Journal of Pathology* [online]. červenec 2010 [cit. 2010-11-28]. The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumour growth and immune escape. Dostupný z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.27111/full>>.
- [22] CZEKAJOVÁ, A. *Sledování frekvence získaných chromosomových aberací u dětských onkologických*. Brno, 2008. 73 s. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity, Ústavu experimentální biologie, oddělení genetiky a molekulární biologie. Vedoucí diplomové práce RNDr. Alexandra Oltová.
- [23] ŠKODA, J. *Genetické abnormality u solidních nádorů dětského věku: změny karyotypu a klonální selekce v průběhu in vitro kultivací*. Brno, 2009. 69 s. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity, Ústavu experimentální biologie, oddělení genetiky a molekulární biologie. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Renata Veselská, Ph.D., M.Sc.
- [24] *World Health Organization* [online]. únor 2009 [cit. 2010-10-28]. Cancer. Dostupné z WWW: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>>.
- [25] SVOBODA, M. *Prediktivní faktory maligních lymfomů - aplikace DNA mikročipů u lymfoidních malignit*. Brno, 2007. 169 s. Dizertační práce na Lékařské fakultě Masarykovy univerzity. Vedoucí dizertační práce prof. MUDr. Aleš Rejthar, CSc.

- [26] KARIHTALA, P.; SOINI, Y. *APMIS* [online]. leden 2007 [cit. 2010-11-28]. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. Dostupný z WWW:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_514.x/full>.
- [27] LAU T, Y. A.; WANG, Y.; CHIU, J. *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. květen 2008, [cit. 2010-11-28]. Reactive oxygen species: Current knowledge and applications in cancer research and therapeutic. Dostupný z WWW:
<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.21655/full>>.
- [28] AYCICEK, A.; EREL, O.; KOCYIGIT, A. *Pediatrics International* [online]. prosinec 2005 [cit. 2010-11-28]. Decreased total antioxidant capacity and increased oxidative stress in passive smoker infants and their mothers. Dostupný z WWW:
<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1442-200x.2005.02137.x/full>>.
- [29] SALZMAN, R. *Vztah parametrů oxidativního stresu k onkologické charakteristice spinocelulárních karcinomů hlavy a krku*. Brno, 2007. 41 s. Dizertační práce na Masarykově univerzitě. Vedoucí dizertační práce Prof. MUDr. Rom Kostřica, CSc.
- [30] CONNIE CHEN, S.; SQUIRE, J. A.; WELLS, P. G. *Cancer* [online]. duben 2009 [cit. 2010-12-03]. Reduced tumorigenesis in p53 knockout mice exposed in utero to low-dose vitamin E. Dostupný z WWW:
<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.24130/full>>.
- [31] PÁCAL, L. *Genetická variabilita v genech určujících intenzitu oxidačního stresu jako potenciálně významný faktor progresu vybraných chronických onemocnění*. Brno, 2008. 80 s. Dizertační práce na Lékařské fakultě Masarykovy univerzity, Ústav patologické fyziologie. Vedoucí dizertační práce prof. MUDr. Kateřina Kaňková, Ph.D.
- [32] MOLIDOR, R.; STURN, A.; MAURER, M.; TRAJANOSKI, Z. New trends in bioinformatics: from genome sequence to personalized medicine. *Experimental Gerontology* 2003, 38, s. 1031-1036.
- [33] WEE-CHUNG LIEW, A.; YAN, Y.; YANG, M.. Pattern recognition techniques for the emerging field of bioinformatics. *Pattern Recognition*. 2005, 38, s. 2055-2073.

- [34] CANDIANO, G.; PETRETTO, A.; BRUSCHI, M.; SANTUCCI, L.; DIMUCCIO, V.; PRUNOTTO M.; GUSMANO R.; URBANI A.; GHIGGERE G. M. The oxido-redox potential of albumin: Methodological approach and relevance to human diseases. *Journal of Proteomics*. 2009, 73, s. 188-195.
- [35] IMARAM, W.; GERSCH, CH.; KIM, K. M.; JOHNSON, R. J.; HENDERSON, G. N.; ANGERHOFER, A. Radicals in the reaction between peroxyxynitrite and uric acid identified by electron spin resonance spectroscopy and liquid chromatography mass spectrometry. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010, 49, s. 275-281.
- [36] KOMRSKOVÁ, D. *Antioxidační mechanismy v prevenci oxidativního poškození*. Brno, 2006. 79 s. Dizertační práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity. Vedoucí dizertační práce RNDr. Milan Číž, Ph.D.
- [37] CHVÁTALOVÁ, K. *Studium antiradikálové aktivity fenolových kyselin a jejich vlivu na redoxní stav železa a mědi*. Brno, 2006. 154 s. Dizertační práce na Lékařské fakultě Masarykovy univerzity. Vedoucí dizertační práce Mgr. Jiří Slanina, PhD.
- [38] *Molekular diversity preservation international* [online]. 1996 [cit. 2010-12]. Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extracts of Some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements . Dostupný z WWW: <<http://www.mdpi.org/sensors/papers/s7102080.pdf>>.
- [39] PAULOVÁ, H.; BOCHAŘOVÁ, H.; TÁBORSKÁ, E. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*. 2004, 98, 174-179.
- [40] *Royal society of chemistry* [online]. 2010 [cit. 2010-12]. Advancing the chemical sciences. Dostupný z WWW: <http://www.rsc.org/delivery/_ArticleLinking/DisplayArticleForFree.cfm?doi=b009171p>.
- [41] *The full wiky* [online]. 2009 [cit. 2010-12]. Dostupný z WWW: <<http://www.thefullwiki.org/ABTS>>.
- [42] *Wikipedia* [online]. 2001 [cit. 2010-12]. The free Encyclopedia. Dostupný z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Oxygen_radical_absorbance_capacity>.

- [43] PAWLAK, K.; BYLKA, W.; JAZUREK, B.; MATLAWSKA, I.; SIKORSKA, M.; MANIKOWSKI, H.; BIALEK-BYLKA, G. Antioxidant activity of flavonoids of different polarity, assayed by modified ABTS cation radical decolorization and EPR technique. *Acta Biologica Cracoviensia*. 2010, 52, s. 97-104.
- [44] *Natur Solutions* [online]. 2008 [cit. 2010-12]. Dostupný z WWW: <<http://www.naturalsolution.co.kr/tech21e.html>>.
- [45] SOCHOR, J.; BABULA, P.; KRŠKA, B.; HORNA, A.; PROVAZNÍK, I. Evaluation of Output Signals from CoulArray Detector for Determination of Antioxidant Capacity of Apricots Samples. In *Analysis of Biomedical Signals and Images. Analysis of Biomedical Signals and Images*. Brno: VUT v Brně, 2010. s. 209-214. ISBN: 978-80-214-4106-4. ISSN: 1211-412X.
- [46] *Články a informace z různých oblastí lékařství* [online]. 2006 [cit. 2010-12]. Dostupný z WWW: <<http://www.biology.estranky.cz/clanky/biochemie/peroxidace-lipidu>>.
- [47] CHARALAMPIDIS, P. S.; VELTSISTAS, P.; KARKABOUNAS, S.; EVANGELOU, A. Blue CrO₅ assay: A novel spectrophotometric method for the evaluation of the antioxidant and oxidant capacity of various biological substances. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2009, 44.
- [48] DRIS, R.; JAIN, M. S. *Production Practices and Quality Assessment of Food Crops : Quality Handling and Evaluation*. Kluwer: Academic Publishers, 2004. 633 s. ISBN: 978-1-4020-1700-1.
- [49] ADAM, Z.; VORLÍČEK, J.; KOPTÍKOVÁ, J.. *Obecná onkologie a podpůrná léčba*. Praha: Grada Publishing, 2003. 788 s. ISBN 80-247-0677-6.
- [50] DASTYCH, M. *Klinická biochemie*. Brno: Masarykova univerzita, 2008. 232 s. ISBN 978-80-210-4572-9.
- [51] ŠVOMOVÁ, M. *Kritická validace modelů využívaných k odhadu glomerulární filtrace s ohledem na jejich využitelnost v onkologické klinické praxi*. Brno, 2009. 71 s. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity. Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Ladislav Dušek, Dr.

13 Přílohy

13.1 Příloha č. 1: Obsah přiloženého CD

- příklad četnostních tabulek:

Tabulka 1: Osteosarkom – četnostní tabulka glukózy

Glukóza	hodnoty x_i	Absolutní četnost		Kumulativní četnost		$x_i \times n_i$	$x_i \times p_i$
		n_i	relativní $p_i = n_i \div p_i$	Absolutní	Relativní		
1	0,193	1	0,014705882	1	0,014706	0,193	0,002838
2	0,209684	1	0,014705882	2	0,029412	0,209684	0,003084
3	0,226368	0	0	2	0,029412	0	0
4	0,243053	4	0,058823529	6	0,088235	0,972211	0,014297
5	0,259737	0	0	6	0,088235	0	0
6	0,276421	6	0,088235294	12	0,176471	1,658526	0,02439
7	0,293105	1	0,014705882	13	0,191176	0,293105	0,00431
8	0,309789	1	0,014705882	14	0,205882	0,309789	0,004556
9	0,326474	4	0,058823529	18	0,264706	1,305895	0,019204
10	0,343158	6	0,088235294	24	0,352941	2,058947	0,030279
11	0,359842	6	0,088235294	30	0,441176	2,159053	0,031751
12	0,376526	3	0,044117647	33	0,485294	1,129579	0,016611
13	0,393211	6	0,088235294	39	0,573529	2,359263	0,034695
14	0,409895	8	0,117647059	47	0,691176	3,279158	0,048223
15	0,426579	6	0,088235294	53	0,779412	2,559474	0,037639
16	0,443263	1	0,014705882	54	0,794118	0,443263	0,006519
17	0,459947	3	0,044117647	57	0,838235	1,379842	0,020292
18	0,476632	4	0,058823529	61	0,897059	1,906526	0,028037
19	0,493316	3	0,044117647	64	0,941176	1,479947	0,021764
20	0,51	4	0,058823529	68	1	2,04	0,03
kroky suma		0,16684 68					0,378489

Tabulka 2: Nefroblastom - četnostní tabulka metody ABTS

ABTS	hodnoty x_i	Absolutní četnost		Kumulativní četnost		$x_i \times n_i$	$x_i \times p_i$
		n_i	relativní $p_i = n_i \div p_i$	Absolutní	Relativní		
1	8,5	1	0,047619	1	0,047619	8,5	0,404762
2	8,98	2	0,095238	3	0,142857	17,96	0,855238
3	9,46	0	0	3	0,142857	0	0
4	9,94	1	0,047619	4	0,190476	9,94	0,473333
5	10,42	0	0	4	0,190476	0	0
6	10,9	0	0	4	0,190476	0	0
7	11,38	0	0	4	0,190476	0	0
8	11,86	0	0	4	0,190476	0	0
9	12,34	1	0,047619	5	0,238095	12,34	0,587619
10	12,82	0	0	5	0,238095	0	0
11	13,3	1	0,047619	6	0,285714	13,3	0,633333
12	13,78	1	0,047619	7	0,333333	13,78	0,65619
13	14,26	0	0	7	0,333333	0	0
14	14,74	2	0,095238	9	0,428571	29,48	1,40381
15	15,22	4	0,190476	13	0,619048	60,88	2,899048
16	15,7	2	0,095238	15	0,714286	31,4	1,495238
17	16,18	2	0,095238	17	0,809524	32,36	1,540952
18	16,66	1	0,047619	18	0,857143	16,66	0,793333
19	17,14	1	0,047619	19	0,904762	17,14	0,81619
20	17,62	2	0,095238	21	1	35,24	1,678095
kroky		1,050947					
suma		21					14,23714

13.2 Příloha č. 2: Četnostní tabulky pro celkový soubor pacientů

Tabulka 3: Metoda ABTS - četnostní tabulka

ABTS	hodnoty x_i	Absolutní četnost		Kumulativní četnost		$x_i \times n_i$	$x_i \times p_i$
		n_i	relativní $p_i = n_i \div p_i$	Absolutní	Relativní		
1	7,530	1	0,21%	1	0,21%	7,53	0,015655
2	8,062	21	4,37%	22	4,57%	169,3042	0,351984
3	8,594	32	6,65%	54	11,23%	275,0147	0,571756
4	9,126	25	5,20%	79	16,42%	228,1579	0,474341
5	9,658	18	3,74%	97	20,17%	173,8516	0,361438
6	10,191	10	2,08%	107	22,25%	101,9053	0,211861
7	10,723	8	1,66%	115	23,91%	85,78105	0,178339
8	11,255	9	1,87%	124	25,78%	101,2926	0,210588
9	11,787	11	2,29%	135	28,07%	129,6553	0,269554
10	12,319	9	1,87%	144	29,94%	110,8705	0,2305
11	12,851	11	2,29%	155	32,22%	141,3616	0,293891
12	13,383	14	2,91%	169	35,14%	187,3642	0,389531
13	13,915	17	3,53%	186	38,67%	236,5595	0,491808
14	14,447	36	7,48%	222	46,15%	520,1053	1,0813
15	14,979	42	8,73%	264	54,89%	629,1379	1,307979
16	15,512	40	8,32%	304	63,20%	620,4632	1,289944
17	16,044	49	10,19%	353	73,39%	786,1405	1,634388
18	16,576	48	9,98%	401	83,37%	795,6379	1,654133
19	17,108	42	8,73%	443	92,10%	718,5316	1,493829
20	17,640	38	7,90%	481	100,00%	670,32	1,393597
kroky		0,53210					
suma		481					

Tabulka 4: Metoda DMPD - četnostní tabulka

DMPD	hodnoty x_i	Absolutní četnost		Kumulativní četnost		$x_i \times n_i$	$x_i \times p_i$
		n_i	relativní $p_i = n_i \div p_i$	Absolutní	Relativní		
1	8,214	1	0,37%	1	0,37%	8,214	0,030199
2	9,290	20	7,35%	21	7,72%	185,8053	0,683108
3	10,367	11	4,04%	32	11,76%	114,0318	0,419235
4	11,443	15	5,51%	47	17,28%	171,6418	0,631036
5	12,519	14	5,15%	61	22,43%	175,2667	0,644363
6	13,595	16	5,88%	77	28,31%	217,5251	0,799724
7	14,672	15	5,51%	92	33,82%	220,0737	0,809094
8	15,748	11	4,04%	103	37,87%	173,2263	0,636861
9	16,824	10	3,68%	113	41,54%	168,2411	0,618533
10	17,900	8	2,94%	121	44,49%	143,2029	0,526481
11	18,977	14	5,15%	135	49,63%	265,6728	0,976738
12	20,053	11	4,04%	146	53,68%	220,5818	0,810963
13	21,129	17	6,25%	163	59,93%	359,1957	1,320572
14	22,205	20	7,35%	183	67,28%	444,1084	1,632752
15	23,282	12	4,41%	195	71,69%	279,3802	1,027133
16	24,358	27	9,93%	222	81,62%	657,6646	2,417884
17	25,434	17	6,25%	239	87,87%	432,3816	1,589638
18	26,510	11	4,04%	250	91,91%	291,6152	1,072115
19	27,587	12	4,41%	262	96,32%	331,0408	1,217062
20	28,663	10	3,68%	272	100,00%	286,63	1,053787
kroky		1,076263158					
suma		272					

Tabulka 5: Metoda FRAP - četnostní tabulka

FRAP	hodnoty x_i	Absolutní četnost		Kumulativní četnost		$x_i \times n_i$	$x_i \times p_i$
		n_i	relativní $p_i = n_i \div p_i$	Absolutní	Relativní		
1	0,119	1	0,16%	1	0,16%	0,119	0,000196
2	0,758	300	49,42%	301	49,59%	227,4	0,374629
3	1,397	53	8,73%	354	58,32%	74,041	0,121979
4	2,036	37	6,10%	391	64,42%	75,332	0,124105
5	2,675	15	2,47%	406	66,89%	40,125	0,066104
6	3,314	32	5,27%	438	72,16%	106,048	0,174708
7	3,953	20	3,29%	458	75,45%	79,06	0,130247
8	4,592	19	3,13%	477	78,58%	87,248	0,143736
9	5,231	12	1,98%	489	80,56%	62,772	0,103414
10	5,870	19	3,13%	508	83,69%	111,53	0,18374
11	6,509	12	1,98%	520	85,67%	78,108	0,128679
12	7,148	12	1,98%	532	87,64%	85,776	0,141311
13	7,787	11	1,81%	543	89,46%	85,657	0,141115
14	8,426	12	1,98%	555	91,43%	101,112	0,166577
15	9,065	6	0,99%	561	92,42%	54,39	0,089605
16	9,704	10	1,65%	571	94,07%	97,04	0,159868
17	10,343	11	1,81%	582	95,88%	113,773	0,187435
18	10,982	14	2,31%	596	98,19%	153,748	0,253292
19	11,621	8	1,32%	604	99,51%	92,968	0,15316
20	12,260	3	0,49%	607	100,00%	36,78	0,060593
kroky		0,639					
suma		607					

Tabulka 6: Metoda Free radicals - četnostní tabulka

Free radicals	hodnoty	Absolutní četnost		Kumulativní četnost		$x_i \times n_i$	$x_i \times p_i$
		n_i	relativní $p_i = n_i \div$ p_i	Absolutní	Relativní		
1	33,930	1	0,33%	1	0,33%	33,93	0,111612
2	40,773	4	1,32%	5	1,64%	163,0905	0,536482
3	47,615	4	1,32%	9	2,96%	190,4611	0,626517
4	54,458	1	0,33%	10	3,29%	54,45789	0,179138
5	61,301	0	0,00%	10	3,29%	0	0
6	68,143	4	1,32%	14	4,61%	272,5726	0,89662
7	74,986	5	1,64%	19	6,25%	374,9289	1,233319
8	81,828	4	1,32%	23	7,57%	327,3137	1,07669
9	88,671	6	1,97%	29	9,54%	532,0263	1,750087
10	95,514	14	4,61%	43	14,14%	1337,192	4,398657
11	102,356	24	7,89%	67	22,04%	2456,552	8,080762
12	109,199	23	7,57%	90	29,61%	2511,576	8,261762
13	116,042	31	10,20%	121	39,80%	3597,289	11,83319
14	122,884	39	12,83%	160	52,63%	4792,484	15,76475
15	129,727	33	10,86%	193	63,49%	4280,986	14,08219
16	136,569	34	11,18%	227	74,67%	4643,362	15,27422
17	143,412	28	9,21%	255	83,88%	4015,539	13,20901
18	150,255	16	5,26%	271	89,14%	2404,076	7,908144
19	157,097	18	5,92%	289	95,07%	2827,753	9,301818
20	163,940	15	4,93%	304	100,00%	2459,1	8,089145
kroky		6,842631579					
suma		304					

Tabulka 7: Souhrnná tabulka

	průměr	směrodatná odchylka	rozptyl +	rozptyl -
albumin [g/l]	2,2671	1,2748	3,542	0,992
proteiny [g/l]	5,4829	13,0899	18,5727	-7,6070
bilirubin celkový [μmol/l]	1,9089	0,7648	2,6737	1,1442
bilirubin přímý [μmol/l]	0,7653	0,5771	1,3423	0,1882
glukóza [mmol/L]	0,3427	0,1688	0,5115	0,1739
kreatinin	3,5714	15,6849	19,256	-12,113
ABTS	12,5878	5,0670	17,6548	7,5209
FRAP	5,2823	7,0644	12,3466	-1,7821
Free radicals	98,5456	65,9389	164,4845	32,6067
DMPD	17,8034	10,7530	28,5564	7,0504