

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů



Oxidativní poškození lipidů v lidských nádorových buňkách

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Nela Lipová
Studijní program:	Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Pavel Pospíšil, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2016

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Bc. Nela Lipová

Název práce: Oxidativní poškození lipidů v lidských nádorových buňkách

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Oddělení biofyziky, Centrum regionu Haná pro
biotechnologický a zemědělský výzkum,
Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

Vedoucí práce: doc. RNDr. Pavel Pospíšil, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Marek Rác, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2016

Abstrakt: Tato diplomová práce se zabývá oxidativním poškozením lipidů v lidských nádorových buňkách po jejich inkubaci s proteinovými hydroperoxidy. Jako zástupce proteinových hydroperoxidů byl zvolen albuminový hydroperoxid. Pomocí FOX testu byla měřena jejich stabilita za různých reakčních podmínek. Dále byl měřen jejich vliv na oxidativní poškození lipidů a vitalitu buněk. Měřením míry oxidativního poškození lipidů jsme se snažili prokázat hypotézu, že za určitých podmínek mohou proteinové hydroperoxidy oxidativní poškození lipidů způsobit. Míra oxidativního poškození lipidů byla posuzována pomocí sekundárního produktu lipidové peroxidace – malondialdehydu. Výsledky ukazují vliv teploty na stabilitu albuminových hydroperoxidů. Dále bylo prokázáno, že za našich podmínek albuminové hydroperoxidy oxidativní poškození lipidů způsobují. Prokázán byl i jejich vliv na vitalitu buněk. Vitalita buněk se snižovala s rostoucí koncentrací albuminových hydroperoxidů a delším inkubačním časem.

Klíčová slova: lipidová peroxidace, albuminový hydroperoxid, malondialdehyd,
FOX test, HPLC

Počet stran: 58

Počet příloh: 0

Jazyk: český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Bc. Nela Lipová

Title of thesis: Oxidative damage of lipids in human cancer cells

Department: Department of Biophysics, Centre of the Region Haná
for Biotechnological and Agricultural research,
Faculty of Science, Palacký University, Olomouc

Supervisor: RNDr. Pavel Pospíšil, Ph.D.

Consultant: Mgr. Marek Rác, Ph.D.

The year of presentation: 2016

Abstract: This diploma thesis is about oxidative damage of lipids in human cancer cells after its incubation with protein hydroperoxide. The albumin hydroperoxide was chosen as representative of protein hydroperoxide. The stability of albumin hydroperoxide was measured by FOX assay in variously conditions. Its influence on oxidative damage of lipids and cells viability was also measured. We were trying to prove hypothesis that oxidative damage of lipids could be caused by protein hydroperoxide in some specific conditions. Oxidative damage of lipids was evaluated by analyzing second byproduct of lipid peroxidation - malondialdehyde. Results show the influence of temperature on stability of albumin hydroperoxide. It was proved that in our conditions the albumin hydroperoxide caused the oxidative damage of lipids. The influence of albumin hydroperoxide on cell viability was also proved. Viability of cells decreased with increasing concentrations of albumin and with a longer incubation time.

Keywords: lipid peroxidation, albumin hydroperoxide,
malondialdehyde, FOX assay, HPLC

Number of pages: 58

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Podpis.....

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Pavlu Pospíšilovi, Ph.D, za jeho čas, poskytnuté materiály, cenné připomínky a odborné rady. Rovněž bych chtěla poděkovat Mgr. Marku Rácovi za pomoc při realizaci experimentální části, poskytnuté materiály a cenné připomínky. Za pomoc s realizací experimentální části patří mé poděkování rovněž i Mgr. Uršule Ferretti.

Dále děkuji všem členům kolektivu Oddělení biofyziky z Centra regionu Haná za vytvoření přátelského prostředí.

Děkuji za možnost uskutečnit tuto diplomovou práci v rámci projektu IGA_PrF_2016_013.

Poděkování patří také mé rodině, partnerovi a přátelům, za jejich podporu a trpělivost po celou dobu mého studia.

Obsah

Bibliografická identifikace	2
Bibliographical identification.....	3
Úvod.....	8
Cíle práce:.....	9
1.1 Reaktivní formy kyslíku	10
1.1.1 <i>Singletní kyslík.....</i>	<i>10</i>
1.1.2 <i>Peroxid vodíku.....</i>	<i>11</i>
1.1.3 <i>Kyselina chlorná</i>	<i>12</i>
1.1.4 <i>Hydroxylový radikál.....</i>	<i>12</i>
1.1.5 <i>Superoxidový aniontový radikál</i>	<i>13</i>
1.1.6 <i>Hydroperoxylový radikál</i>	<i>14</i>
1.1.7 <i>Biologický význam reaktivních forem kyslíku.....</i>	<i>14</i>
1.2 Lipidová peroxidace	15
1.2.1 <i>Neenzymatická lipidová peroxidace.....</i>	<i>15</i>
1.2.2 <i>Enzymatická lipidová peroxidace</i>	<i>17</i>
1.2.3 <i>Biologické důsledky lipidové peroxidace</i>	<i>18</i>
1.3 Produkty Oxidativního poškození	19
1.3.1 <i>Primární produkty oxidativního poškození.....</i>	<i>19</i>
1.3.2 <i>Sekundární produkty oxidativního poškození.....</i>	<i>22</i>
2 Materiál a metody.....	28
2.1 Chemikálie	28
2.2 Přístrojové vybavení.....	28
2.3 Biologický materiál.....	28
2.4 Určení počtu a vitality buněk	29
2.5 Příprava albuminových hydroperoxidů	29
2.6 Příprava reagentů pro FOX test.....	29
2.7 Izolace malondialdehydu pro měření pomocí HPLC	30
2.8 Příprava vzorků pro kalibrační křivku malondialdehydu	31
3 Výsledky	32
3.1 Kalibrační křivka pro peroxid vodíku	32
3.2 Absorpční spektrum kalibrační křivky pro peroxid vodíku.....	33
3.3 Kinetika rozpadu albuminových hydroperoxidů	34
3.4 Stabilita albuminových hydroperoxidů s buněčnou suspenzí a jejich absorpční spektra ..	36

3.5	Kalibrační křivka pro malondialdehyd	39
3.6	Vliv albuminových hydroperoxidů na lipidovou peroxidaci	40
3.7	Vliv albuminových hydroperoxidů na vitalitu buněk	40
4	Diskuze	44
4.1	Kinetika rozpadu albuminových hydroperoxidů	44
4.2	Detekce hydroperoxidů v buněčné suspenzi.....	45
4.3	Vliv proteinových hydroperoxidů na lipidovou peroxidaci	46
4.4	Vliv albuminových hydroperoxidů na vitalitu buněk	48
5	Závěr.....	50
6	Seznam použitých zkratk	51
7	Literatura	52

ÚVOD

Aerobně žijící organismy jsou neustále vystavovány reaktivním formám kyslíku (ROS), které mohou způsobovat jejich oxidativní poškození. V průběhu evoluce si organismy vytvořily rozličné enzymatické i neenzymatické mechanismy antioxidační obrany. Pokud ROS získají převahu nad antioxidačními mechanismy, hovoří se o oxidativním stresu. Oxidativní stres lze v daném organismu laboratorně dokázat přítomností specifických primárních a sekundárních produktů. V případě oxidativního poškození lipidů se mezi primární produkty řadí lipidové hydroperoxy (ROOH) a ze sekundárních produktů je již řadu let významným markerem oxidativního stresu malondialdehyd (MDA).

Náplní této diplomové práce je posuzování vlivu albuminových ROOH, které byly zvoleny jako zástupci proteinových ROOH, na oxidativní poškození lipidů v lidských nádorových buňkách. Téma je v první části zpracováno v podobě literární rešerše a experimentální část se zabývá albuminovými ROOH, jejich vlivem na oxidativní poškození lipidů a na vitalitu buněk. Jako marker míry oxidativního poškození je zvolen MDA.

V rámci jiných prací bylo formulováno, že pro oxidativní poškození způsobené proteinovými ROOH jsou primárním cílem proteiny a sekundárním cílem nukleové kyseliny [20][21]. Hypotézou k experimentální části této diplomové práce je předpoklad, že proteinové ROOH mohou za určitých podmínek způsobit i oxidativní poškození lipidů.

CÍLE PRÁCE:

1. Vypracovat stručný přehled problematiky lipidové peroxidace
2. Důkladně se seznámit s funkcí a ovládním HPLC. Sepsat postup měření.
3. Proměřit tvorbu MDA v lidských nádorových buňkách po přidání proteinových hydroperoxidů.
4. Vyhodnotit naměřené výsledky a diskutovat je v porovnání s literaturou.

1.1 Reaktivní formy kyslíku

Ve vzduchu existuje kyslík převážně jako molekula známá pod názvem molekulární kyslík (O_2) nebo dikyslík. Při aerobních podmínkách oxiduje s uhlíky, což je důležité pro to, aby mohly aerobní organismy ze substrátů získávat energii. Při tomto procesu se ale O_2 redukuje a dochází tak ke vzniku ROS, mezi kterými jsou i volné radikály. Volné radikály jsou chemické částice s jedním, nebo dvěma nepárovými elektrony. Z ROS, které volnými radikály nejsou, mohou volné radikály vznikat [24].

Hlavními endogenními zdroji ROS jsou mitochondrie a dále pak plazmatické membrány, endoplazmatické retikulum, peroxizómy a fagocytující buňky. Mitochondrie jsou zdrojem ROS převážně během dějů, které se účastní elektronového transportu a apoptotické kaskády [37]. Plazmatické membrány produkují ROS během peroxidace lipidů, která může být přímo iniciována jinými ROS či enzymy nebo nepřímo UV či ionizujícím zářením a přechodnými kovy. Uvedenými druhy záření totiž dochází k homolytickému štěpení vazeb neradikálových ROS, a tím k tvorbě volných radikálů. Přechodné kovy slouží jako oxidační či redukční činidla. Značné množství ROS produkují fagocytující buňky během fagocytózy, a to konkrétně během procesu, který je označován jako respirační vzplanutí a slouží k obraně organismů před patogeny [4][39].

Látky, které nejsou volnými radikály:

Singletní kyslík – 1O_2

Peroxid vodíku – H_2O_2

Kyselina chlorná – $HClO$

Volné radikály (volné kyslíkové radikály, VKR):

Hydroxylový radikál – HO^\bullet

Superoxidový aniontový radikál – $O_2^{\bullet-}$

Hydroperoxylový radikál – HO_2^\bullet

1.1.1 Singletní kyslík

Singletní kyslík je silné oxidační činidlo, které reaguje s různými organickými molekulami - s nukleovými kyselinami (NK), proteiny a lipidy [36].

Může vznikat četnými způsoby, a to generací z fotosenzitivních molekul [14], při fagocytóze a fotosyntéze [52], katalytickým mechanismem peroxidáz a Russelovým

mechanismem. Během Russelova mechanismu dochází k reakci dvou peroxylových radikálů (HOO^\bullet), které se slučují do nestabilního lineárního tetraoxidu. Vzniklý tetraoxid podléhá rychlé fragmentaci na alkohol, karbonyl a O_2 nebo $^1\text{O}_2$. [36].

Vznik $^1\text{O}_2$ z fotosenzitivních molekul je označován jako fotosenzitivní reakce II. typu [36]. Reakce se účastní pouze O_2 , UVA záření a fotosenzitivní látky. Fotosenzitivní látky jsou skupiny molekul s vysokou fotostabilitou, které jsou schopny absorbovat energii ve formě záření, a poté dochází k přenosu tripletní excitační energie z fotosenzitivní molekuly na molekulární kyslík za vzniku $^1\text{O}_2$. Mezi velmi efektivní fotosenzitivní molekuly patří například některá barviva (eozin, metylenová modř), aromatické hydrokarbony (naftaleny, antraceny, bifenyly), komplexy přechodných kovů (ruthenium, osmium, iridium) a z biologických látek steroly, kyselina urokanová, porfyriny a jejich deriváty: flaviny a quinony [14]. Tento způsob vzniku $^1\text{O}_2$ je dominantním způsobem vzniku v kůži, protože představuje velkou plochu pro UVA složku slunečního záření [5].

Singletní kyslík je energeticky bohatá částice, která hraje svou roli nejen v řadě biologických procesů, ale má mnoho praktických uplatnění i v medicíně a průmyslu. Účastní se fotooxidace a poškozování DNA. Je prokázáno, že $^1\text{O}_2$ má svůj podíl na genotoxickém efektu UVA záření (320 - 380 nm) a hraje důležitou roli v buněčné signalizační kaskádě vedoucí k apoptóze [36]. V medicíně se $^1\text{O}_2$ využívá při sterilizaci krve pro transfúze a při fotodynamické terapii, která slouží k léčbě rakoviny. V průmyslových aplikacích se $^1\text{O}_2$ využívá při syntéze polymerů (polymer science) a pro výrobu herbicidů, které jsou aktivovány slunečním světlem [14].

1.1.2 Peroxid vodíku

Peroxid vodíku je slabým oxidačním i redukčním činidlem. Je snadno mísitelný s H_2O a snadno přechází přes buněčné membrány [23]. Endogenně vzniká H_2O_2 během elektronového transportu v mitochondriích (podrobněji v kapitole 1.1.5 Superoxidový aniontový radikál). Dále může vznikat přímo za působení enzymů monoaminoxidázy a glykolát oxidázy či při oxidaci mastných kyselin (MK). V případě člověka jsou vnějším zdrojem H_2O_2 i běžně konzumované nápoje jako instantní káva a černý či zelený čaj. Peroxid vodíku jsou schopny produkovat i některé bakterie, které žijí v horních částech trávicího traktu [25].

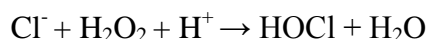
Z H_2O_2 vzniká Fentonovou a Haber-Weissovou reakcí vysoce reaktivní HO^\bullet (podrobněji v kapitole 1.1.4 Hydroxylový radikál).

Podobně jako $^1\text{O}_2$ má i H_2O_2 svůj podíl v apoptotické signalizační kaskádě [36].

1.1.3 Kyselina chlorná

Kyselina chlorná vzniká v případě polynukleárů a monocytů reakcí chloridu s H_2O_2 za účasti enzymu myeloperoxidázy (reakce č. 1).

reakce č. 1

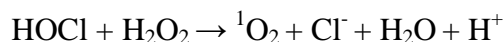


Jedná se o vysoce reaktivní sloučeninu, která je schopna interakce s četnými druhy molekul. Z biologických molekul jsou cílem pro HOCl volné amino a thio skupiny aminokyselin (AK), což vede ke vzniku nestabilních chloraminů a sulfenylových chloridů. Dalším biologickým cílem pro HOCl jsou lipidy. Je známo, že HOCl se váže na vazbu uhlík - uhlík v MK a cholesterolu, a tak způsobuje vznik chlorhydrinů [33].

Za fyziologického pH reaguje s lipidovými ROOH obsažených v lipozomech za vzniku $^1\text{O}_2$. Kyselina chlorná je schopna produkovat ROS, konkrétně HO^\bullet , a to reakcí s železnatým kationtem (Fe^{2+}) nebo s $\text{O}_2^{\bullet-}$.

Reakce H_2O_2 s HOCl je nejtypičtější reakcí, která probíhá během fagocytózy (reakce č. 2)[36].

reakce č. 2



Reakcí HOCl a taurinu, který je ze všech volných AK v cytoplazmě neutrofilů nejhojnější, vzniká oxidant taurin-monochloramin. Ten je schopen inhibovat zánětlivé mediátory neutrofilů a makrofágů, jako jsou oxid dusný, tumor nekrosis faktor α a prostaglandin [33].

1.1.4 Hydroxylový radikál

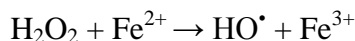
Hydroxylový radikál je malá ve vodě dobře rozpustná molekula, která je nejreaktivnější ze všech ROS. Má krátkou životnost a vzniká v buňkách z H_2O_2 během nejrůznějších stresových podmínek. V buňce může vznikat až okolo padesáti HO^\bullet za sekundu. Nespecificky reaguje s četnými biomolekulami, a tím způsobuje jejich poškození, které se uplatňuje v patogenezi mnoha onemocnění, jako je rakovina, ateroskleróza a různé typy neurodegenerativních onemocnění [4].

V biologických systémech vzniká působením UV záření na H_2O_2 [25] či během Fentonovy reakce a následné Haber-Weissovy reakce. Fentonovy reakce se účastní H_2O_2 s Fe^{2+} přímo za vzniku HO^\bullet a železitého kationtu (Fe^{3+}) (reakce č. 3). Hydroxylový radikál reaguje s H_2O_2

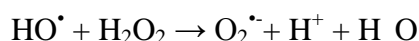
a vzniká $O_2^{\cdot-}$ (reakce č. 4). Vzniklý $O_2^{\cdot-}$ opět reaguje s H_2O_2 za vzniku HO^{\cdot} a HO^- (reakce č. 5). Právě tato poslední část je označována jako Haber-Weissova reakce [24].

Kromě železa se mohou vzniku HO^{\cdot} účastnit i jiné přechodné kovy jako měď, nikl, kobalt a vanad. V lidském organismu existují systémy, které dokáží železo udržet v redoxním stavu, a tím také inertním pro H_2O_2 . Mezi ně patří transportní proteiny pro železo transferin a laktoferin a dále protein ferritin, který slouží jako zásobárna železa [59].

reakce č. 3



reakce č. 4



reakce č. 5



Za fyziologických podmínek může HO^{\cdot} vznikat přenosem H^+ na peroxynitrit. Peroxynitrit se poté rozpadá na HO^{\cdot} a nitrogen dioxidový radikál [36].

1.1.5 Superoxidový aniontový radikál

Hlavním zdrojem $O_2^{\cdot-}$ je dýchací řetězec probíhající na vnitřní membráně mitochondrií. Dochází při něm k přenosu elektronů přes jednotlivé specifické komplexy. Jednoelektronovou redukcí O_2 pak vzniká $O_2^{\cdot-}$ [55]. Ve vodných roztocích funguje $O_2^{\cdot-}$ jako slabé oxidační činidlo [23]. Superoxidový aniontový radikál může oxidovat enzymy, které ve svém aktivním místě obsahují ionty železa. Ty se uvolní ve formě Fe^{2+} a uplatní se během Fentonovy reakce [24].

Ve vodných roztocích ale nemají příliš velkou stabilitu, neboť se jednotlivé $O_2^{\cdot-}$ vzájemně slučují za vzniku H_2O_2 a O_2 [23]. Tato reakce může probíhat buď spontánně, nebo může být katalyzována enzymem superoxidodismutázou, čímž se její průběh výrazně urychlí (reakce č. 6) [17].

reakce č. 6



Superoxidový aniontový radikál je ve vodných roztocích také silným redukčním činidlem. Redukuje některé kovové komplexy jako například cytochrom c [24].

1.1.6 Hydroperoxylový radikál

Hydroperoxylový radikál je protonovaná forma $O_2^{\bullet-}$, což znamená, že vzniká konjugací H^+ a $O_2^{\bullet-}$. Superoxidový aniontový radikál tedy slouží jako zdroj pro HO_2^{\bullet} , přičemž jeho samotný vznik závisí na pH prostředí [23]. Při pH 7,4, což je fyziologická hodnota pH krve, je přítomen jen v malém množství [1]. Udává se, že této protonované formy $O_2^{\bullet-}$ je v krvi okolo 0,3 % [30]. Hydroperoxylový radikál má mnohem silnější oxidační a redukční vlastnosti než $O_2^{\bullet-}$ a významně se podílí na iniciaci lipidové peroxidace [4].

Během stárnutí se mění vnitřní prostředí v mitochondriích, což zahrnuje oxidativní poškození proteinů zapojených v dýchacím řetězci a snížení množství negativně nabitého kardiolipinu na vnitřní straně membrány. Nižší hladiny kardiolipinu způsobují nižší kyselost prostředí, čímž se omezuje protonace $O_2^{\bullet-}$ [30].

1.1.7 Biologický význam reaktivních forem kyslíku

Kromě negativních účinků spočívajících v interakcích s biomolekulami, následnými ztrátami jejich funkcí, vznikem nemocí a indukce mutací, mají ROS v organismech i prospěšné funkce. Mají svou úlohu v imunitním systému a jsou součástí signálních drah v buňkách.

Velké množství ROS vzniká při nespecifické imunitní obraně organismu - fagocytóze. Během fagocytózy dochází k respiračnímu vzplanutí, které je charakteristické velkou spotřebou O_2 a následnou produkcí ROS. Vzniklé ROS mohou likvidovat patogenní mikroorganismy či jiný cizorodý materiál [28]. Při respiračním vzplanutí mají svou významnou úlohu enzymy, které jsou ve fagocytujících buňkách přítomny. Patří mezi ně především transmembránový enzym NADPH-oxidáza, který přenáší elektron z NADPH na O_2 . Tím vzniká $O_2^{\bullet-}$ a následnými reakcemi H_2O_2 , 1O_2 a HOCl, která má silné antimikrobiální účinky, a zároveň je silným oxidačním činidlem [52]. Některé ROS jsou během respiračního vzplanutí generovány i neenzymaticky, a to Fentonovou a Haber-Weissovou reakcí [28].

Při chronické granulomatóze, což je dědičné onemocnění vázané na chromozom X, enzym NADPH-oxidáza chybí, nebo je přítomen v mutantní podobě. To vede k selhání tvorby $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 a postižený jedinec je tak náchylnější k plísňovým a bakteriálním chorobám. Zejména pak k těm, které způsobují bakterie rodu *Staphylococcus*. Ty obsahují vlastní katalázu, která rozloží případné malé množství H_2O_2 [28] [38].

Negativní vliv ROS byl prokázán u některých virových infekcí. *In-vitro* studie prokázaly, že ROS napomáhají aktivaci jaderného transkripčního faktoru κB , který slouží k replikaci

viru HIV. Viry chřipky či některá mykoplazmata přímo stimulují makrofágy k produkci ROS, čímž zvyšují oxidativní stres při infekci HIV. Některá mykoplazmata navíc ve své cytoplazmě obsahují H₂O₂ [28].

Reaktivní formy kyslíku podporují i rozvoj autoimunitních onemocnění. Neutrofilny, které se vyskytují během nemocí v zánětlivých ložiscích, generují ROS, které inaktivují inhibitory proteáz, a tak degradují kyselinu hyaluronovou a proteoglykany [28].

V rámci signálních drah v buňce se ROS podílejí na buněčné proliferaci a rozhodnutí o přežití buněk, a to přímými interakcemi s proteinovými MAPK kinázami a PI3 kinázami. Dále mohou ROS přímo interagovat s geny pro antioxidanty, jako jsou thioredoxin a peroxiredoxin. Svou interakcí s proteiny obsahujícími klastry železa a síry mohou ovlivňovat i homeostázu železa. Interakcí s proteinem p66Shc ovlivňují mitochondriální stres, stárnutí a apoptózu [43].

1.2 Lipidová peroxidace

Lipidová peroxidace je proces, při kterém dochází k degradaci lipidů po jejich poškození volnými radikály (neenzymatická lipidová peroxidace) nebo enzymy (enzymová lipidová peroxidace). Na neenzymatickém procesu lipidové peroxidace mají největší podíl kyslíkové a dusíkové radikály [49] a z enzymů pak lipoxygenázy, cyklooxygenázy a enzymy cytochromu P450 [4]. U živočichů je hlavním cílem pro iniciaci lipidové peroxidace kyselina arachidonová a v případě rostlin kyselina linolová a kyselina α -linolenová [49]. Z dalších biologických molekul jsou atraktivními cíly pro lipidovou peroxidaci glykolipidy, fosfolipidy a cholesterol. Během lipidové peroxidace vzniká velké množství produktů, které mají rozličné biologické funkce [4].

1.2.1 Neenzymatická lipidová peroxidace

Neenzymatická lipidová peroxidace je řetězová reakce probíhající ve třech krocích: iniciace, propagace a terminace [4]. Schematicky je průběh znázorněn na obrázku (obrázek č. 1).

V rámci ROS se na neenzymatické lipidové peroxidaci nejvíce podílí HO[•] a HO₂[•]. Z fyzikálních iniciátorů má největší vliv UV a ionizační záření.

Iniciace

Reakce je iniciována odštěpením atomu vodíku z polynenasycené MK (PUFA) za pomoci volného radikálu. V rámci PUFA se nachází různý počet dvojných vazeb, mezi nimiž jsou

methylenové skupiny, a právě přítomnost dvojných vazeb způsobuje oslabení methylenové C-H vazby. Na uhlíku PUFA zůstává nepárový elektron a vzniká alkylový radikál. V rámci alkylového radikálu dojde k přesunu dvojných vazeb, a tím vzniká konjugovaný dien. Ten reaguje s O_2 a dochází tak ke vzniku lipidového ROO^\bullet [44].

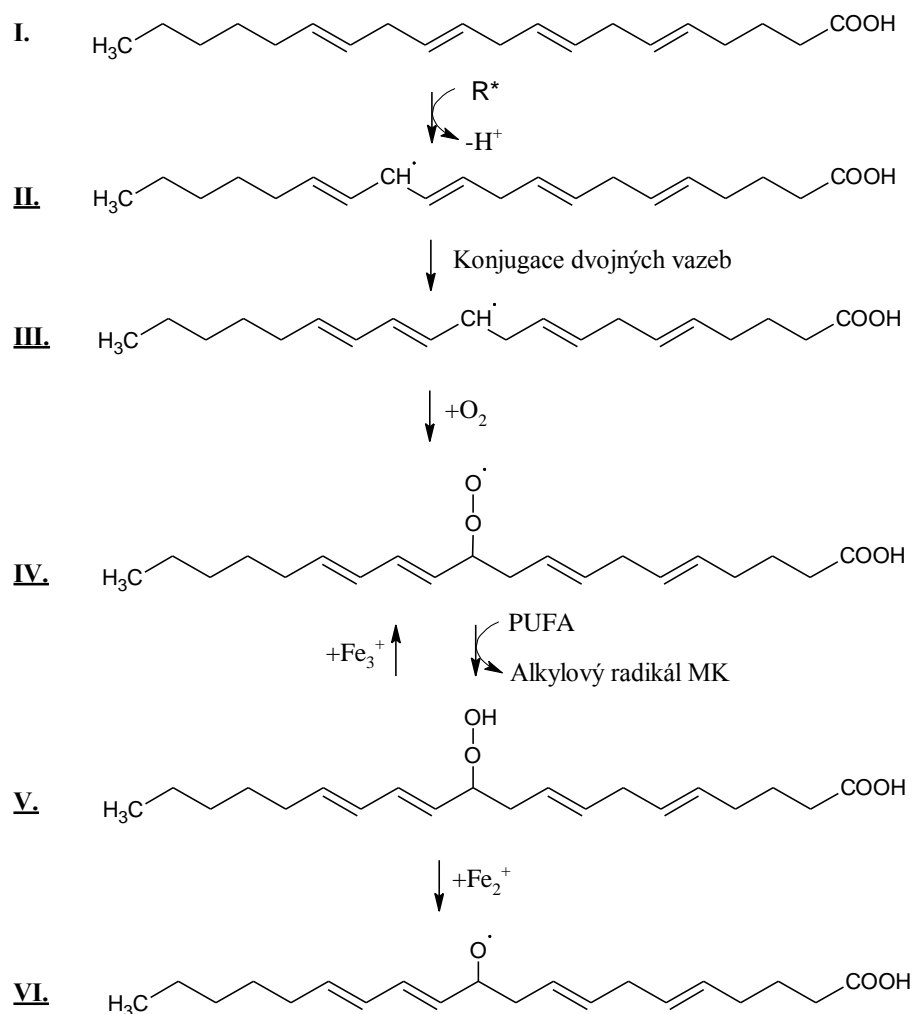
Propagace

Během propagace dochází k reakcím volných radikálů s neradikálovými molekulami za vzniku nových radikálů. Příkladem může být lipidový ROO^\bullet , který je schopen odštěpit vodíkový atom z jiné PUFA, čímž se vytváří další radikály, a sám se tak stává lipidovým $ROOH$ [61] [39]. Rychlost odštěpování vodíkového atomu je limitována, protože následná reakce alkylového radikálu s O_2 závisí právě na rychlosti difúze O_2 do místa reakce [60].

Terminace

Propagace radikálové reakce trvá do té doby, než spolu zreagují dva volné radikály za vzniku neradikálu. Tato reakce primárně nastává mezi dvěma lipidovými ROO^\bullet , což je označováno jako Russelův mechanismus (podrobněji v kapitole 1.1.1 Singletní kyslík) [60].

Mimo to může dojít k ukončení reakce v případě, že volný radikál zreaguje s molekulou antioxidantu, která má schopnost tuto řetězovou reakci ukončit [44].



Obrázek č. 1: Schéma neenzymatické lipidové peroxidace: Z kyseliny arachidonové (I.) je za pomoci volného radikálu odštěpen vodíkový atom a vzniká alkylový radikál (II.) a z něj přeskupením vazeb konjugovaný dien (III.). Po reakci s O₂ vzniká peroxylový radikál, (IV.) ze kterého vzniká po reakci s PUFA lipidový hydroperoxid (V.) a z něj po reakci s přechodnými kovy alkoxylový radikál (VI.), či peroxylový radikál (IV.)

1.2.2 Enzymatická lipidová peroxidace

Na enzymatické lipidové peroxidaci se nejvíce podílejí enzymy lipoxygenázy a cyklooxygenázy.

Přestože se lipoxygenázy a cyklooxygenázy liší ve svých sekvencích, terciální struktuře a lokalizaci v rámci buňky, jejich mechanismus působení na PUFA je velice podobný. Produkty působení lipoxygenáz a cyklooxygenáz na kyselinu arachidonovou se obecně označují jako eikosanoidy, což odkazuje na 20uhlíkatý řetězec MK [49].

Lipoxygenázy jsou enzymy, které obsahují nehemové železo, a skládají se z jednoduchého polypeptidového řetězce, který je složený do dvou domén. První doménu tvoří α -helikální katalytická doména a druhá N-terminální doména je tvořena β -soudkem.

Pomocí N - terminální domény je LOX ukotvena v cytoplazmatické membráně. Lipoxygenázy katalyzují přeměnu kyseliny arachidonové na leukotrieny [49].

Cyklooxygenázy patří mezi hemoproteiny, které prostupují skrz endoplazmatické retikulum a jadernou membránu pomocí čtyř α -helixů. Cyklooxygenázy stojí na začátku přeměny kyseliny arachidonové na prostaglandiny a tromboxany [49].

1.2.3 Biologické důsledky lipidové peroxidace

Neenzymatická i enzymatická lipidová peroxidace má poměrně rozsáhlé biologické důsledky na organismus.

Vlivem neenzymatické lipidové peroxidace dochází k poškozování širokého spektra buněčných struktur. Primárním cílem jsou PUFA, mezi jejichž funkce patří udržování struktury, fluidity a selektivity buněčných membrán, účast v signálních drahách a genové expresi, a navíc slouží jako zásoba energie. Při lipidové peroxidaci dochází vlivem poškozování PUFA ke změnám membránových vlastností a poškození membránově vázaných enzymů. Dále dochází ke změnám v signálních drahách a ke vzniku reaktivních produktů, které mohou poškozovat nejen membrány, ale i ostatní biologické struktury v buňce (podrobněji v kapitole 1.3 Produkty oxidačního poškození). Vazba pozitivně nabitých částic na negativně nabitě struktury fosfolipidové membránové dvojvrstvy zvyšuje náchylnost membrán k oxidativnímu poškození. Funkci pozitivně nabitých částic plní kationty kobaltu, kadmia, stříbra, rtuti, vápníku a olova [44].

Oxidační produkty cholesterolu, známé pod názvem oxysteroly, jsou předmětem výzkumu, protože mohou sloužit jako biomarkery oxidativního stresu. Dále se účastní syntézy žlučových kyselin, transportu cholesterolu a jsou součástí signálních drah v buňce [39].

Pokud lipidová peroxidace převáží nad obrannými mechanismy, může to v konečném důsledku vést až ke smrti buňky [44].

Mezi biologicky významné produkty enzymatické lipidové peroxidace patří eikosanoidy odvozené z kyseliny arachidonové: prostaglandiny, tromboxany, leukotrieny.

Hladina prostaglandinů je za normálních okolností nízká a k jejímu nárůstu dochází během zánětlivých procesů. Účinky prostaglandinů jsou zprostředkovány G-proteiny. Způsobují vazodilataci periferních cév, čímž snižují krevní tlak, a zároveň zvyšují průtok krve v srdci, ledvinách a v oblasti mezenteria. Mají protektivní účinek na gastrointestinální trakt, protože snižují tvorbu kyseliny chlorovodíkové v žaludeční sliznici [45].

Funkcí tromboxanu je adheze a agregace krevních destiček na cévním endotelu, proliferace a kontrakce hladké svaloviny a aktivace endotelu v případě zánětlivých procesů [45].

Leukotrieny jsou syntetizovány uvnitř bílých krvinek a mají významnou úlohu v zánětlivých procesech. Slouží jako chemoatraktanty pro fagocytující buňky, podílí se na bronchokonstrikci a podporují vznik eozinofilie [47].

1.3 Produkty Oxidativního poškození

Mezi nejvýznamnější primární produkty oxidativního poškození se řadí ROOH, které vznikají z lipidů, proteinů či NK (nukleových kyselin). Mezi sekundární produkty se řadí mnoho aldehydů, z nichž se v současnosti považují za nejdůležitější MDA a 4-hydroxynonenal (4-HNE). Organické hydroperoxy se podílejí na propagaci nových ROS a poškozování biomolekul, zatímco MDA společně s 4-HNE účinkuje na organismus mutageně či toxicky [4].

1.3.1 Primární produkty oxidativního poškození

Přítomnost ROOH je vždy znakem oxidativního poškození organismu. Z toho důvodu je jejich detekce a co nejpřesnější kvantifikace předmětem zájmu mnoha výzkumů.

Organické hydroperoxy jsou relativně stabilní při pokojové teplotě. Jejich rozklad lze urychlit zahříváním, UV zářením nebo přidáním přechodných kovů či hemoproteinů, které přechodné kovy ve své struktuře obsahují [36].

1.3.1.1 Lipidové hydroperoxy

Buněčné membrány jsou cílem pro ROS, a to zejména pro HO^\bullet a HO_2^\bullet [4]. Po reakci lipidů s těmito ROS (podrobněji v kapitole 1.2.1 Neenzymatická lipidová peroxidace) dochází až k tvorbě lipidových ROOH. Reakce lipidových ROOH s přechodnými kovy nebo hemovými proteiny vede ke vzniku lipidových ROO^\bullet a lipidových alkoxylových radikálů. Pokud lipidové ROO^\bullet vznikly z lipidových ROOH obsahujících ve své molekule α -vodík, dochází Russelovým mechanismem k produkci $^1\text{O}_2$ (podrobněji v kapitole 1.1.1 Singletní kyslík) [36][22].

Kromě uvedených ROS mohou lipidovou peroxidaci, a tím vznik lipidových ROOH způsobit i enzymy cyklooxygenázy a lipoxygenázy (podrobněji popsáno v kapitole 1.2.2 Enzymatická lipidová peroxidace) [36].

Za fyziologických podmínek obsahují buňky enzymy, které jsou schopny redukovat lipidové ROOH na méně reaktivní lipidové hydroxidy. Na této redukci se podílí několik redukčních enzymů, a to glutathionperoxidázy, glutathiontransferázy a selenoperoxidázy [22][54]. Fosfolipidové ROOH jsou pak metabolizovány fosfolipidovou hydroperoxidovou glutathionperoxidázou, nebo štěpeny fosfolipázou A2. Za jiných než fyziologických podmínek ale lipidové ROOH na lipidové hydroxidy redukovány nejsou, což vede nejen ke změnám membránové fluidity, ale i ke zvýšení ochranných procesů v buňce a při rozsáhlém buněčném poškození k indukci apoptózy. Protože se určité třídy lipidových ROOH v těle hromadí (ROOH MK, fosfolipidů, cholesterolu a esterů cholesterolu), je v současnosti zaměřena pozornost na jejich role v patofyziologických procesech [36].

1.3.1.2 Proteinové hydroperoxydy

Stejně jako lipidy jsou i proteiny cílem pro ROS, a to zejména pro HO[•]. Bylo prokázáno, že HO[•] je schopen iniciace peroxidace polypeptidů, a to jak na jejich kostře, tak i na jejich postranních AK řetězcích [7]. Hydroxylový radikál odštěpí vodík a obdobně jako v případě peroxidace lipidů reakce pokračuje až po vznik proteinových ROOH. Co se týče konkrétních AK v postranních řetězcích, bylo prokázáno, že šest z nich (prolin, glutamát, lyzin, valin, leucin a izoleucin) značně reaguje s HO[•] za vzniku proteinových ROOH [36].

Uvádí se, že reakce dvou proteinových ROO[•] vzniklých z proteinových ROOH obsahujících α -vodík, je schopna vést Russelovým mechanismem k produkci ¹O₂. Navíc je také pravděpodobné, že ¹O₂ může vznikat v reakci zahrnující rekombinaci proteinových ROO[•] vzniklých z primárních a sekundárních proteinových ROOH s ROO[•] vzniklých z terciálních proteinových ROOH, které α -vodík ve své struktuře neobsahují. Mezi terciální proteinové ROOH se řadí například tryptofanové nebo tyrozinové ROOH. Důležitost této reakce je potlačena skutečností, že tyto AK-ROOH mohou vznikat v blízkosti buněčných membrán, které obsahují velké množství lipidů, a tak mohou reagovat s lipidovými ROO[•] vzniklých z lipidových ROOH [36].

Vzniklé proteinové ROOH mohou být v organismech redukovány pomocí glutathionperoxidázy [11].

Z širokého spektra produktů, které z proteinu vznikají po poškození ROS, jsou v popředí zájmu hlavně proteinové ROOH. Jedná se o molekuly, které mají při laboratorní teplotě poločas rozpadu několik hodin a v přítomnosti dalších oxidantů zesilují již započaté poškozování buněčných struktur [36].

1.3.1.3 DNA hydroperoxydy

Cílem pro ROS jsou i NK. Většina poznatků o DNA-ROOH pochází z radiční biologie, kdy je HO[•] generován za pomoci γ záření z vodného roztoku oxidu dusného [53].

Bylo zaznamenáno, že působení HO[•] v blízkosti DNA vede právě k tvorbě DNA-ROOH a dalších oxidačních produktů. Reakce HO[•] s DNA zahrnuje adici na uhlíky C5 a C6 v případě cytosinu a thyminu a na uhlíky C4, C5 a C8 v případě guaninu a adeninu, přičemž v neutrálním a mírně kyselém prostředí vznikají DNA-ROOH nejvíce z thyminu [36].

Reakcí thyminu s HO[•] vzniká přibližně ze dvou třetin 5-hydroxy-6-hydroperoxy-5,6-dihydrothymin a zbylou třetinu tvoří 6-hydroxy-5-hydroperoxy-5,6-dihydrothymin. Alternativně může HO[•] podporovat odštěpení H⁺ z metylenové skupiny, což vede ke vzniku 5-(hydroperoxymetyl)-2'-deoxyuridinu. Tento produkt vzniká pouze ve velmi malém množství [8].

Pokud HO[•] reaguje s cytozinem či cytidinem, vznikají hlavně dva druhy ROOH: 5-hydroxy-6-hydroperoxid-5,6-dihydro-2'-deoxycytidin a 6-hydroxy-5-hydroperoxid-5,6-dihydro-2'-deoxycytidin

Podobně jako v případě lipidů a proteinů vede pravděpodobně reakce dvou DNA-ROOH po redukcí přechodnými kovy až ke vzniku ¹O₂. [36].

Vzniklé DNA-ROOH jsou poměrně nestabilní a jejich rozkladné produkty jsou velmi mutagenní [56]. Jejich působením dochází k širokému spektru změn na úrovni NK zahrnujícího poškození bází a pentóz, zlomy na vláknech a proteinové crosslinky [36].

1.3.1.4 Metody detekce organických hydroperoxidů

Starší metody detekce ROOH jsou založeny na reakci s jodidy (2I⁻) v kyselém prostředí. Organické hydroperoxydy jsou redukovány na alkohol a samotné jodidy jsou oxidovány na trijodidové anionty (I³⁻) [13]. Jodometrické testy jsou považovány za standardní metody, neboť při nich po reakci jednoho 2I⁻ s jednou -OOH skupinou vzniká přesně jeden I³⁻ [19]. Vzniklé I³⁻ se spektrofotometricky detekují ve směsi metanolu a kyseliny octové připravené v poměru 2:1. Absorpční maxima I³⁻ se v tomto případě nacházejí na vlnové délce 290 a 360 nm [27]. Jodometrické metody jsou ale citlivé na O₂ a světlo, a proto se začaly standardizovat jiné metody [19].

V současnosti je jednou z nejpoužívanějších metod pro detekci ROOH oxidace iontů železa v prostředí xylenové oranže (FOX test). Tento test byl poprvé použit v 70. letech k detekci H₂O₂ ve vodných roztocích. V 90. letech byla metoda aplikována na detekci

lipidových ROOH v lipozomech, plazmě a lipoproteinech. O deset let později byla použita i pro detekci ROOH na proteinech [35]. Principem testu je oxidace Fe^{2+} na Fe^{3+} pomocí H_2O_2 nebo ROOH. Vzniklé Fe^{3+} se poté váže na barvivo xylenolovou oranž (XO), s níž poskytuje specifickou škálu zbarvení závislou na koncentraci H_2O_2 či ROOH. Při nižších koncentracích je produkt reakce oranžový a při vyšších koncentracích bývá světle hnědý až tmavě fialový. Vzniklý barevný produkt je poté měřen na absorpčním spektrometru při vlnové délce 560 nm [13]. Test je prováděn v kyselém prostředí v rozmezí hodnot pH 1,7 – 1,8, protože kyselé prostředí umožňuje zmíněnou oxidaci Fe^{2+} . Četné protokoly doporučují pro udržení tohoto pH optima 25mM kyseliny sírovou (H_2SO_4) [19].

Jsou popsány dva druhy FOX testu, a to FOX-1 a FOX-2, přičemž FOX-1 je více citlivý. Oba druhy zahrnují výše popsanou reakci Fe^{2+} s ROOH v kyselém prostředí. Reagencie pro FOX-1 jsou připraveny ve vodném roztoku sorbitolu a reagencie pro FOX-2 obsahují navíc metanol pro HPLC a butylovaný hydroxytoluen. FOX-1 není vhodný pro detekci ROOH v krevní plazmě, protože jsou v ní obsaženy lipidy, které by mohly reagovat s Fe^{2+} a falešně tak zvyšovat výsledek. Tento problém řeší FOX-2, protože butylovaný hydroxytoluen působí jako antioxidant a zabraňuje vzniku lipidových ROOH z lipidů obsažených v plazmě [6].

1.3.2 Sekundární produkty oxidativního poškození

Během lipidové peroxidace vznikají jako sekundární produkty relativně stabilní aldehydy, které jsou biologicky vysoce aktivní. Z toho důvodu jsou někdy označovány jako sekundární poslové cytotoxicity a stejně jako ROOH jsou tyto aldehydy předmětem intenzivního výzkumu. Nejvýznamnější z nich, MDA a 4-HNE, vznikají během neenzymatické i enzymatické lipidové peroxidace kyseliny arachidonové nebo dalších PUFA [4].

1.3.2.1 Malondialdehyd.

V biologickém materiálu existuje MDA ve dvou formách, a to ve formě volné a ve formě vázané. Volná forma MDA tvoří v biologickém materiálu pouze malou část z celkového množství. V případě vázané formy je MDA navázán na SH nebo NH_2 skupiny makromolekul, kterými jsou proteiny či NK [41].

Při neutrálním pH je MDA přítomen ve formě enolátového aniontu a má nízkou chemickou reaktivitu. Při poklesu pH dojde ke změně konformace MDA do formy β -hydroxyakroleinu a jeho chemická reaktivita vzroste [15].

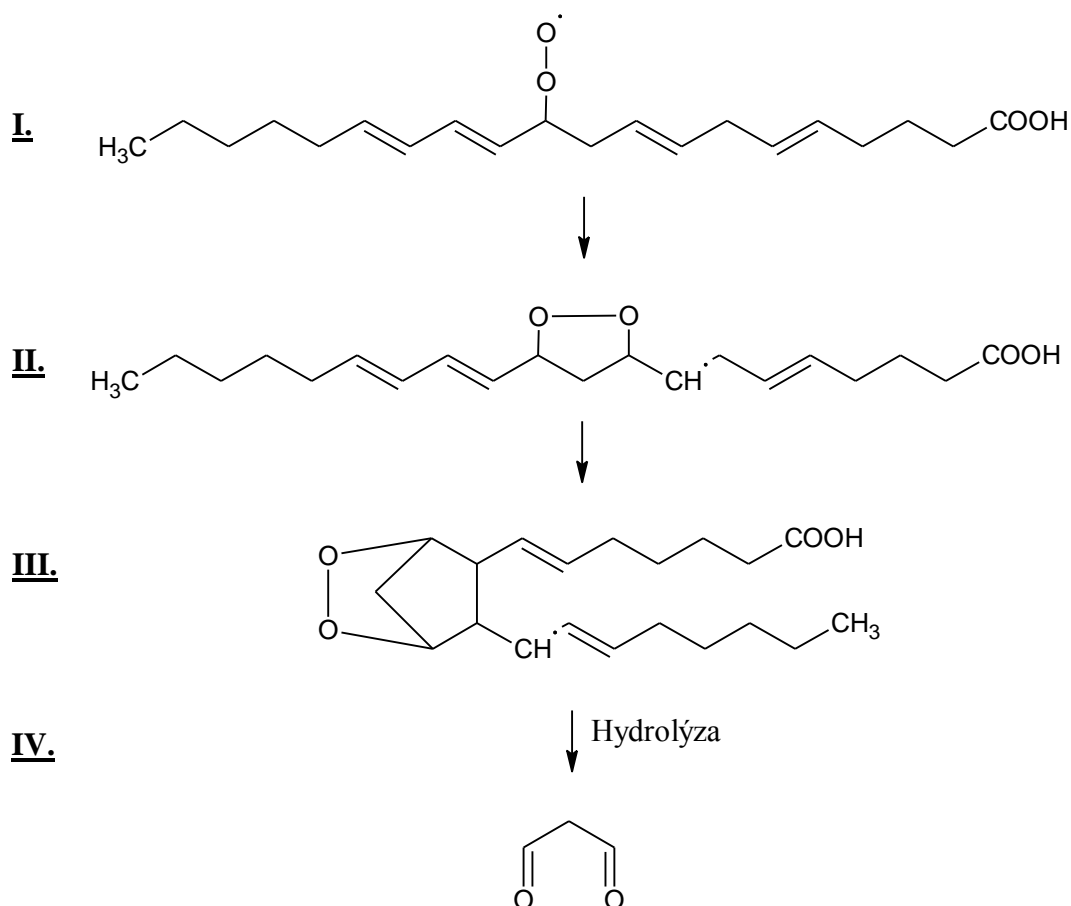
Neenzymaticky je MDA tvořeno při lipidové peroxidaci. Po vzniku lipidového ROO^\bullet dochází k jeho zacyklení do formy endoperoxidu. Ten podstoupí další zacyklení a vzniká

bicycklický endoperoxid, který je hydrolyticky rozštěpen za vzniku MDA. [48]. Vznik endoperoxidu probíhá pouze u PUFA, které mají tři a více dvojných vazeb, a proto neprobíhá v případě oxidace kyseliny linolenové [39].

Při enzymatickém rozpadu kyseliny arachidonové dochází ke vzniku biologicky aktivního tromboxanu A₂, při kterém vzniká MDA jako vedlejší produkt [48].

Vzniklý MDA může reagovat s buněčnými kompartmenty nebo může být enzymaticky metabolizován. Malondialdehyd je pravděpodobně oxidován mitochondriální aldehyddehydrogenázou na malon-semialdehyd a ten je dekarboxylován dekarboxylázou za vzniku acetaldehydu. Acetaldehyd je oxidován aldehyddehydrogenázou na acetát, ze kterého vzniká za pomoci acetylCoAsyntázy acetylCoA. Z něj během citrátového cyklu vzniká oxid uhličitý (CO₂) a voda (H₂O) [4][15].

Dále se předpokládá i metabolismus, při kterém je MDA metabolizován fosfoglukozoizomerázou na metylglyoxal a následně enzymy glyoxalazového systému na D-laktát [4].



Obrázek č. 2: Schéma neenzymatické tvorby MDA: peroxylový radikál (I.) se zacyklí do podoby endoperoxidu (II.), který je podroben dalšímu zacyklení za vzniku bicyckického endoperoxylového hydroperoxidu (III.), a ten je hydrolyticky rozštěpen za vniku malondialdehydu (IV.).

1.3.2.2 *Metody detekce malondialdehydu*

Pro detekci volné i vázané formy MDA je v současnosti používáno několik metod založených na spektrofotometrické, fluorimetrické, či hmotnostní detekci (MS) [41].

Nejstarším a doposud používaným způsobem detekce je senzitivní a snadno proveditelný test s thiobarbiturovou kyselinou (TBA). Test s TBA slouží k detekci volné i vázané formy MDA, neboť díky kyselému prostředí a vysoké teplotě dochází k uvolňování vázané formy MDA z molekul. [12]. Test je prováděn při hodnotě pH 3,5 a během hodinové inkubace při 95°C dochází k reakci MDA s TBA. Výsledkem reakce je fialový produkt, jehož absorbance je měřena na absorpčním spektrofotometru při vlnové délce 532 nm [40]. Nevýhodou TBA testu je jeho specifita, neboť při něm s TBA reagují i jiné molekuly než MDA, a tím dochází k nadhodnocení koncentrace MDA. Mezi takto pozitivně reagující molekuly patří například sacharidy, některé AK, kyselina sialová a rozkladné produkty, kterými mohou být alkany, alkeny či alkadieny [29]. Navíc mohou z biologické matrice působením vysoké teploty vznikat další oxidační produkty, které negativně ovlivní přesnost výsledku. Výsledky jsou pak uváděny jako TBA reagující substance (TBARS), a nikoliv jako čisté MDA. Hodnota TBARS stoupá se zvyšujícím se oxidačním stresem [12].

Aby bylo toto ovlivnění minimalizováno, je během mnohých metod součástí přípravy vzorků vysrážení proteinů pomocí kyseliny trichloroctové. V tomto případě lze komplex MDA-TBA precipitáty identifikovat i pomocí HPLC (vysoce účinné kapalinové chromatografie) s UV/VIS detekcí [12].

Chromatografickými technikami lze MDA detekovat i jinak než po jeho předchozí reakci s TBA. Derivatizace MDA O-pentafluorobenzyl hydroxylem je používána v případě analýzy plynovou chromatografií s MS detekcí [41]. Pro detekci HPLC s UV detekcí je prováděna derivatizace MDA pomocí 2,4 – dinitrophenylhydrazinu (DNPH) za vzniku hydrazonů. Toto stanovení se používá pro detekci volné i vázané formy MDA. Vázaná forma MDA je z vazby uvolněna alkalickou hydrolyzou pomocí hydroxidu sodného (NaOH) a následně se kyselinou chloristou vyvazují proteiny. Vzniklé hydrazony jsou unikátní, a tím je během analýzy dosaženo specifity. Metodika se osvědčila zejména při měření MDA v lidské plazmě a moči [41].

Fluorimetrickými metodami lze MDA detekovat díky derivatizaci s N-methyl-2-phenylindolem nebo O-pentafluorobenzyl hydroxylaminem [41].

MDA je možno detekovat i bez předchozí derivatizace, a to za pomoci vysoce účinné kapilární elektroforézy. Jedná se o vysoce přesnou metodu a samotné analýze vzorku předchází precipitace proteinů pomocí acetonitrilu [12].

1.3.2.3 Biologický význam malondialdehydu

Malondialdehyd je v organismu schopen interagovat s různými biomolekulami. Hlavním produktem reakcí MDA s nukleovými kyselinami je pyrimido-[1,2-a]purin-10(3H)-one deoxyribose, který je v buňkách bakterií a savců schopen indukovat posunové mutace a substituce bází. Dále byla za fyziologických podmínek pozorována tvorba cross-linků mezi DNA a histony, která byla rovněž indukována MDA. Cross-linky ale vznikají pouze v případech, kdy MDA reaguje nejprve s proteinem a až poté s DNA. Tyto změny na úrovni DNA mohou později vést k nádorovému bujení. Zvýšená hladina MDA byla nalezena v plazmě pacientů s rakovinou prsu, děložního čípku, chronickou lymfatickou leukemií a v dechu pacientů s rakovinou plic [4][12].

Reakcí MDA s primárními aminy vznikají proteinové cross-linky, jejichž přítomnost byla prokázána v apoB frakci oxidovaných lipoproteinů. Po pohlcení modifikovaných lipoproteinů makrofágy dochází ke vzniku pěnových buněk, které se mohou následně rozpadat a uvolňováním svého obsahu významně přispívat ke vzniku aterosklerózy [12][34].

Malondialdehyd je schopen reagovat s acetaldehydem za vzniku stabilních sloučenin, které následně reagují s proteiny a vytváří s nimi kovalentní vazby. Takto modifikované proteiny mohou být časem spouštěčem zánětlivých procesů a zvýšené tvorby fibrinu [42].

Nedávné výzkumy prokázaly, že MDA má funkci i jako signální molekula při sekreci inzulínu. U myši byla dokázána přímá závislost mezi zvýšenou koncentrací MDA v plazmě a zvýšenou sekrecí inzulínu. Malondialdehyd je proto považován za další faktor při vzniku hyperinzulinémie a diabetu II. typu [57]. Dále dokáže působením přes proteinové transkripční faktory Sp1 a Sp3 spouštět expresi genu pro kolagen [18].

Vyšší hladiny MDA byly nalezeny i u pacientů s preeklampsí, Alzheimerovou chorobou, Parkinsonovou chorobou a u alkoholiků [4].

1.3.2.4 4-Hydroxynonenal

Jedná se o elektrofilní molekulu, která ve své struktuře obsahuje tři dvojně vazby a spadá do skupiny α , β -nenasycených aldehydů. V současnosti je 4-HNE nejstudovanějším sekundárním produktem lipidové peroxidace [4].

Vzniká z ω -6 PUFA neenzymatickým, i enzymatickým způsobem. Neenzymatické způsoby vzniku jsou následující:

- Redukce lipidového ROOH na lipidový RO[•] za pomoci přechodných kovů následovaná β -štěpením.

- Protonace lipidového ROOH za následného Hockova přeskupení vazeb, vzniku nestabilního karbonylového iontu a jeho hydrolýzy.
- Zacyklení lipidového ROO[•] do formy dioxetanu a jeho následné štěpení [51].

Enzymaticky vzniká působením 15-LOX na kyselinu arachidonovou nebo dalších ω -6 PUFA. V případě člověka jsou hlavními prekurzory pro 4-HNE kyselina 13-hydroperoxyoktadekadienová, vzniklá oxidací kyseliny linolové a 15-hydroperoxyeikosatetraenoiková, která vznikla po oxidaci kyseliny arachidonové. Obě kyseliny jsou poměrně nestabilní, a proto se přeměňují na stabilnější produkty, jako jsou lipoxiny a leukotrieny [4].

1.3.2.5 Metody detekce 4-hydroxynonenalu

Jak již bylo zmíněno, 4-HNE existuje v organismech ve formě volné i ve formě vázané na jiné biomolekuly. Pro jeho detekci se tedy používá řada metod, z nichž jsou některé schopny jeho detekce ve formě volné a jiné ve formě vázané.

Volný 4-HNE absorbuje při 220 - 223 nm, a v případě mM koncentrací ve vzorcích jej lze pomocí HPLC oddělit od ostatních aldehydů a následně kvantifikovat pomocí UV detekce. První citlivější a dodnes používanou detekcí 4-HNE je jeho derivatizace pomocí DNPH, kdy vzniká stabilní hydrazon s absorpčním maximem při 360 – 390 nm. Nevýhodou této metody je ale skutečnost, že DNPH nereaguje pouze s 4-HNE, ale i s dalšími aldehydy [51].

Díky stále se rozvíjející MS detekci lze 4-HNE stanovit i pomocí LC-MS/MS detekce. Toto stanovení spočívá v homogenizaci materiálu ve fosfátovém pufru, odstranění proteinů acetonitrem, centrifugaci a extrakci supernatantu dichlormetanem, rozdělení za pomoci kapalinové chromatografie a MS detekci [58].

Coby vázaná forma tvoří stabilní adukty zejména s proteiny, a proto jej lze detekovat i pomocí monoklonálních protilátek metodami Western blot a ELISA [9].

1.3.2.6 Biologický význam 4-Hydroxynonenalu

Protože se jedná o nejtoxictější produkt lipidové peroxidace, je důležité, aby byly jeho toxické účinky minimalizovány. Téměř okamžitě po svém vzniku je 4-HNE podroben rychlé metabolizaci na příslušné alkoholy, kyseliny či konjugáty s glutathionem, které jsou lépe rozpustné ve vodě, a tím i snadněji vyloučitelné z organismu. Účinná metabolizace se děje pouze v případech, kdy je koncentrace 4-HNE na fyziologické hladině. V případě vyšších koncentrací není možné všechn vzniklý 4-HNE účinně metabolizovat, a tak způsobí přebytečný 4-HNE indukci antioxidantů, zástavu buněčného cyklu, poškození buněčných struktur a při velmi vysokých hladinách indukci apoptózy [4].

Funkcí 4-HNE je i stimulace exprese některých transkripčních faktorů. Jedním z nich je Nrf2, který v jádře zprostředkovává transkripci a translaci genů pro antioxidanty. Přes ovlivnění exprese cyklinů, které jsou nezbytné pro cyklin-dependentní kinázy, a proteinu p53 je schopen ovlivnit i průběh buněčného cyklu [4][3]. Podporuje vznik četných patologických onemocnění a dokáže tvořit sloučeniny s proteiny či DNA, čímž poškozuje jejich funkce. Jeho působení bylo prokázáno u rozvoje diabetes mellitus a dále bylo zjištěno, že u některých neurodegenerativních onemocnění způsobuje poškození proteinů. V případě neurodegenerativních onemocnění bylo dále zjištěno, že poškozuje mitochondrie, a tím narušuje celý energetický metabolismus. Mezi další patofyziologické funkce 4-HNE patří poškozování cévního endotelu a má svůj podíl i na reorganizaci cytoskeletu [10]. Kyselina 15-hydroperoxyeikosatetraenoiková se uplatňuje v proapoptotických procesech, kde slouží jako aktivátor kaspáz 3 a 8 a podílí se i na fragmentaci DNA [31].

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Chemikálie

RPMI-1640 médium (Biosera), albumin (Sigma-Aldrich), peroxid vodíku (Sigma-Aldrich), kyselina molybdenová (Sigma-Aldrich), kyselina sírová (Lach-ner), kyselina octová (Lach-ner), kataláza z hovězích jater (Sigma-Aldrich), vitamín C (FARMAK), α -tokoferol (Sigma-Aldrich), etanol (FAGRON), voda pro HPLC (Sigma-Aldrich), trypsin EDTA 10x (Biosera), acetonitril (Fluca Analytical), triethylamin (), hydrogenfosforečnan draselný (LaChema), dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát (LaChema), xylenová oranž (Sigma-Aldrich), heptahydrát síranu železnatého (BDH Prolabo), hydroxid sodný (Lach-ner), 2,4-dinitrofenylhydrazin (Sigma-Aldrich), 1,1,3,3 tetraetoxypropane (Sigma-Aldrich), kyselina chloristá (Lach-ner), trypanová modř (Sigma-Aldrich), fetální hovězí sérum (Sigma-Aldrich)

2.2 Přístrojové vybavení

Laminární box s vertikálním prouděním vzduchu (Schoeller Instruments), inkubátor CO₂ (Contherm mitre 4000 series), HPLC (Waters e2695 Separations Module), UV/VIS detektor (Waters 2489 UV/VIS detector), kolona (Symetry C18, 4,6 x 75 mm, velikost částic 3,5 μ m), absorpční spektrofotometr (Dvoupaprskový spektrometr Unicam UV550), automatický počítač buněk (BIO-RAD), počítačící skříňka pro buňky (BIO-RAD) a další běžné vybavení chemické laboratoře.

2.3 Biologický materiál

Pro měření byla použita buněčná kultura A2780. Tato kultura byla získána z ovariálního karcinomu neléčené pacientky. Jedná se o buňky, které svými bílkovinnými molekulami adherují na dno kultivační lahve. Pro odebrání buněk bylo nutné jejich adhezní bílkovinné molekuly krátce natrávit trypsinem. Působení trypsinu bylo zastaveno RPMI-1640 médiem s antibiotiky (penicilin – 100 U/ml, streptomycin – 100 μ g/ml) a 0,5% fetálním hovězím sérem (FBS).

Buňky byly kultivovány v RPMI-1640 médiu s antibiotiky a FBS v inkubátoru při 37 °C a v 5% CO₂ atmosféře.

2.4 Určení počtu a vitality buněk

Určení počtu buněk probíhalo za pomoci počítačích sklíček, které se společně s buněčnou suspenzí vkládaly do automatického počítáče buněk. Ten pak vyhodnotil počet buněk na 1 ml.

Vitalita buněk se měří obdobným způsobem, a to pouze s tím rozdílem, že se buněčná suspenze obarví 0,4% trypanovou modří, která pronikne dovnitř buněk přes jejich cytoplazmatickou membránu. Živé buňky dokáží trypanovou modř na rozdíl od mrtvých buněk ze svého vnitřního prostoru odstranit, a proto zůstávají obarvené pouze mrtvé buňky. Automatický počítáč buněk pak vyhodnotí procentuální poměr mezi živými a mrtvými buňkami.

Pro většinu prováděných experimentů byla pro poskytnutí dostatečného signálu vybrána koncentrace 2 000 000 buněk na 1 ml vzorku.

2.5 Příprava albuminových hydroperoxidů

Albuminové ROOH byly připravovány z albuminu (10 mg/ml nebo 100 mg/ml), kyseliny molybdenové a H_2O_2 . Následovala 30min inkubace na ledu a po této inkubační době byla reakce zastavena katalázou (300 jednotek/ml).

Kyselina molybdenová a H_2O_2 jsou systémem, který generuje 1O_2 , a ten následně oxiduje AK přítomné na albuminu za vzniku albuminových ROOH. Míra oxidativního poškození albuminu závisí na koncentracích kyseliny molybdenové a H_2O_2 . Jejich koncentrace se v jednotlivých experimentech odlišovaly a tím ovlivňovaly množství vzniklých albuminových ROOH.

2.6 Příprava reagentů pro FOX test

Pro reakci byly připraveny následující zásobní roztoky: H_2SO_4 (250 mM), heptahydrát síranu železnatého (5 mM) a XO (5 mM).

Zásobní roztoky XO (5 mM) a heptahydrátu síranu železnatého (5 mM) se pomocí H_2SO_4 (250 mM) naředily. Naředěná XO (2,5 mM) a heptahydrát síranu železnatého (2,5 mM) byly následně smíchány (50:50, v/v). Tato směs byla označována jako reagenty pro FOX test. K 800 μ l vzorku bylo přidáno 200 μ l reagentů pro FOX test a následovala 30min inkubace ve tmě. Měření vzorků s reagenty pro FOX test probíhalo na absorpčním spektrometru při vlnové délce 560 nm.

2.7 Izolace malondialdehydu pro měření pomocí HPLC

Izolace MDA ze vzorků začínala centrifugací buněčné suspenze při 5000 g po dobu 5 min. Následovalo odebrání supernatantu a proplach buněčného peletu ve fosfátovém pufru o pH 7,2. Byla provedena další centrifugace při 5000 g po dobu 5 min a opět byl odebrán supernatant. K buněčnému peletu bylo přidáno 200 μ l, fosfátového pufru o pH 7,2 a následovala sonikace na ledu po dobu 90vteřin.

Po sonikaci byl vzorek centrifugován při 2000 g po dobu 10 min a po dokončení centrifugace bylo odebráno 125 μ l supernatantu. K odebranému supernatantu bylo přidáno 25 μ l hydroxidu sodného (6 M), a dále následovala inkubace po dobu 30 min při 60 °C. Touto alkalickou hydrolyzou docházelo k uvolňování MDA vázaného na proteiny.

Dalším krokem bylo přidání 62,5 μ l kyseliny chloristé (35% v/v), čímž byla provedena precipitace proteinů a následovala centrifugace při 16 000 g po dobu 10 min.

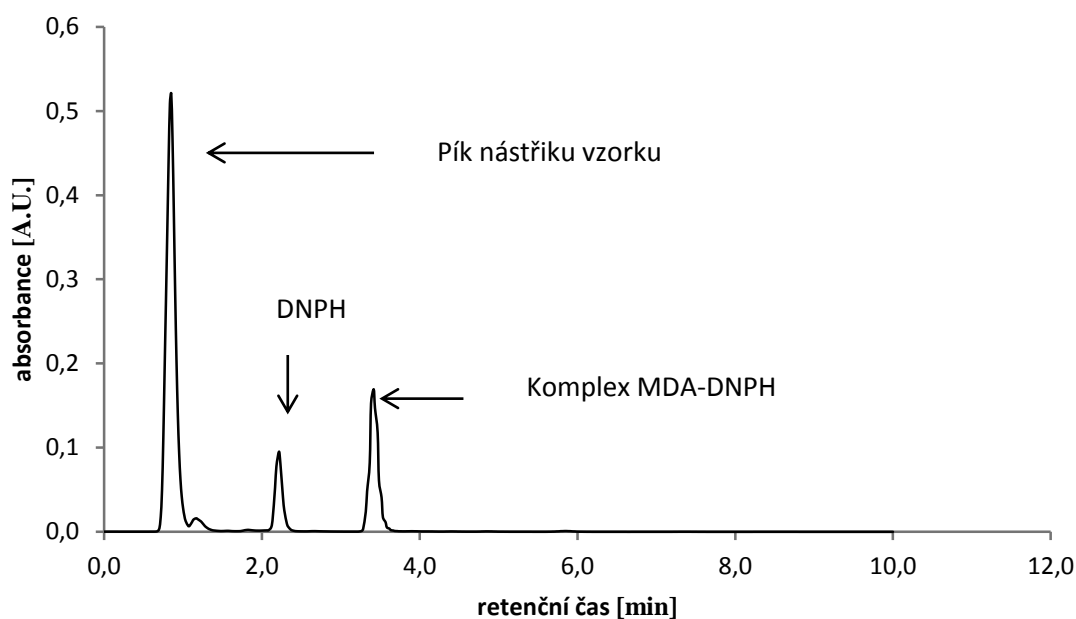
K analýze bylo po centrifugaci odebráno 125 μ l supernatantu do vialky, a ten byl následně inkubován 30 min ve tmě s 1 μ l DNPH (50 mM), rozpuštěným v H₂SO₄ (50%, v/v). Tím vznikl komplex MDA-DNPH.

Mobilní fáze pro analýzu komplexu MDA-DNPH pomocí HPLC s UV detekcí byla připravena z triethylaminu (25 mM) a acetonitrilu (50:50, v/v) a výsledné pH bylo kyselinou octovou upraveno na hodnotu 3,5

Samotná analýza komplexu MDA-DNPH probíhala izokratickou elucí s průtokem 1 ml/min a byla měřena jeho absorbance při vlnové délce 310 nm. Teplota prostoru se vzorky byla 25 °C a teplota kolony 35 °C. Jako objem nástřiku vzorku byla zvolena hodnota 50 μ l.

Pro určení retenčního času komplexu MDA-DNPH byl připraven standard z 0,5 ml H₂SO₄ (1%, v/v) a 20 μ l 1,1,3,3-tetraetoxipropanu, který byl 2 h inkubován ve tmě při 40°C (obrázek č. 3).

Vyhodnocování výsledků probíhalo pomocí programu Empower.



Obrázek č. 3: Ukázka chromatogramu – standard.

2.8 Příprava vzorků pro kalibrační křivku malondialdehydu

Pro přípravu kalibrační křivky pro MDA byl nejprve nachystán standard (příprava popsána v kapitole 2.7 Izolace malondialdehydu pro měření pomocí HPLC). Na absorpčním spektrometru byla změřena jeho absorbance při vlnové délce 240 nm a jako reference byla použita H_2SO_4 (1%, v/v). Ze získané absorbance se vypočítala koncentrace standardu, který byl následně naředěn H_2SO_4 (1%, v/v) na zvolené koncentrace pro kalibrační křivku. Hodnota molární absorpčního koeficientu byla: $\epsilon=13\,700\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Stejně jako v případě jiných vzorků, následovala 30min inkubace ve tmě s $1\mu\text{l}$ DNPH (50 mM), který byl rozpuštěn v H_2SO_4 (50%, v/v), a měření komplexu MDA-DNPH probíhalo pomocí HPLC s UV detekcí.

3 VÝSLEDKY

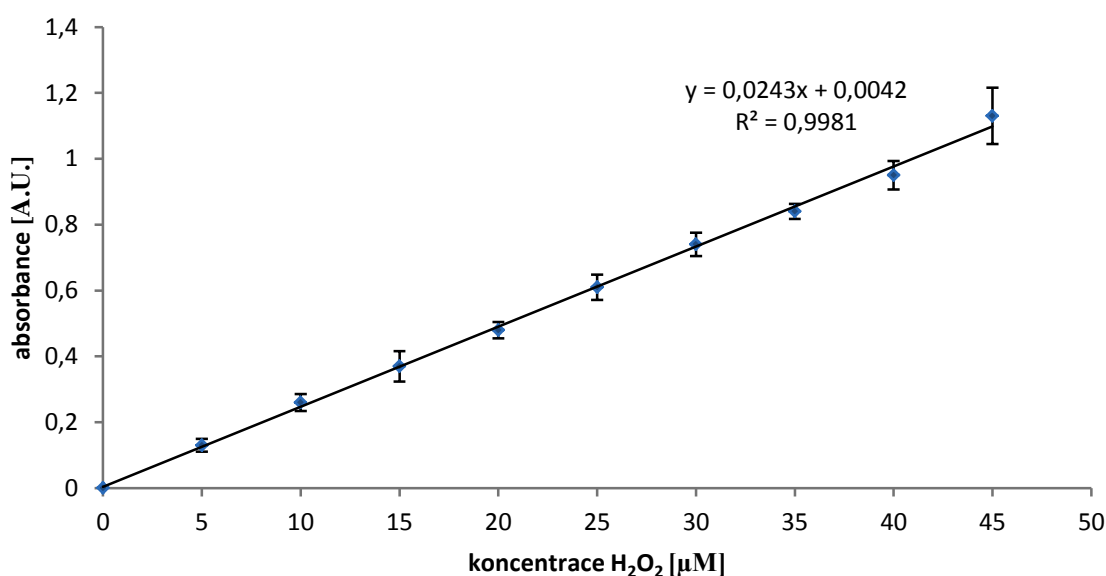
Experimentální část této práce je zaměřena na oxidativní poškození lipidů v lidských nádorových buňkách po přidání proteinových ROOH.

Nejprve byly připraveny albuminové ROOH, u kterých byla měřena jejich kinetika rozpadu v různých podmínkách. V určených časových intervalech byla pomocí FOX testu měřena jejich absorbance, která byla z regresní rovnice kalibrační křivky pro H_2O_2 přepočtena na koncentrace.

Dále bylo měřeno oxidativní poškození lipidů po inkubaci buněčné suspenze s albuminovými ROOH a vitalita buněk rovněž po inkubaci s albuminovými ROOH. Jako marker oxidativního poškození lipidů byl zvolen MDA, který byl po derivatizaci DNPA měřen na HPLC s UV detekcí jako komplex MDA-DNPH.

3.1 Kalibrační křivka pro peroxid vodíku

Kalibrační křivka pro H_2O_2 byla získána z grafu závislosti absorbance na koncentraci H_2O_2 (graf č. 1). Byla připravena škála vzrůstajících koncentrací H_2O_2 : 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 a 45 μM , u kterých byla měřena absorbance pomocí FOX testu. Jako reference byla použita voda a reagenty pro FOX test.



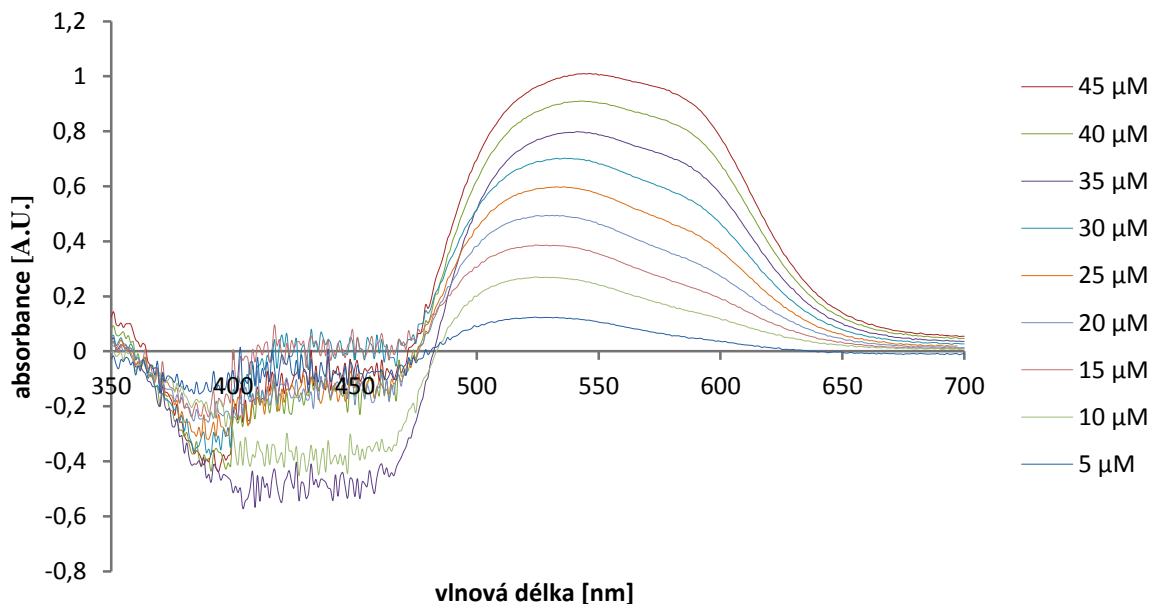
Graf č. 1: Kalibrační křivka pro H_2O_2 . V grafu jsou uvedeny průměry ze tří měření s příslušnými směrodatnými odchylkami.

3.2 Absorpční spektrum kalibrační křivky pro peroxid vodíku

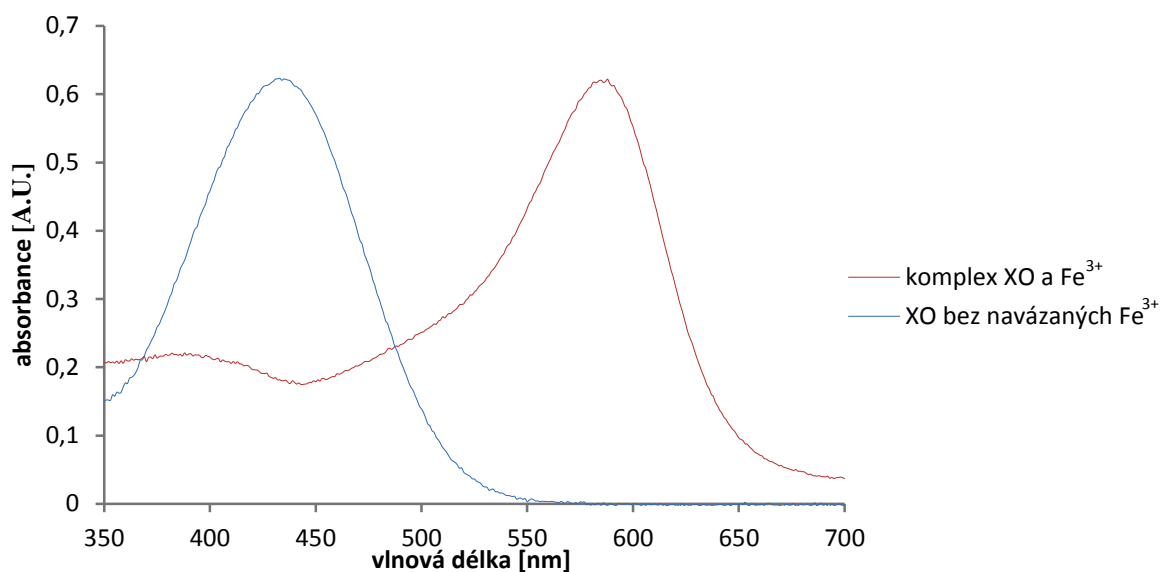
Pomocí FOX testu byla měřena absorpční spektra pro kalibrační křivku pro H_2O_2 v rozsahu vlnových délek 350 až 700 nm, ze kterých se určovalo absorpční maximum. Bylo zjištěno, že absorpční maximum vykazuje při stoupající koncentraci H_2O_2 posun směrem k vyšším hodnotám vlnových délek (graf č. 2).

Posun je způsobený tím, že výsledné absorpční spektrum je složeno z absorpčního spektra pro XO a pro XO s navázanými Fe^{3+} . S rostoucí koncentrací H_2O_2 či ROOH dochází ke snižování koncentrace Fe^{2+} , a tím k nárůstu koncentrace komplexu XO s navázanými Fe^{3+} .

Bylo změřeno absorpční spektrum pro XO, kdy vzorek obsahoval reagenty pro FOX test a nebyl v něm přítomen žádný H_2O_2 či ROOH. Tím bylo docíleno toho, že veškeré Fe^{2+} zůstaly ve své redukované formě a nenavazovaly se na XO. Jako reference byla použita voda. Dále bylo změřeno absorpční spektrum pro XO s navázanými Fe^{3+} . Vzorek obsahoval reagenty pro FOX test a vysokou koncentraci H_2O_2 (12 M). Tím se docílilo oxidace veškerých Fe^{2+} na Fe^{3+} a jejich navázání na XO (graf č. 3). Jako reference byla opět použita voda.



Graf č. 2: Absorpční spektra pro kalibrační křivku H_2O_2 , koncentrace H_2O_2 viz legenda.



Graf č. 3: Absorpční spektrum pro XO bez navázaných Fe^{3+} a absorpční spektrum pro komplex XO a Fe^{3+}

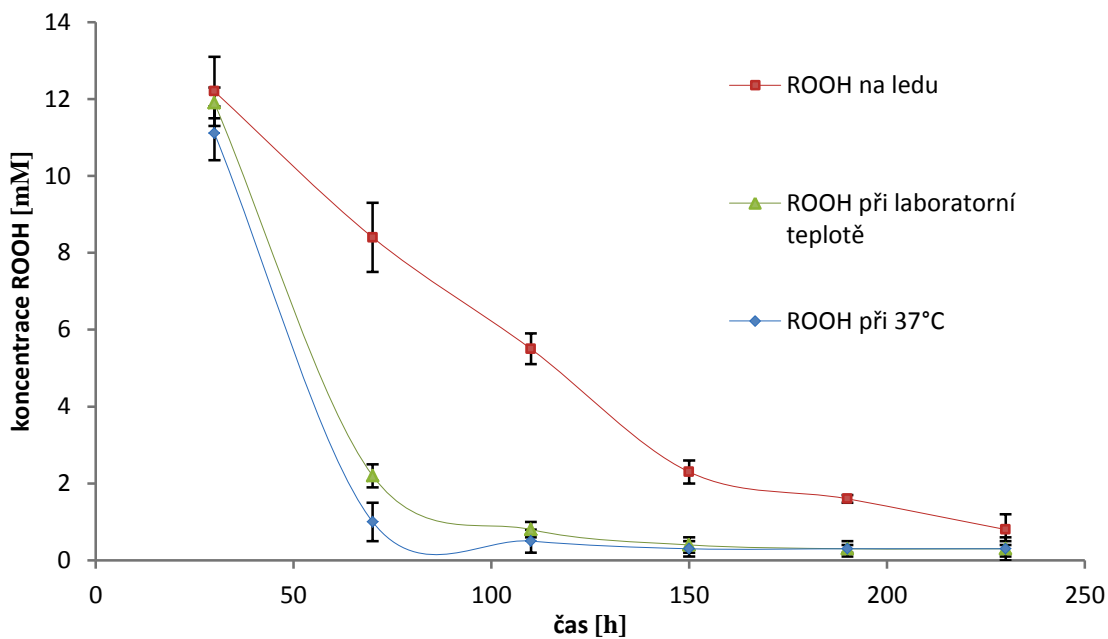
3.3 Kinetika rozpadu albuminových hydroperoxidů

Pro měření kinetiky rozpadu albuminových ROOH byly na ledu připraveny albuminové ROOH (12 mM) a v určených časových intervalech: 0,5, 1,2, 1,8, 2,5, 3,2, a 3,8 h byla měřena jejich absorbance pomocí FOX testu.

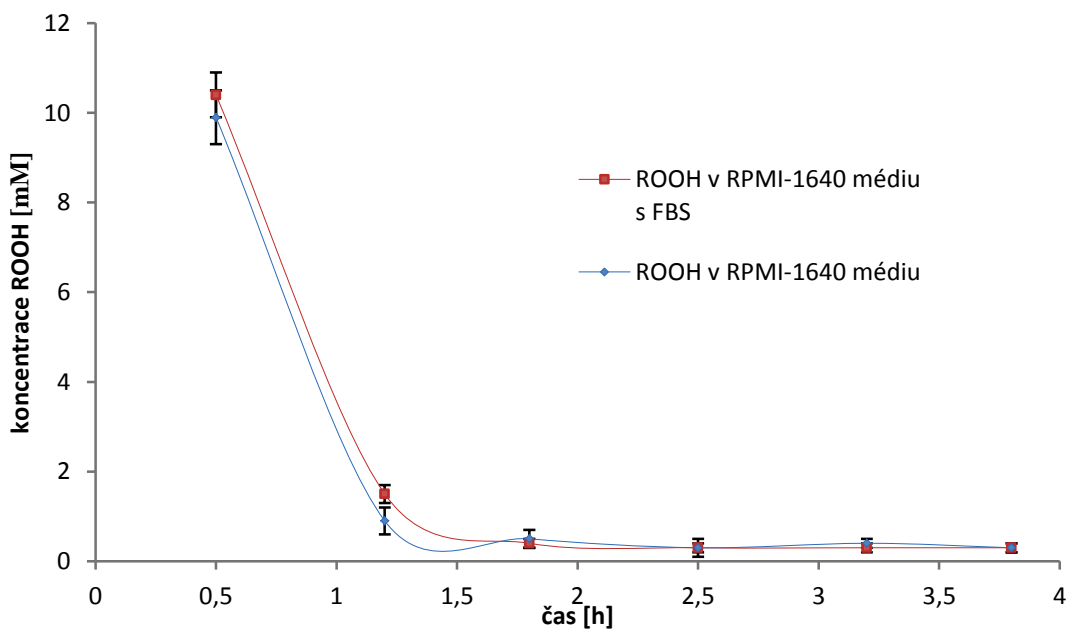
Byla měřena kinetika rozpadu albuminových ROOH naředěných deionizovanou vodou uchovávaných na ledu, při laboratorní teplotě a při 37°C. Jako reference byla použita voda a reagenty pro FOX test.

Dále byla měřena kinetika rozpadu albuminových ROOH uchovávaných při 37°C naředěných RPMI-1640 médiem a RPMI-1640 médiem s FBS. Jako reference bylo použito příslušné médium a reagenty pro FOX test.

Nejvyšší stabilitu vykazovaly albuminové ROOH uchovávané na ledu. Výrazně nižší stabilita byla u albuminových ROOH uchovávaných při laboratorní teplotě a nejnižší stabilita byla zaznamenána, když byly uchovávány při 37°C (graf č. 4). Rozdíl ve stabilitě albuminových ROOH naředěných RPMI-1640 médiem byl oproti albuminovým ROOH naředěných RPMI-1640 médiem s FBS zanedbatelný (graf č. 5). V našem experimentu vykazovaly nejvyšší stabilitu albuminové ROOH uchovávané na ledu.



Graf č. 4: Kinetika rozpadu albuminových ROOH naředěných deionizovanou vodou uchovávaných na ledu, při laboratorní teplotě a při 37°C. V grafu jsou uvedeny průměry ze tří měření s příslušnými směrodatnými odchylkami.



Graf č. 5: Kinetika rozpadu albuminových ROOH při 37°C naředěných RPMI-1640 médiem s FBS a RPMI-1640 médiem. V grafu jsou uvedeny průměry ze tří měření s příslušnými směrodatnými odchylkami.

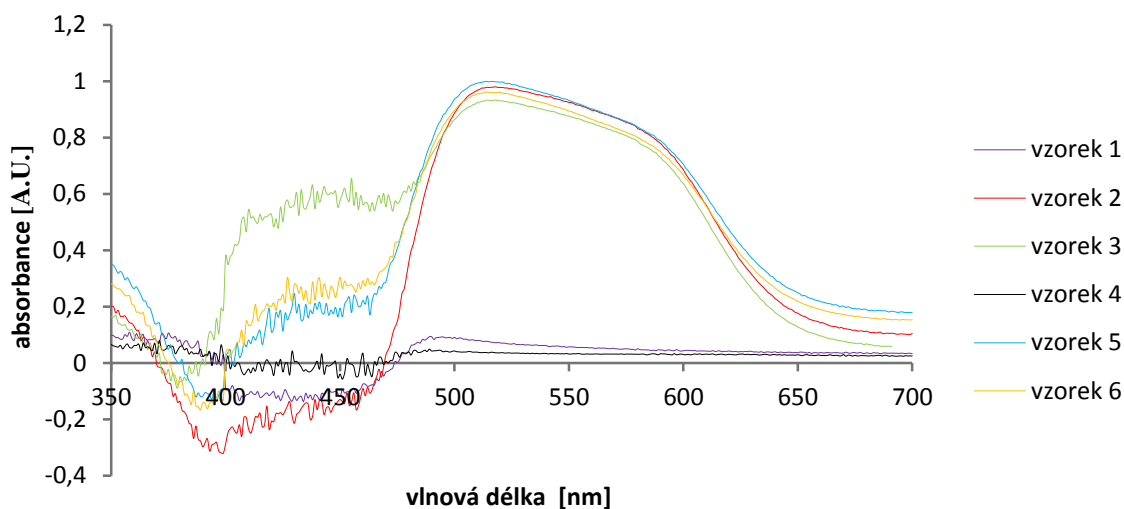
3.4 Stabilita albuminových hydroperoxidů s buněčnou suspenzí a jejich absorpční spektra

Pro toto měření byly na ledu připraveny albuminové ROOH (12 mM), které byly inkubovány s buněčnou suspenzí. Pomocí FOX testu byla měřena absorpční spektra v rozsahu vlnových délek 350 až 700 nm. Absorpční spektra byla měřena v určených časových intervalech: 0,5 a 1,2 h. Bylo připraveno několik vzorků, které se od sebe lišily složením média a přítomností hydroperoxidů. Rovněž byly připraveny různé reference. Konkrétní složky jednotlivých vzorků a použitých referencí jsou uvedeny v rámci popisků grafů (grafy č. 6A, 6B a 7A, 7B).

Z obou absorpčních spekter (graf č. 6A, graf č. 7A) je patrné, že opět dochází k posunu absorpčního maxima (podrobněji vysvětleno v kapitole 3.2 Absorpční spektrum kalibrační křivky pro peroxid vodíku). V okolí $500 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$, což je podle uvedených absorpčních spekter absorpční maximum, absorbuje komplex albuminových ROOH s XO a to se pravděpodobně také podílí na posunu absorpčního maxima (graf č. 8).

Z absorbance získané při vlnové délce 560 nm byly spočítány koncentrace ROOH (graf č. 6B, graf č. 7B).

Různé druhy referencí pro připravené vzorky neměly téměř žádný vliv na změřenou absorbanci. Ve vzorcích inkubovaných s albuminovými ROOH v RPMI-1640 médiu s FBS bylo naměřeno vyšší množství ROOH oproti vzorkům inkubovaných s albuminovými ROOH v RPMI-1640 médiu. Malé množství ROOH bylo naměřeno i u vzorků bez přidaných albuminových ROOH.



Graf č. 6A: Absorpční spektra buněčných suspenzí s albuminovými ROOH a absorpční spektra buněčných suspenzí bez přidaných albuminových ROOH po 0,5h inkubaci. Absorpční spektra pro jednotlivé vzorky viz legenda.



Graf č. 6B: Koncentrace ROOH v buněčné suspenzi s albuminovými ROOH (v RPMI-1640 médiu červeně ●, v RPMI-1640 médiu s FBS zeleně ●) a v buněčné suspenzi bez přidaných albuminových ROOH (modře ●) po 0,5h inkubaci.

vzorek 1: buněčná suspenze v RPMI-1640 médiu, reference voda a reagenty pro FOX test

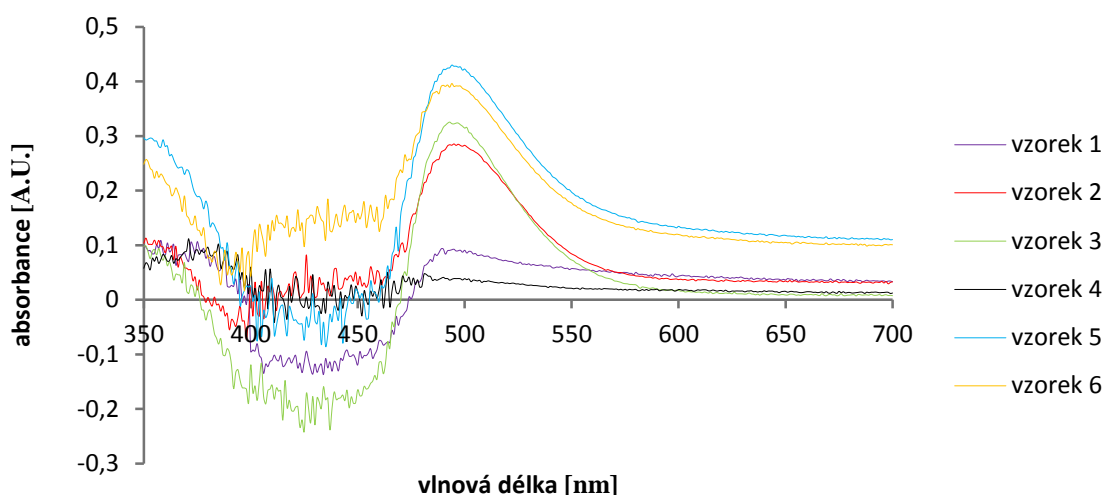
vzorek 2: buněčná suspenze v RPMI-1640 médiu + albuminové ROOH, reference RPMI-1640 médium a reagenty pro FOX test

vzorek 3: buněčná suspenze v RPMI-1640 médiu + albuminové ROOH, reference buněčná suspenze v RPMI-1640 médiu a reagenty pro FOX test

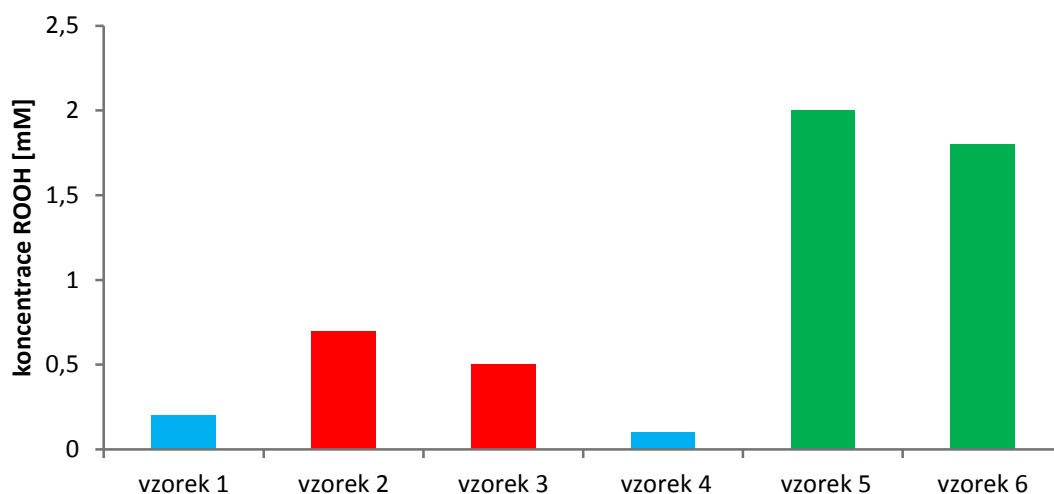
vzorek 4: buněčná suspenze v RPMI-1640 médiu s FBS, reference voda a reagenty pro FOX test

vzorek 5: buněčná suspenze v RPMI-1640 médiu s FBS + albuminové ROOH, reference RPMI-1640 médium s FBS a reagenty pro FOX test

vzorek 6: buněčná suspenze v RPMI-1640 médiu s FBS + albuminové ROOH, reference buněčná suspenze v RPMI-1640 médiu s FBS a reagenty pro FOX test



Graf č. 7A: Absorpční Spektra buněčných suspenzí s albuminovými ROOH a absorpční spektra buněčných suspenzí bez přidaných albuminových ROOH po 1,2h inkubaci. Absorpční spektra pro jednotlivé vzorky viz legenda.



Graf č. 7B: Koncentrace ROOH v buněčné suspenzi s albuminovými ROOH (v RPMI-1640 médiu červeně ●, v RPMI-1640 médiu s FBS zeleně ●) a v buněčné suspenzi bez přidaných albuminových ROOH (modře ●) po 1,2h inkubaci.

vzorek 1: buněčná suspenze v RPMI-1640 médiu, reference voda a reagenty pro FOX test

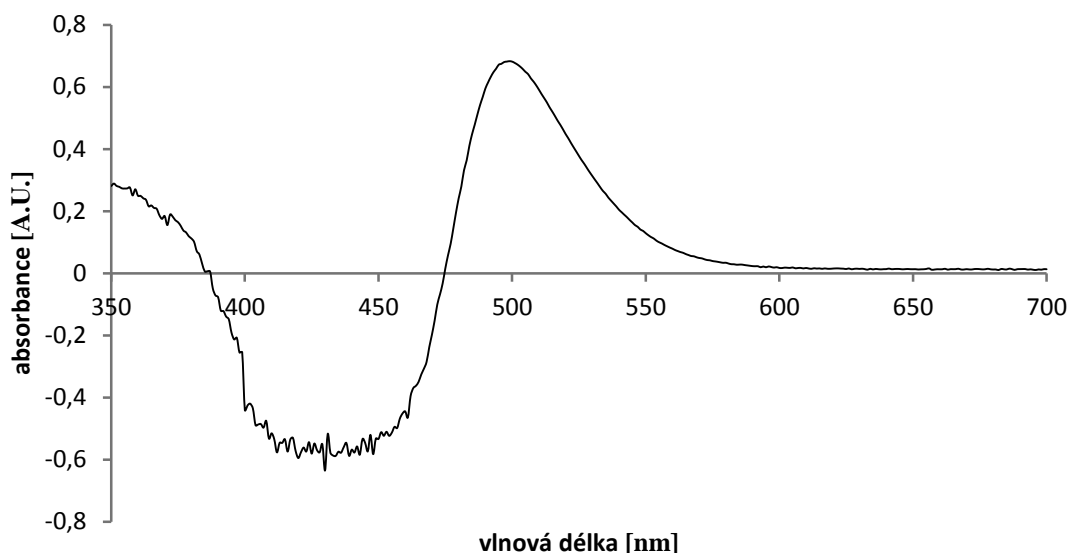
vzorek 2: buněčná suspenze v RPMI-1640 médiu + albuminové ROOH, reference RPMI-1640 médium a reagenty pro FOX test

vzorek 3: buněčná suspenze v RPMI-1640 médiu + albuminové ROOH, reference buněčná suspenze v RPMI-1640 médiu a reagenty pro FOX test

vzorek 4: buněčná suspenze v RPMI-1640 médiu s FBS, reference voda a reagenty pro FOX test

vzorek 5: buněčná suspenze v RPMI-1640 médiu s FBS + albuminové ROOH, reference RPMI-1640 médium s FBS a reagenty pro FOX test

vzorek 6: buněčná suspenze v RPMI-1640 médiu s FBS + albuminové ROOH, reference buněčná suspenze v RPMI-1640 médiu s FBS a reagenty pro FOX test

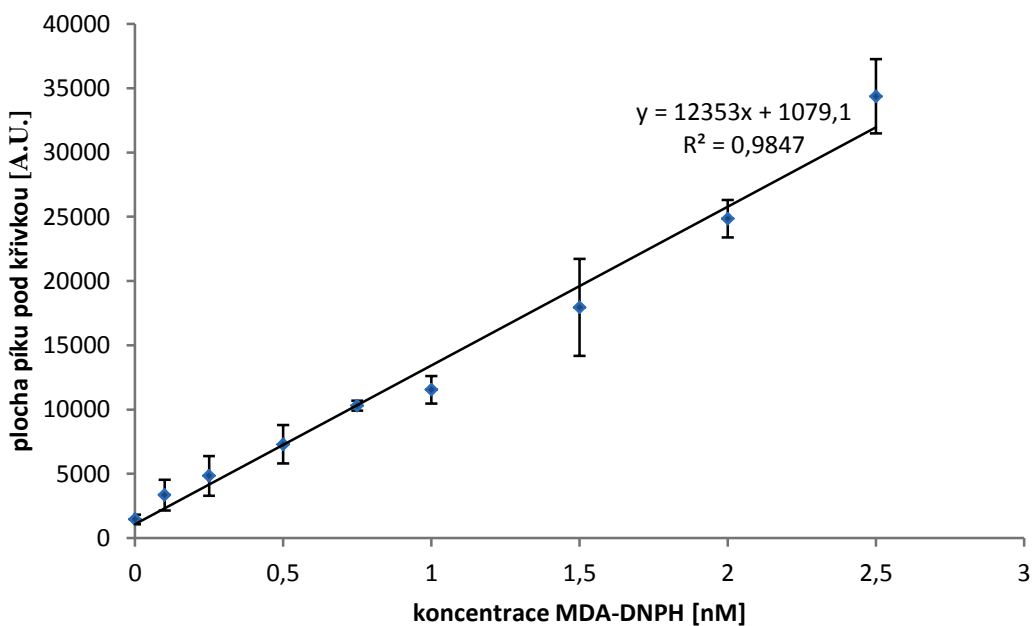


Graf č. 8: Absorpční spektrum komplexu albuminových ROOH s XO

3.5 Kalibrační křivka pro malondialdehyd

Pro kalibrační křivku MDA bylo zvoleno devět vzrůstajících koncentrací: 0, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2 a 2,5 nM. Každý z těchto vzorků byl inkubován s DNPH a byl tedy ve výsledku měřen jako komplex MDA-DNPH.

Kalibrační křivku pro komplex MDA-DNPH znázorňuje graf (graf č. 9).

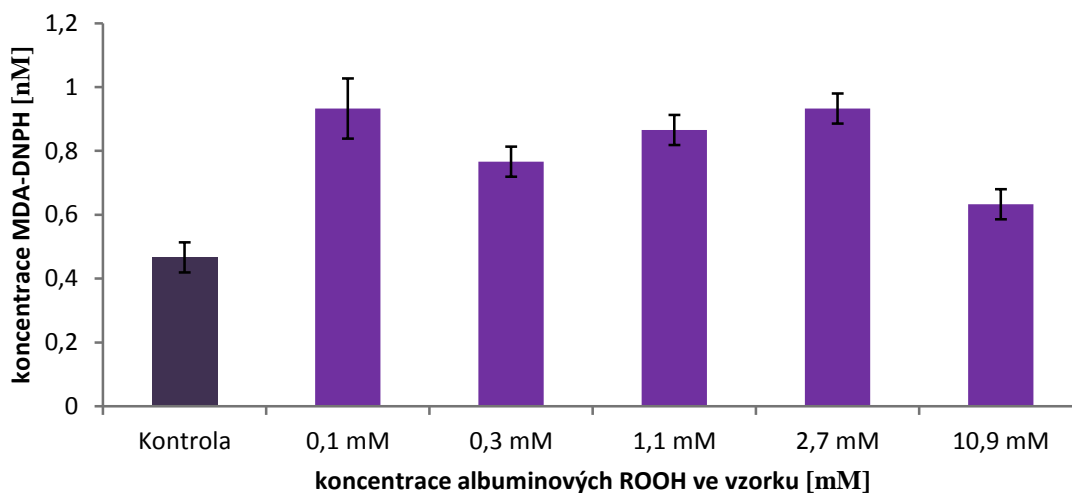


Graf č. 9: Kalibrační křivka pro komplex MDA-DNPH. V grafu jsou uvedeny průměry ze tří měření s příslušnými směrodatnými odchylkami.

3.6 Vliv albuminových hydroperoxidů na lipidovou peroxidaci

Pro testování vlivu albuminových ROOH na lipidovou peroxidaci bylo zvoleno měření komplexu MDA-DNPH. Byly připraveny vzorky buněčné suspenze o koncentraci 2 000 000 buněk/ml v RPMI-1640 médiu. Vzorky, které obsahovaly pouze buněčnou suspenzi, sloužily jako kontrola a pro další vzorky bylo zvoleno pět odlišných finálních koncentrací albuminových ROOH: 0,1, 0,3, 1,1, 2,7 a 10,9 mM. Těchto odlišných koncentrací ve vzorcích bylo docíleno rozdílným ředěním zásobního roztoku albuminových ROOH. Všechny vzorky byly inkubovány po dobu 1 h v inkubátoru při 37 °C v 5% atmosféře CO₂. V grafu (graf č. 10) jsou uvedeny průměrné hodnoty komplexu MDA-DNPH u jednotlivých vzorků, včetně kontrolního.

Po přidání albuminových ROOH k buněčným suspenzím došlo ve všech případech k nárůstu koncentrace komplexu MDA-DNPH oproti kontrole. Za daných podmínek ale není pozorována závislost mezi koncentrací albuminových ROOH a koncentrací komplexu MDA-DNPH.



Graf č. 10: Koncentrace komplexu MDA-DNPH po 1h inkubaci s albuminovými ROOH o různých koncentracích. Koncentrace viz graf.

3.7 Vliv albuminových hydroperoxidů na vitalitu buněk

Pro měření vlivu albuminových ROOH na vitalitu buněk byly provedeny dva experimenty s určitými rozdíly, které budou popsány v následujících odstavcích.

V prvním experimentu byl každý vzorek včetně kontroly připraven z 1 000 000 buněk v 8 ml RPMI-1640 média s FBS. Byly zvoleny tři inkubační časy: 24, 48 a 72 h a pro každý

z těchto časů dvě finální koncentrace albuminových ROOH: 0,014 a 0,14 mM. Těchto rozdílných koncentrací bylo dosaženo ředěním zásobního roztoku albuminových ROOH. Albuminové ROOH byly připraveny z poměrně vysoké koncentrace albuminu (100 mg/ml). Kontrolní vzorek obsahoval pouze buněčnou suspenzi.

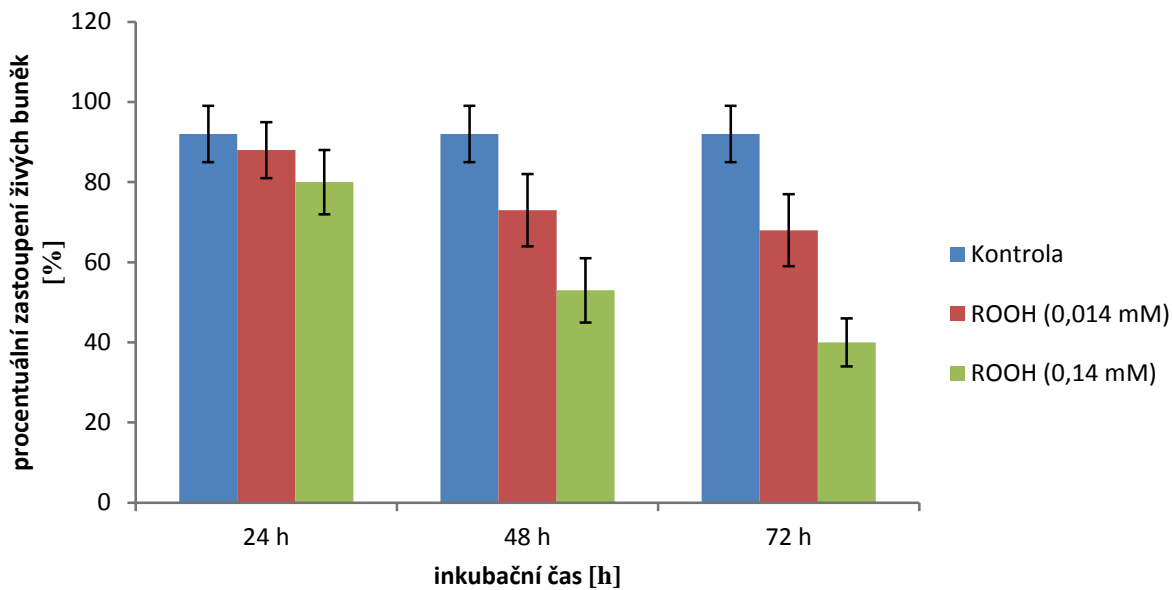
Ve druhém experimentu byl každý vzorek včetně kontrol připraven z 1 500 000 živých buněk v 8 ml RPMI-1640 média s FBS. Byly opět zvoleny tři inkubační časy: 24, 48 a 72 h. Finální koncentrace albuminových ROOH ve vzorcích byly v tomto experimentu tři: 0,3, 1,3 a 1,8 mM. Bylo jich dosaženo použitím zásobních roztoků o stejné koncentraci albuminu (10 mg/ml), ale s různou mírou oxidativního poškození. Každý kontrolní vzorek obsahoval albumin o stejné koncentraci (1,1 mg/ml).

Inkubace v obou experimentech probíhala při 37°C v 5% atmosféře CO₂. Po skončení inkubačních časů byl spočítán absolutní počet buněk v 1 ml vzorku a procentuální zastoupení živých buněk rovněž v 1 ml vzorku. V prvním experimentu byly buňky z kultivačních lahví získávány pouze pomocí trypsinu a ve druhém experimentu pomocí trypsinu a škrabky na buňky, čímž bylo dosaženo vyššího počtu buněk pro měření.

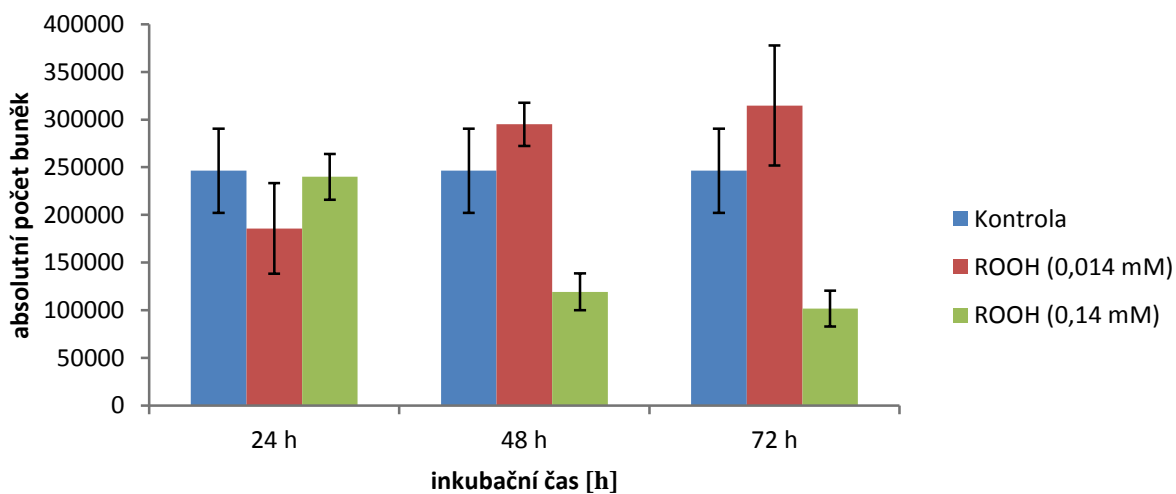
Výsledky z prvního experimentu ukazují, že se vzrůstající koncentrací albuminových ROOH a zároveň s delším inkubačním časem klesá procentuální zastoupení živých buněk ve vzorku (graf č. 11). Co se týče absolutního počtu buněk v 1 ml vzorku, v případě albuminových ROOH (0,014 mM) je při 48 a 72h inkubaci pozorován nárůst oproti kontrole. Jinak je opět pozorován pokles počtu buněk se vzrůstajícím inkubačním časem (graf č. 12).

Výsledky z druhého experimentu neukazují nijak výrazné rozdíly v procentuálním zastoupení živých buněk (graf č. 13). V případě absolutního počtu buněk (graf č. 14) je pozorováno zvyšování počtu buněk u kontrolních vzorků s albuminem (1,1 mg/ml) v závislosti na délce jejich inkubace. U vzorků inkubovaných s albuminovými ROOH (0,3 mM) byl tento trend rovněž pozorován, avšak jejich poměr vůči kontrole zůstal zachován.

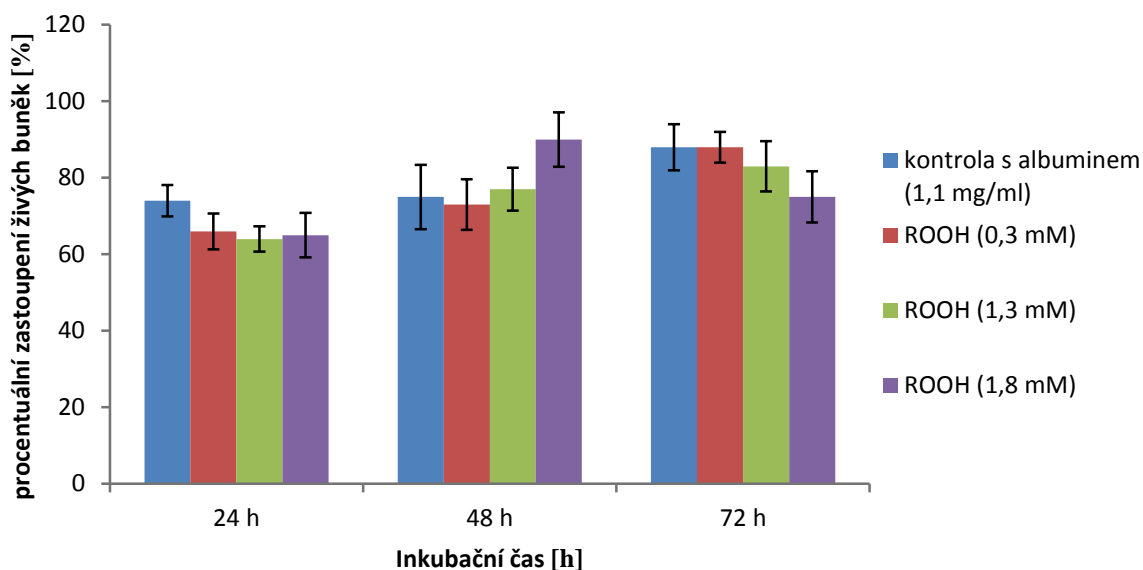
Na vitalitu buněk má vliv jak koncentrace albuminových ROOH, tak i délka inkubačního času. Se vzrůstající koncentrací albuminových ROOH v kombinaci s delším inkubačním časem tedy dochází k větší úmrtnosti buněk. Dále je patrné, že albumin má v kontrolních vzorcích a při nižších koncentracích albuminových ROOH pozitivní vliv na růst buněk. U některých vzorků nekoreluje procentuální zastoupení živých buněk s absolutním počtem buněk v 1 ml.



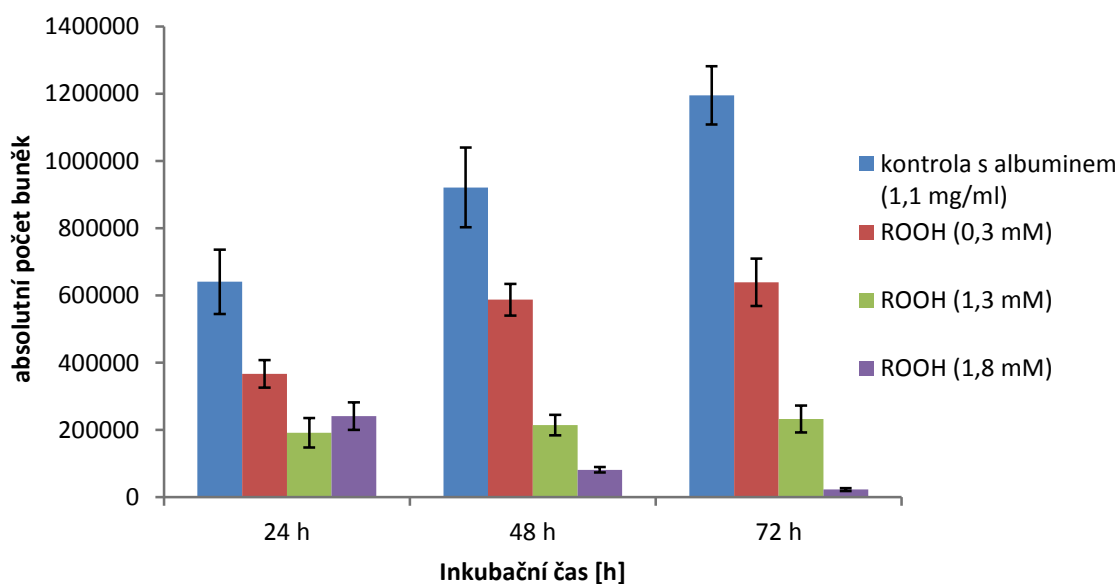
Graf č. 11: Procentuální zastoupení živých buněk ve třech inkubačních časech (24, 48 a 72 h) s různými koncentracemi albuminových ROOH, koncentrace viz legenda. V grafu je uveden průměr ze tří měření s příslušnými směrodatnými odchylkami.



Graf č. 12: Absolutní počet živých buněk ve třech inkubačních časech (24, 48 a 72 h) s různými koncentracemi albuminových ROOH koncentrace viz legenda. V grafu je uveden průměr ze tří měření s příslušnými směrodatnými odchylkami.



Graf č. 13: Procentuální zastoupení živých buněk ve třech inkubačních časech (24, 48 a 72 h) s různými koncentracemi albuminových ROOH, koncentrace viz legenda. V grafu je uveden průměr ze tří měření s příslušnými směrodatnými odchylkami.



Graf č. 14: Absolutní počet živých buněk ve třech inkubačních časech (24, 48 a 72 h) s různými koncentracemi albuminových ROOH, koncentrace viz legenda. V grafu je uveden průměr ze tří měření s příslušnými směrodatnými odchylkami.

4 DISKUZE

Náplní experimentální části této diplomové práce bylo prokázat hypotézu, že za určitých podmínek způsobují proteinové ROOH oxidativní poškození lipidů. Vycházelo se z práce [21], v níž jedním ze závěrů bylo, že proteinové ROOH nezpůsobují za daných podmínek oxidativní poškození lipidů. Mezi původní prací a námi prováděnými experimenty, kterými jsme se snažili prokázat hypotézu, bylo několik zásadních rozdílů a několik shod, které budou probrány v následujících kapitolách. Experimenty pro potvrzení této hypotézy spočívaly v inkubaci buněčné suspenze s albuminovými ROOH, měření koncentrace albuminových ROOH a detekci komplexu MDA-DNPH. Naše práce se dále zabývala měřením kinetiky rozpadu albuminových ROOH za různých podmínek a vlivem albuminových ROOH na vitalitu buněk.

4.1 Kinetika rozpadu albuminových hydroperoxidů

V našem experimentu vykazovaly nejvyšší stabilitu albuminové ROOH uchovávané na ledu. Výrazně nižší stabilita byla zaznamenána u albuminových ROOH uchovávaných při laboratorní teplotě a nejnižší stabilita byla při jejich uchovávání v 37°C. Rozdíl ve stabilitě albuminových ROOH naředěných RPMI-1640 médiem byl oproti albuminovým ROOH naředěných RPMI-1640 médiem s FBS zanedbatelný.

Kinetika rozpadu albuminových ROOH byla měřena i v rámci jiného experimentu [50]. Albumin (10mg/ml) byl rozpuštěn ve fosfátovém pufru (20 mM) o hodnotě pH 7,4 a poté byl vystaven záření 63 Gy/min. Zářením vznikaly ROS, přičemž bylo zjištěno, že za veškerou peroxidaci proteinů stojí HO[•]. Takto připravené albuminové ROOH byly poměrně stabilní. Uchováváním při laboratorní teplotě došlo po týdnu k 30% úbytku jejich množství. Uchováváním při nižších teplotách byl tento úbytek zpomalen. Měření albuminových ROOH probíhalo jodometrickou metodou [50].

Vliv teploty na rozpad albuminových ROOH je v našem i jiném experimentu [50] poměrně výrazný. Rychlost chemických reakcí je totiž závislá na rychlostní konstantě (k), která je tím vyšší, čím vyšší je teplota. Tuto vlastnost charakterizuje Arrheniova rovnice.

$$k = Ae^{-E/(RT)} \quad [32]$$

Pro další experimenty vyplývá, že je vhodné albuminové ROOH připravovat před přidáním ke vzorku, případně je udržovat několik minut na ledu.

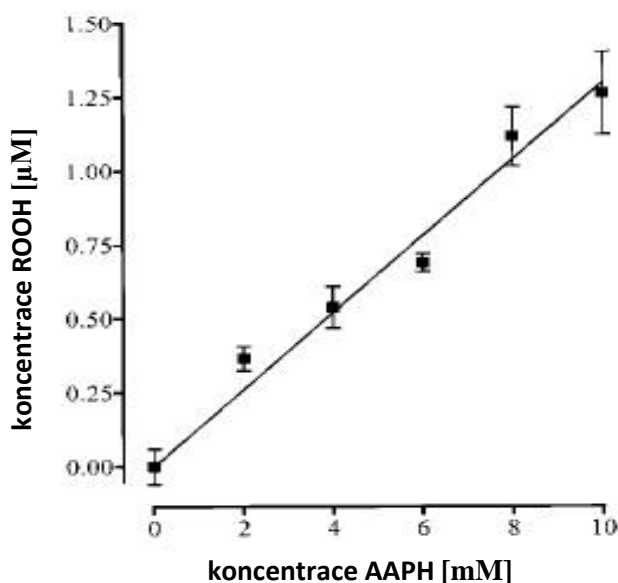
4.2 Detekce hydroperoxidů v buněčné suspenzi

V našem experimentu bylo ve vzorcích inkubovaných s albuminovými ROOH v RPMI-1640 médiu s FBS naměřeno vyšší množství ROOH oproti vzorkům inkubovaných s albuminovými ROOH v RPMI-1640 médiu. Malé množství ROOH bylo naměřeno i u vzorků bez přidaných albuminových ROOH.

Experimenty prováděné v původní práci [21] probíhaly na buněčné linii U937, což jsou buňky volně se pohybující (plovoucí) v kultivačním médiu.

Buněčná linie byla kultivována za stejných podmínek jako naše buněčná linie a to v RPMI-1640 médiu s antibiotiky (penicilin – 100 U/ml, streptomycin – 100 μ g/ml) a 5% FBS. Co se týče koncentrace buněčné suspenze pro vzorky, řádově bylo použito stejné množství a to 5 000 000/ml v původních experimentech [21] a 2 000 000/ml v našich experimentech.

K buněčné suspenzi byl v původní práci přidán 2,2-azobis (amidinopropan)dihydrochlorid (AAPH) o známé koncentraci, který při svém rozkladu postupně generoval ROO^\bullet , které následně oxidovaly buněčné proteiny za vzniku ROOH. Přesnou závislost mezi koncentrací přidaného AAPH a vzniklými ROOH znázorňuje graf (graf č. 13). Pro následující měření vzniklých ROOH byla ke vzorkům přidána kyselina trichloroctová, která AAPH vysrážela. Neodstraněné AAPH by jinak mohlo interferovat s reagenty pro FOX test. Jako kontrola byla použita buněčná suspenze bez AAPH a jako reference voda [21].



Graf č. 13: Závislost vzniku ROOH na koncentraci AAPH (Převzato a upraveno Gieseg, S., S. Duggan, and J. M. Gebicki, (2000)).

Dalšími testy bylo zjišťováno, zda se ROOH vytvořily na proteinech nebo lipidech [21].

Vzorky buněčné suspenze byly 20 h inkubovány s AAPH (10 mM). Po proběhlé inkubační době byly propláchnuty fosfátovým pufrům, kyselinou trichloroctovou došlo k vysrážení AAPH a vzorky byly rozděleny na dvě skupiny.

V první skupině buněčných precipitátů byla koncentrace ROOH zjišťována přímo, zatímco ve druhé skupině buněčných precipitátů byly nejprve acetonem odstraněny lipidy. Vzorky s takto odstraněnými lipidy vykazovaly ztrátu absorbance o $16,4 \pm 4\%$. Ztráta absorbance byla pravděpodobně způsobena tím, že kromě lipidů došlo i k odstranění některých proteinů.

Tato domněnka byla potvrzena dalším testem, ve kterém byly vzorky po promytí kyselinou trichloroctovou propláchnuty metanolem a poté hexanem, čímž došlo k odstranění více než 99 % lipidů. Jelikož je tato promývací metoda šetrnější k proteinům, tak nedošlo k jejich vymytí. Při měření nevykazovala absorbance žádný pokles. Tím bylo prokázáno, že za těchto podmínek ROOH vznikají pouze na proteinech a nikoliv na lipidech [21].

V našem experimentu vykazovaly vyšší koncentrace ROOH vzorky buněčné suspenze, které, byly s albuminovými ROOH inkubovány v RPMI-1640 médiu s přidaným FBS. To bylo pravděpodobně způsobeno přítomností FBS, které je bohaté na široké spektrum bílkovin, a to zejména albuminu. Albuminové ROOH přidané do buněčné suspenze reagovaly s bílkovinami FBS za vzniku ROS ($^1\text{O}_2$, ROO^\bullet , RO^\bullet). Tyto ROS se dále podílely na oxidaci proteinů a lipidů ve vzorcích, čímž vznikaly proteinové a lipidové ROOH, které zvyšovaly celkové množství ROOH ve vzorcích [4] [36].

Veškeré hydroperoxydy v původním experimentu byly určeny jako proteinové. [21] V našem experimentu se s daným inkubačním časem (1,2 h) spíše jedná o směs proteinových a lipidových ROOH ovšem s tím, že za jejich vznikem stojí právě albuminové ROOH, které byly do vzorku přidány. Protože jsou lipidové ROOH primárním produktem při oxidativním poškození lipidů, byla jejich přítomnost ve vzorcích nepřímo prokázána dalším experimentem – měřením koncentrace komplexu MDA-DNPH (podrobněji v kapitole 4.3 Vliv proteinových hydroperoxidů na lipidovou peroxidaci).

4.3 Vliv proteinových hydroperoxidů na lipidovou peroxidaci

V našem experimentu došlo po přidání albuminových ROOH k buněčným suspenzím ve všech případech k nárůstu koncentrace komplexu MDA-DNPH oproti kontrole. Za daných

podmínek ale není pozorována závislost mezi koncentrací albuminových ROOH a koncentrací komplexu MDA-DNPH.

V původní práci [21] byly vzorky buněčné suspenze inkubovány 12 h s AAPH (10 mM) při 37°C. Následné měření koncentrace MDA proběhlo metodou TBARS. U kontrolních vzorků obsahujících pouze buněčnou suspenzi byla hodnota MDA 575 ± 46 nM a u vzorků inkubovaných s AAPH (10 mM) 532 ± 12 nM. Detekcí MDA a detekcí lipidových ROOH (podrobněji v kapitole 4.2 Detekce hydroperoxidů v buněčné suspenzi) se tedy za daných reakčních podmínek neprokázalo žádné oxidativní poškození lipidů [21].

V další práci bylo prokázáno, že proteinové ROOH způsobují oxidativní poškození DNA. Oxidativní poškození lipidů nebylo v této práci předmětem výzkumu [20].

Autoři obou prací [21][20] uvádí proteiny jako primární cíl pro oxidaci způsobenou proteinovými ROOH a DNA jako sekundární cíl.

Za námi stanovených podmínek oxidativní poškození lipidů proteinovými ROOH prokázáno bylo. Hlavním rozdílem v našem experimentu oproti původnímu [21] byla mnohonásobně vyšší koncentrace použitých proteinových ROOH. Koncentrace v našem experimentu se pohybovaly v rozmezí 0,1 až 10,9 mM, zatímco v původním experimentu byla koncentrace proteinových ROOH po inkubaci s AAPH (10 mM) 1,25 μ M (graf č. 13).

V našem experimentu nebyla prokázána korelace mezi koncentrací přidávaných albuminových ROOH a koncentrací naměřeného komplexu MDA-DNPH. Svůj podíl na tom může mít skutečnost, že MDA není jediný produkt, který může během peroxidace lipidů vznikat a sloužit tak jako její marker. Z lipidových ROOH, jakožto primární produktů oxidativního poškození lipidů, mohou vznikat různé formy ROS ($^1\text{O}_2$, ROO^\bullet , RO^\bullet), které se dále podílejí na oxidaci, a sekundární produkty. Mezi sekundární produkty patří například propanal, 4-hydroxy-2-hexenal a 4-HNE [4]. Dalším vysvětlením, může být fakt, že se stoupající koncentrací albuminových ROOH ve vzorcích byla zároveň zvyšována i koncentrace albuminu. Jak již bylo prokázáno, proteiny jsou cílem pro oxidativní poškození proteinovými ROOH [21]. Místo lipidů tedy mohly být oxidovány AK na albuminu, případně mohly vznikat crosslinky mezi DNA a proteiny [20], či mezi proteiny samotnými. Dále může být oxidována proteinová kostra, což vede až k fragmentaci [7].

Pro další experimenty by bylo vhodné, aby bylo rozdílných koncentrací albuminových ROOH ve vzorcích dosaženo použitím zásobních roztoků o stejné koncentraci albuminu, ale s různou mírou oxidativního poškození. Pro přesnější určení závislosti míry oxidativního poškození albuminovými ROOH by navíc bylo vhodné použít více druhů markerů, jako například lipidové ROOH či 4-HNE.

4.4 Vliv albuminových hydroperoxidů na vitalitu buněk

V našich experimentech bylo zjištěno, že na vitalitu buněk má vliv jak koncentrace albuminových ROOH, tak i délka inkubačního času. Se vzrůstající koncentrací albuminových ROOH v kombinaci s delším inkubačním časem dochází k větší úmrtnosti buněk. Dále je patrné, že albumin má v kontrolních vzorcích a při nižších koncentracích albuminových ROOH pozitivní vliv na růst buněk. U některých vzorků nekoreluje procentuální zastoupení živých buněk s absolutním počtem buněk v 1 ml.

V rámci jiných experimentů byla vitalita buněk po přidání ROOH testována například na buňkách lidských keratinocytů [26] či buněčné linii SW480 [2].

Testování vitality v buněčné suspenzi lidských keratinocytů po přidání ROOH probíhalo ve vzorcích o koncentraci 2 500 000 buněk/ml. K buněčné suspenzi byl přidán kumenový ROOH (1 mM a 25 mM) a t-butyl ROOH (1 mM a 25 mM). Poté následovala 30min inkubace při 35°C. Při těchto inkubačních podmínkách bylo zjištěno, že vyšší koncentrace kumenových ROOH (25 mM) má na vitalitu buněk největší vliv, neboť došlo k úmrtí téměř všech buněk. Nižší koncentrace kumenového ROOH (1 mM) a obě koncentrace t-butyl ROOH neměly za těchto podmínek na vitalitu buněk žádný signifikantní vliv [26].

Při testování vitality na linii SW480 byly použity lipidové ROOH vytvořené z kyseliny linolové. V tomto experimentu byly zvoleny tři inkubační časy: 6, 24 a 48 h a v každém z těchto časů různé koncentrace lipidových ROOH: 10, 50, 100 a 200 μ M. Vitalita buněk byla vyhodnocována pomocí testu na stanovení metabolické aktivity buněk. Při tomto testu se k buněčné suspenzi přidává (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid), který je mitochondriálními enzymy dýchacího řetězce převeden ze svého původního žlutého zabarvení na fialové a toto je spektrofotometricky měřeno. V tomto případě měla na vitalitu buněk prokazatelný vliv jak koncentrace přidávaných lipidových ROOH, tak i délka inkubace. Při 6h inkubaci nedocházelo k žádným výrazným změnám ve vitalitě. Ovšem v případě 24 a 48h inkubačních dob byla vitalita buněk tím nižší, čím delší byla inkubační doba a zároveň vyšší koncentrace přidávaných lipidových ROOH [2].

Jak v našich, tak i v experimentech v ostatních pracích [26][2] je patrné, že na vitalitu buněk má vliv jak koncentrace ROOH, tak i inkubační doba.

Skutečnost, že v našem experimentu procentuální zastoupení živých buněk nekoreluje s absolutním počtem buněk, může být vysvětlena tím, že se jedná o adherentní buňky. Ty mohou být po své smrti odloučeny ze dna kultivační lahve a tím dojde ještě před použitím trypsinu k jejich odstranění. Z toho důvodu je vhodné při měření vitality u tohoto typu buněk

hodnotit spíše absolutní množství buněk ve vzorku, než procentuální zastoupení živých buněk.

V případě testování vlivu albuminových ROOH na vitalitu buněk je dále vhodné, aby byla pro každý inkubační čas připravena kontrola s albuminem o stejné koncentraci, jaká byla použita pro přípravu albuminových ROOH. Kromě toho je také vhodné využívat pro získání různých finálních koncentrací albuminových ROOH ve vzorcích zásobní roztoky albuminových ROOH o stejné koncentraci albuminu, ale s různou mírou oxidativního poškození. Těmito opatřeními lze snížit chybnou interpretaci výsledků, neboť albumin má nejen pozitivní vliv na růst buněk [16], ale i antioxidační vlastnosti. Albumin dokáže reagovat s četnými druhy molekul včetně ROS. Albuminovými antioxidačními strukturami jsou jeho metioninová rezidua, která jsou ROS oxidována na metionin sulfoxid [46].

5 ZÁVĚR

Tématem této diplomové práce bylo posuzování vlivu proteinových ROOH na oxidativní poškození lipidů v lidských nádorových buňkách. Jako zástupce proteinových ROOH byl vybrán albuminový ROOH. Experimentální část se zabývala albuminovými ROOH a jejich vlivem na oxidativní poškození lipidů a vitalitu buněk. Jako marker pro posouzení míry oxidativního poškození lipidů byl zvolen MDA.

Na začátku práce byla položena hypotéza, která předpokládala, že podobně jako proteiny a NK mohou být za určitých podmínek cílem pro oxidativní poškození způsobené proteinovými ROOH i lipidy.

Získané výsledky lze stručně shrnout do několika dílčích závěrů.

Stabilita albuminových hydroperoxidů je závislá na teplotě. Při vyšších teplotách dochází k jejich rychlejšímu rozpadu.

Měřením koncentrace MDA (komplexu MDA-DNPH) bylo prokázáno, že při podmínkách v našem experimentu způsobují albuminové ROOH oxidativní poškození lipidů. Hypotéza byla tedy potvrzena.

Albuminové ROOH mají vliv na vitalitu buněk. S rostoucí koncentrací albuminových ROOH a zároveň s rostoucí délkou inkubačního času dochází k větší úmrtnosti buněk.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

$^1\text{O}_2$	singletní kyslík
4-HNE	4-hydroxynonenal
AAPH	2,2-azobis (amidinopropan)dihydrochlorid
AK	aminokyselina
DNPB	2,4-dinitrofenylhydrazin
FBS	fetální hovězí sérum (fetal bovine serum)
FOX assay	oxidace iontů železa v prostředí xylenové oranže (the ferrous oxidation-xylenol orange)
H_2O_2	peroxid vodíku
HO^\bullet	hydroxylový radikál
HO_2^\bullet	hydroperoxylový radikál
HOO^\bullet	peroxylový radikál
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
MDA	malondialdehyd
MK	mastná kyselina
MS	hmotnostní detekce (mass spectrometry)
NK	nukleová kyselina
O_2	molekulární kyslík
$\text{O}_2^{\bullet-}$	superoxidový aniontový radikál
PUFA	polynenasycená mastná kyselina (polyunsaturated fatty acid)
ROO^\bullet	peroxylový radikál
ROOH	organický hydroperoxid
ROS	reaktivní formy kyslíku
TBA	kyselina thiobarbiturová
TBARS	substance reagující s kyselinou thiobarbiturovou
XO	xylenová oranž

7 LITERATURA

- [1] Aikens, J., and T. A. Dix, 1991, PERHYDROXYL RADICAL (HOO.) INITIATED LIPID-PEROXIDATION - THE ROLE OF FATTY-ACID HYDROPEROXIDES: *Journal of Biological Chemistry*, v. 266, p. 15091-15098.
- [2] Angeli, J. P. F., C. C. M. Garcia, F. Sena, F. P. Freitas, S. Miyamoto, M. H. G. Medeiros, and P. Di Mascio, 2011, Lipid hydroperoxide-induced and hemoglobin-enhanced oxidative damage to colon cancer cells: *Free Radical Biology and Medicine*, v. 51, p. 503-515.
- [3] Awasthi, Y. C., R. Sharma, J. Z. Cheng, Y. Yang, A. Sharma, S. S. Singhal, and S. Awasthi, 2003, Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling: *Molecular Aspects of Medicine*, v. 24, p. 219-230.
- [4] Ayala, A., M. F. Munoz, and S. Arguelles, 2014, Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal: *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2014, p. 360438-360438.
- [5] Baier, J., T. Maisch, M. Maier, E. Engel, M. Landthaler, and W. Baeumler, 2006, Singlet oxygen generation by UVA light exposure of endogenous photosensitizers: *Biophysical Journal*, v. 91, p. 1452-1459.
- [6] Banerjee, D., U. K. Madhusoodanan, M. Sharanabasappa, S. Ghosh, and J. Jacob, 2003, Measurement of plasma hydroperoxide concentration by FOX-1 assay in conjunction with triphenylphosphine: *Clinica Chimica Acta*, v. 337, p. 147-152.
- [7] Berlett, B. S., and E. R. Stadtman, 1997, Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress: *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p. 20313-20316
- [8] Cadet, J., and P. Di Mascio, 2006, Peroxides in biological system. In *The Chemistry of Peroxides* (Rappaport, Z., et al., eds). p. 915 – 999, John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- [9] Carini, M., G. Aldini, and R. M. Facino, 2004, Mass spectrometry for detection of 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE) adducts with peptides and proteins: *Mass Spectrometry Reviews*, v. 23, p. 281-305.

- [10] Dalleau, S., M. Baradat, F. Gueraud, and L. Huc, 2013, Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance: *Cell Death and Differentiation*, v. 20, p. 1615-1630.
- [11] Davies, M. J., S. L. Fu, and R. T. Dean, 1995, PROTEIN HYDROPEROXIDES CAN GIVE RISE TO REACTIVE FREE-RADICALS: *Biochemical Journal*, v. 305, p. 643-649.
- [12] Del Rio, D., A. J. Stewart, and N. Pellegrini, 2005, A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress: *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*, v. 15, p. 316-328.
- [13] DeLong, J. M., R. K. Prange, D. M. Hodges, C. F. Forney, M. C. Bishop, and M. Quilliam, 2002, Using a modified ferrous oxidation-xylenol orange (FOX) assay for detection of lipid hydroperoxides in plant tissue: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 248-254.
- [14] DeRosa, M. C., and R. J. Crutchley, 2002, Photosensitized singlet oxygen and its applications: *Coordination Chemistry Reviews*, v. 233, p. 351-371.
- [15] Esterbauer, H., R. J. Schaur, and H. Zollner, 1991, CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF 4-HYDROXYNONENAL, MALONALDEHYDE AND RELATED ALDEHYDES: *Free Radical Biology and Medicine*, v. 11, p. 81-128.
- [16] Francis, G. L., 2010, Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications: *Cytotechnology*, v. 62, p. 1-1
- [17] Fridovich, I., 1995, SUPEROXIDE RADICAL AND SUPEROXIDE DISMUTASES: *Annual Review of Biochemistry*, v. 64, p. 97-112.
- [18] Garcia-Ruiz, I., P. de la Torre, T. Diaz, E. Esteban, I. Fernandez, T. Munoz-Yague, and J. A. Solis-Herruzo, 2002, Sp1 and Sp3 transcription factors mediate malondialdehyde-induced collagen alpha 1(I) gene expression in cultured hepatic stellate cells: *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 30551-30558.
- [19] Gay, C. A., and J. M. Gebicki, 2002, Perchloric acid enhances sensitivity and reproducibility of the ferric-xylenol orange peroxide assay: *Analytical Biochemistry*, v. 304, p. 42-46.

- [20] Gebicki, S., and J. M. Gebicki, 1999, Crosslinking of DNA and proteins induced by protein hydroperoxides: *Biochemical Journal*, v. 338, p. 629-636.
- [21] Gieseg, S., S. Duggan, and J. M. Gebicki, 2000, Peroxidation of proteins before lipids in U937 cells exposed to peroxy radicals: *Biochemical Journal*, v. 350, p. 215-218.
- [22] Girotti, A. W., 1998, Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems: *Journal of Lipid Research*, v. 39, p. 1529-1542.
- [23] Gutteridge, J. M. C., 1995, LIPID-PEROXIDATION AND ANTIOXIDANTS AS BIOMARKERS OF TISSUE-DAMAGE: *Clinical Chemistry*, v. 41, p. 1819-1828.
- [24] Halliwell, B., and J. M. C. Gutteridge, 1984, OXYGEN-TOXICITY, OXYGEN RADICALS, TRANSITION-METALS AND DISEASE: *Biochemical Journal*, v. 219, p. 1-14
- [25] Halliwell, B., M. V. Clement, and L. H. Long, 2000, Hydrogen peroxide in the human body: *Febs Letters*, v. 486, p. 10-13., v. 486, p. 10-13.
- [26] Iannone, A., A. Marconi, G. Zambruno, A. Giannetti, V. Vannini, and A. Tomasi, 1993, FREE-RADICAL PRODUCTION DURING METABOLISM OF ORGANIC HYDROPEROXIDES BY NORMAL HUMAN KERATINOCYTES: *Journal of Investigative Dermatology*, v. 101, p. 59-63.
- [27] Jessup, W., R. T. Dean, and J. M. Gebicki, 1994, IODOMETRIC DETERMINATION OF HYDROPEROXIDES IN LIPIDS AND PROTEINS: *Oxygen Radicals in Biological Systems, Pt C*, v. 233, p. 289-303.
- [28] Knight, J. A., 2000, Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system: *Annals of Clinical and Laboratory Science*, v. 30, p. 145-158.
- [29] Knight, J. A., R. K. Pieper, and L. McClellan, 1988, SPECIFICITY OF THE THIOBARBITURIC ACID REACTION - ITS USE IN STUDIES OF LIPID-PEROXIDATION: *Clinical Chemistry*, v. 34, p. 2433-2438.
- [30] Luc, R., and C. Vergely, 2008, Forgotten radicals in biology: *International journal of biomedical science : IJBS*, v. 4, p. 255-9.
- [31] Mahipal, S. V. K., J. Subhashini, M. C. Reddy, M. M. Reddy, K. Anilkumar, K. R. Roy, G. V. Reddy, and P. Reddanna, 2007, Effect of 15-lipoxygenase metabolites, 15-(S)-HPETE and 15-(S)-HETE on chronic myelogenous leukemia cell line K-562:

- Reactive oxygen species (ROS) mediate caspase-dependent apoptosis: *Biochemical Pharmacology*, v. 74, p. 202-214.
- [32] MALIJEVSKÝ, Anatol. Breviář z fyzikální chemie. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2000. ISBN 80-7080-403-3
- [33] Marcinkiewicz, J., B. Chain, B. Nowak, A. Grabowska, K. Bryniarski, and J. Baran, 2000, Antimicrobial and cytotoxic activity of hypochlorous acid: interactions with taurine and nitrite: *Inflammation Research*, v. 49, p. 280-289.
- [34] Marnett, L. J., 1999, Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde: *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 424, p. 83-95.
- [35] Meisner, P., and J. L. Gebicki, 2009, Determination of hydroperoxides in aqueous solutions containing surfactants by the ferrous oxidation-xylene orange method: *Acta Biochimica Polonica*, v. 56, p. 523-527.
- [36] Miyamoto, S., G. E. Ronsein, F. M. Prado, M. Uemi, T. C. Correa, I. N. Toma, A. Bertolucci, M. C. B. Oliveira, F. D. Motta, M. H. G. Medeiros, and P. Di Mascio, 2007, Biological hydroperoxides and singlet molecular oxygen generation: *Iubmb Life*, v. 59, p. 322-331.
- [37] Moldovan, L., and N. I. Moldovan, 2004, Oxygen free radicals and redox biology of organelles: *Histochemistry and Cell Biology*, v. 122, p. 395-412.
- [38] Morgenstern, D. E., M. A. C. Gifford, L. L. Li, C. M. Doerschuk, and M. C. Dinauer, 1997, Absence of respiratory burst in X-linked chronic granulomatous disease mice leads to abnormalities in both host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus*: *Journal of Experimental Medicine*, v. 185, p. 207-218.
- [39] Niki, E., Y. Yoshida, Y. Saito, and N. Noguchi, 2005, Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 338, p. 668-676.
- [40] Ohkawa, H., N. Ohishi, and K. Yagi, 1979, ASSAY FOR LIPID PEROXIDES IN ANIMAL-TISSUES BY THIOBARBITURIC ACID REACTION: *Analytical Biochemistry*, v. 95, p. 351-358.

- [41] Pilz, J., I. Meineke, and C. H. Gleiter, 2000, Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative: *Journal of Chromatography B*, v. 742, p. 315-325.
- [42] Pizzimenti, S., E. Ciamporcerro, M. Daga, P. Pettazzoni, A. Arcaro, G. Cetrangolo, R. Minelli, C. Dianzani, A. Lepore, F. Gentile, and G. Barrera, 2013, Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins: *Frontiers in Physiology*, v. 4.
- [43] Ray, P. D., B.-W. Huang, and Y. Tsuji, 2012, Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling: *Cellular Signalling*, v. 24, p. 981-990.
- [44] Repetto M., J. Semprine and A. Boveris, 2012, Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination, *Lipid Peroxidation*, Dr. Angel Catala (Ed.), ISBN: 978-953-51-0716-3, InTech, DOI: 10.5772/45943. Available from: <http://www.intechopen.com/books/lipid-peroxidation/lipid-peroxidation-chemical-mechanism-biological-implications-and-analytical-determination>
- [45] Ricciotti, E., and G. A. FitzGerald, 2011, Prostaglandins and Inflammation: *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, v. 31, p. 986-1000.
- [46] Roche, M., P. Rondeau, N. R. Singh, E. Tarnus, and E. Bourdon, 2008, The antioxidant properties of serum albumin: *Febs Letters*, v. 582, p. 1783-1787.
- [47] Sharma, J. N., and L. A. Mohammed, 2006, The role of leukotrienes in the pathophysiology of inflammatory disorders: Is there a case for revisiting leukotrienes as therapeutic targets?: *Inflammopharmacology*, v. 14, p. 10-16.
- [48] Sharma, R. A., A. Gescher, J. P. Plataras, C. Leuratti, R. Singh, B. Gallacher-Horley, E. Offord, L. J. Marnett, W. P. Steward, and S. M. Plummer, 2001, Cyclooxygenase-2, malondialdehyde and pyrimidopurinone adducts of deoxyguanosine in human colon cells: *Carcinogenesis*, v. 22, p. 1557-1560.
- [49] Schneider, C., D. A. Pratt, N. A. Porter, and A. R. Brash, 2007, Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis: *Chemistry & Biology*, v. 14, p. 473-488.

- [50] Simpson, J. A., S. Narita, S. Gieseg, S. Gebicki, J. M. Gebicki, and R. T. Dean, 1992, LONG-LIVED REACTIVE SPECIES ON FREE-RADICAL-DAMAGED PROTEINS: *Biochemical Journal*, v. 282, p. 621-624.
- [51] Spickett, C. M., 2013, The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: Advances in chemistry and analysis: *Redox Biology*, v. 1, p. 145-152.
- [52] Steinbeck, M. J., A. U. Khan, and M. J. Karnovsky, 1992, INTRACELLULAR SINGLET OXYGEN GENERATION BY PHAGOCYTOSING NEUTROPHILS IN RESPONSE TO PARTICLES COATED WITH A CHEMICAL TRAP: *Journal of Biological Chemistry*, v. 267, p. 13425-13433.
- [53] Termini, J., 2000, Hydroperoxide-induced DNA damage and mutations: *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 450, p. 107-124.
- [54] Ursini, F., and A. Bindoli, 1987, THE ROLE OF SELENIUM PEROXIDASES IN THE PROTECTION AGAINST OXIDATIVE DAMAGE OF MEMBRANES: *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 44, p. 255-276.
- [55] Vinogradov, A. D., and V. G. Grivennikova, 2005, Generation of superoxide-radical by the NADH : Ubiquinone oxidoreductase of heart mitochondria: *Biochemistry-Moscow*, v. 70, p. 120-127.
- [56] Wagner, J. R., C. Decarroz, M. Berger, and J. Cadet, 1999, Hydroxyl-radical-induced decomposition of 2'-deoxycytidine in aerated aqueous solutions: *Journal of the American Chemical Society*, v. 121, p. 4101-4110.
- [57] Wang, X., X. G. Lei, and J. Wang, 2014, Malondialdehyde regulates glucose-stimulated insulin secretion in murine islets via TCF7L2-dependent Wnt signaling pathway: *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 382, p. 8-16.
- [58] Warnke, M. M., E. Wanigasekara, S. S. Singhal, J. Singhal, S. Awasthi, and D. W. Armstrong, 2008, The determination of glutathione-4-hydroxynonenal (GSHNE), E-4-hydroxynonenal (HNE), and E-1-hydroxynon-2-en-4-one (HNO) in mouse liver tissue by LC-ESI-MS: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 392, p. 1325-1333.
- [59] Winterbourn, C. C., 1995, Toxicity of iron and hydrogen peroxide: The Fenton reaction: *Toxicology Letters*, v. 82-3, p. 969-974.

- [60] Yin, H. Y., and N. A. Porter, 2005, New insights regarding the autoxidation of polyunsaturated fatty acids: *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 7, p. 170-184.
- [61] Yin, H., L. Xu, and N. A. Porter, 2011, Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis: *Chemical Reviews*, v. 111, p. 5944-5972.