

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOFYZIKY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Tvorba reaktivních forem kyslíku v nádorových buňkách



Vypracoval: Filip Černý

Studijní obor: Molekulární biofyzika

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

Olomouc 2020

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Filip Černý
Název práce:	Tvorba reaktivních forem kyslíku v nádorových buňkách
Typ práce:	Experimentální
Pracoviště:	Katedra biofyziky
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Pavel Pospíšil, Ph.D.
Rok obhajoby:	2020
Abstrakt:	<p>Tato práce se zabývá reaktivními formami kyslíku. Nadměrná tvorba reaktivních forem kyslíku může být pro buňky nebezpečná, z tohoto důvodu je třeba studovat jejich mechanismus působení v buňce. Cílem této práce byla tvorba kyslíkových organických radikálů na buněčné kultuře U937 pomocí působení azo iniciátoru. K detekci kyslíkových organických radikálů byla použita elektronová paramagnetická rezonanční spektroskopie. Pomocí metody spinových pastí byl detekován komplex spinové pasti a alkoxylového radikálu, který pocházel z oxidace membránových proteinů. V diskuzi byly formulovány důvody, proč se jedná o alkoxylový radikál proteinového původu a také bylo navrženo možné navázání na tuto práci.</p>
Klíčová slova:	Reaktivní formy kyslíku, peroxylový radikál, alkoxylový radikál, oxidace proteinů, EPR spektroskopie, buněčná kultura U937
Počet stran:	38
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Bibliographical

identification

Author's first name and surname:	Filip Černý
Title of thesis:	Formation of reactive oxygen species in cancer cells
Type of thesis:	Experimental
Department:	Department of biophysics
Supervisor:	doc. RNDr. Pavel Pospíšil, Ph.D.
The year of defence:	2020
Abstract:	<p>The present thesis deals with reactive oxygen species. Excessive formation of reactive oxygen species can be dangerous for cells therefore it is necessary to study their mechanism of action in the cell. The aim of this study was the formation of oxygen-centred organic radical on the cell culture U937 by degradation of azo initiator. For the detection of oxygen-centred radical, electron paramagnetic resonance spectroscopy was used. Using a spin trapping method, a complex of spin trap and alkoxy radical, which originated from the oxidation of membrane proteins, was detected. In the discussion section, it is explained why this is case of alkoxy radical of protein origin. The section also contains suggestions for further research.</p>
Key words:	Reactive oxygen species, peroxy radical, alkoxy radical, protein oxidation, EPR spectroscopy, cell culture U937
Number of pages:	38
Number of attachments:	0
Language:	Czech

Rád bych poděkoval vedoucímu bakalářské práce doc. RNDr. Pavlu Pospíšilovi, Ph.D za odborné vedení, rady a věcné připomínky jak při práci v laboratoři, tak při psaní této bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Ursule Ferretti, Ankushi Prasadovi, M.Sc., Ph.D. a Mgr. Marku Rácovi, Ph.D. za pomoc a rady při práci v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat rodině a přátelům za jejich podporu.

Bakalářská práce byla řešena za podpory grantu č. IGA_PrF_2020_028 s názvem "Inovativní a moderní přístupy v obecné a molekulární biofyzice".

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením doc. RNDr. Pavla Pospíšila, Ph.D a za použití literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Přehled problematiky	2
2.1. Reaktivní formy kyslíku	2
2.1.1. Vlastnosti reaktivních forem kyslíku	3
2.1.1.1. Molekulární kyslík	3
2.1.1.3. Superoxidový aniontový radikál	3
2.1.1.4. Peroxid vodíku	5
2.1.1.5. Hydroxylový radikál	5
2.1.1.6. Peroxylový radikál a alkoxylový radikál	6
2.1.1.7. Singletní kyslík	7
2.1.2. Antioxidanty	8
2.2. Azo iniciátory	9
2.2.1. Vlastnosti azo iniciátorů AAPH a AMVN	9
2.3. Lipidová peroxidace	12
2.3.1. Průběh lipidové peroxidace volným radikálem	12
2.3.1.1. Iniclace	13
2.3.1.2. Propagace	13
2.3.1.3. Terminace	13
2.3.2. Produkty lipidové peroxidace	14
2.3.2.1. Primární produkty	14
2.3.2.2. Sekundární produkty	14
2.4. Proteinová oxidace	15
2.4.1. Proteinová oxidace volnými radikály	15
2.4.2. Produkty oxidace proteinů	16
2.5. Primární cíl při oxidaci makromolekul v biologických systémech	17
2.6. EPR spektroskopie	18
2.6.1. Použití spinových pastí pro detekci volných radikálů	18
2.6.2. 5,5-dimethylpyrolin- <i>N</i> -oxid (DMPO)	19

3. Cíl práce	21
4. Materiál a metody	22
4.1. Buněčná kultura U937	22
4.2. EPR měření.....	22
4.3. Použité chemikálie.....	23
4.4. Použitý software pro zpracování dat	24
5. Výsledky	25
5.1. Vliv AAPH a DMPO na životaschopnost buněčné kultury U937 .	25
5.2. Závislost doby působení azo iniciátoru AAPH na velikosti EPR signálu DMPO-OR komplexu.....	26
5.3. Závislost doby působení spinové pasti DMPO na velikosti EPR signálu DMPO-OR komplexu.....	28
5.4. Vliv antioxidantů peroxylového radikálu na EPR signál DMPO-OR komplexu.....	29
6. Diskuze.....	33
7. Závěr	36
8. Seznam literatury	37

Seznam zkratek

τ	Doba života
4-POBN	α -(4-Pyridil-1-oxid)- <i>N-tert</i> -butylnitron
AAPH	2, 2'-azobis(2-amidinopopan) dihydrochlorid
AIPH	2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propan] dihydrochlorid
AMVN	2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitril)
BHT	Butylhydroxytoluen
Cys	Cystein
DEPMPO	5-diethoxyfosforyl-5-methyl-1-pyrolin- <i>N</i> -oxid
DMPO	5,5-dimethylpyrolin- <i>N</i> -oxid
DMPO-OL radikálu	Komplex spinové pasti DMPO a lipidového alkoxylového radikálu
DMPO-OOL radikálu	Komplex spinové pasti DMPO a lipidového peroxylového radikálu
DMPO-OP	Komplex spinové pasti DMPO a proteinového alkoxylového radikálu
DMPO-OOP	Komplex spinové pasti DMPO a proteinového peroxylového radikálu
DMPO-OR	Komplex spinové pasti DMPO a alkoxylového radikálu
DMPO-OOR	Komplex spinové pasti DMPO a peroxylového radikálu
DMSO	Dimethylsulfoxid
EMPO	5-ethoxykarboynl-5-methyl-1.pyrolin- <i>N</i> -oxid
EPR spektroskopie	Elektronová paramagnetická rezonanční spektroskopie
FBS	Fetální bovinní sérum
H	Atom vodíku
H ⁺	Vodíkový proton
HCl	Kyselina Chlorná
His	Histidin
HNE	4-hydroxy-2- <i>trans</i> -nonenal
HO•	Hydroxylový radikál
HO ₂ •	Hyrdoperoxylový radikál

H ₂ O ₂	Peroxid vodíku
L•	Lipidový alkylový radikál
L=O	Lipidový karbonyl
LO•	Lipidový peroxylový radikál
LOH	Lipidový hydroxid
LOO•	Lipidový peroxylový radikál
LOOH	Lipidový hydroperoxid
Lys	Lysin
Met	Methionin
MDA	Malondialdehyd
NADPH	Nikotinamidadeninukleotidfosfát
¹ O ₂	Singletní kyslík
O ₂	Molekulární kyslík
O ₃	Ozon
O ₂ • ⁻	Superoxidový aniontový radikál
P•	Proteinový alkylový radikál
P=O	Proteinový karbonyl
PBN	<i>α</i> -fenyl- <i>tert</i> butylnitron
PBS	Fosfátový pufr
Phe	Fenylalanin
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetát
PO•	Proteinový alkoxylový radikál
POH	Proteinový hydroxid
POO•	Proteinový peroxylový radikál
POOH	Proteinový hydroperoxid
R•	Organický radikál s nepárovým elektronem na atomu uhlíku
R=O	Organický karbonyl
RNS species)	Reaktivní formy dusíku (z anglického Reactive nitrogen species)
RO•	Alkoxylový radikál
ROH	Organický hydroxid

ROO•	Peroxylový radikál
ROOH	Organický hydroperoxid
ROOOOR	Tetraoxid
ROS species)	Reaktivní formy kyslíku (z anglického Reactive oxygen
SOD	Superoxid dismutáza
SOO	Superoxid oxidáza
SOR	Superoxid reduktáza
Trp	Tryptofan
Tyr	Tyrosin

1. Úvod

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou hojně studovanou tématikou. ROS je možné rozdělit na radikály, což jsou molekuly obsahující jeden nepárový elektron, a neradikály, které neobsahují nepárový elektron. Vznikají jako meziprodukty metabolických procesů v buňkách a jejich nadměrná tvorba vede k poškození biomakromolekul, které může způsobit řadu nemocí. Pochopením mechanismů působení ROS na biomakromolekuly by bylo možné jim předcházet.

Oxidací biomakromolekul (proteinů, lipidů a DNA) vznikají organické radikály, které mohou napadat další biomakromolekuly a dochází ke vzniku řetězové reakce. Buňka pomocí antioxidantů dokáže regulovat množství vzniklých radikálů. Dojde-li ke vzniku velkého množství radikálů, které antioxidační systém nezvládne regulovat, dochází k poškození biomakromolekul.

Velmi využívanou metodou pro detekci volných radikálů je elektronová paramagnetická rezonanční (EPR) spektroskopie kombinovaná s metodou spinových pastí. Metoda je založena na vychytávání volných radikálů a vytvoření komplexu spinové pasti a radikálu, který je následně detekován.

Tato bakalářská práce se zabývá detekcí kyslíkových organických radikálů tvořených pomocí azo iniciátoru v nádorových buňkách U937 pomocí EPR spektroskopie. Práce je rozdělena na teoretickou část, ve které je přiblíženo téma reaktivních forem kyslíku, detekce volných radikálů a oxidace biomakromolekul, na metodickou část, ve které je popsána použitá metodika, následně jsou zde prezentovány naměřené výsledky a v poslední části jsou naměřené výsledky diskutovány a porovnány s odbornou literaturou.

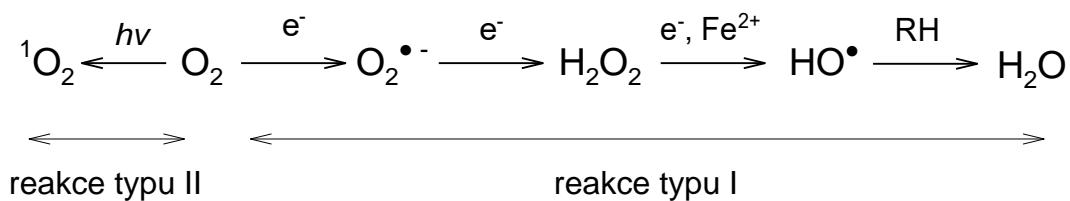
2. Přehled problematiky

2.1. Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku (ROS, z anglického Reactive Oxygen Species) jsou molekuly, které obsahují jeden, dva nebo více atomů kyslíku. Jsou tvořeny jako meziprodukty metabolických procesů uvnitř buněk při buněčném dýchání v mitochondriích, fotosyntéze v chloroplastech, oxidačním vzplanutí na plazmatické membráně, při štěpení mastných kyselin v peroxizomech nebo při skládání proteinů v endoplasmatickém retikulu.

Reaktivní formy kyslíku můžeme rozdělit do dvou skupin, radikálové a neradikálové. Radikál je možné definovat jako molekulu, která obsahuje jeden nebo více nepárových elektronů (Halliwell a Gutteridge 2007). Mezi radikálové formy patří superoxidový aniontový radikál ($O_2^{\bullet-}$), hydroxylový radikál (HO^{\bullet}), peroxylový radikál (ROO^{\bullet}) a alkoxylový radikál (RO^{\bullet}). Jednou z jejich vlastností je krátká doba života, řádově $\mu s - ns$. Mezi neradikálové formy se řadí peroxid vodíku (H_2O_2), kyselina chlorná ($HClO$), ozon (O_3) a singletní kyslík (1O_2).

Existují dva způsoby vzniku tvorby ROS (Obr. č. 1), a to pomocí přenosu excitační energie, tzv. reakce typu II, nebo pomocí přenosu elektronu, reakce typu I. Obě varianty vycházejí ze základního, tripletního stavu molekulárního kyslíku (O_2). Při reakci typu I, je O_2 redukován elektronem a vzniká $O_2^{\bullet-}$. Superoxidový aniontový radikál poté přijímá elektron a proton vodíku (H^+) a tvoří se H_2O_2 . Peroxid vodíku je následně redukován kationtem kovu (nejčastěji Fe^{2+} , Cu^+ nebo Mn^{2+}) za vzniku HO^{\bullet} , který reaguje s biomakromolekulou (např. lipidem, sacharidem, proteinem nebo DNA) a vzniká voda a organický uhlíkový radikál (R^{\bullet}) s nepárovým elektronem na atomu uhlíku. Při reakci typu II dochází k přenosu excitační energie, vzniká 1O_2 , a to tak, že O_2 v základním tripletním stavu přijme energii a excituje se do vyššího excitovaného, singletního, stavu.



Obr. č. 1: Obecné schéma tvorby ROS reakcí typu I a typu II.

2.1.1. Vlastnosti reaktivních forem kyslíku

2.1.1.1. Molekulární kyslík

Molekulární kyslík není přímým zástupcem ROS, ale protože z něj vznikají všechny ROS, je potřeba znát některé jeho vlastnosti. Jako jeden z mála prvků má O_2 tripletní stav jako základní. Jedná se o stav, při kterém jsou obsazeny oba nevázané π molekulové orbitály elektrony se stejným spinovým kvantovým číslem neboli mají paralelní spin (Halliwell a Gutteridge 2007). Z tohoto důvodu by bylo možné jej nazvat diradikálem, jelikož obsahuje dva nepárové elektrony. Molekulární kyslík se chová jako oxidační činidlo, avšak kvůli redoxnímu potenciálu a spinovému omezení daného Pauliho vylučovacím principem je málo reaktivní.

2.1.1.3. Superoxidový aniontový radikál

Superoxidový aniontový radikál je první reaktivní forma, která vzniká přenosem elektronu na O_2 . Tento radikál se může vyskytovat ve dvou formách, neprotonované a protonované, tzv. hydroperoxylový radikál (HO_2^\bullet). To, v jaké formě se bude vyskytovat, závisí na pH prostředí, přičemž v kyselém prostředí převažuje HO_2^\bullet a v zásaditém prostředí $\text{O}_2^{\bullet-}$. Rovnováha mezi oběma stavy nastává při $\text{pH} = 4,8$ (Halliwell a Gutteridge 2007) a jejich poměr se mění stokrát při změně pH o jedna.

Velmi rozšířenou možností tvorby $\text{O}_2^{\bullet-}$ v laboratořích je enzymatická cesta, při které se použije systém xanthin/xanthin oxidasa a dochází k tvorbě $\text{O}_2^{\bullet-}$, kyseliny močové a H^+ . Další možností, jak v laboratoři vytvořit $\text{O}_2^{\bullet-}$, je působením γ -zářením nebo

UV zářením na vodu, ze které následně vznikne HO^\bullet , H^+ a elektron. Tento elektron redukuje molekulární kyslík za vzniku $\text{O}_2^{\bullet-}$. Mimo jiné lze tvořit $\text{O}_2^{\bullet-}$ elektrochemicky, kdy dochází k oxidaci DMSO nebo acetonitrilu.

V biologických systémech vzniká $\text{O}_2^{\bullet-}$ nejčastěji na membránách mitochondrií, chloroplastů nebo samotné plazmatické membráně. V mitochondriích proces probíhá následujícím způsobem. Na komplexu I dochází oxidací NADPH, uvolní se elektron, který může redukovat O_2 na $\text{O}_2^{\bullet-}$ nebo být transportován pomocí komplexu II a ubichinonu na komplex III (Koolman a Röhm 2012), kde redukuje O_2 na $\text{O}_2^{\bullet-}$. Většina takto vytvořeného $\text{O}_2^{\bullet-}$ difunduje do matrix, část $\text{O}_2^{\bullet-}$ vytvořeného na komplexu III putuje do mezimembránového prostoru. Superoxidový aniontový radikál je dále pomocí superoxid dismutasy (SOD) redukován na H_2O_2 a ten je následně pomocí glutathion peroxidasy redukován na vodu (Pandey a Rizvi 2010).

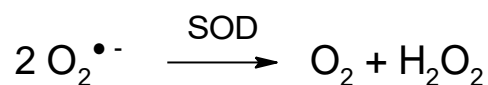
V chloroplastech je tvorba podobná, zde vše probíhá na tylakoidních membránách. Ve fotosystému II dochází ke štěpení vody na O_2 , H^+ a elektrony. Tyto elektrony jsou transportovány feofytinem na plastochinon. Poté elektron dále putuje thylakoidní membránou přes cytochrom b až do fotosystému I, ve kterém může opět dojít k redukcí O_2 a vzniku $\text{O}_2^{\bullet-}$. Z takto vzniklého $\text{O}_2^{\bullet-}$ se vytváří H_2O_2 .

Poslední možnost tvorby $\text{O}_2^{\bullet-}$ v biologických systémech je na plazmatické membráně buněk. Plazmatická membrána slouží mimo jiné i k transportu elektronů, při kterém je NADPH oxidováno pomocí NADPH oxidázy a volný elektron putuje přes membránu. Tento systém poté může být zdrojem elektronů pro vznik $\text{O}_2^{\bullet-}$.

Superoxidový aniontový radikál má bazické vlastnosti, proto v kyselém prostředí váže H^+ a vzniká protonovaná forma HO_2^\bullet . Superoxidový aniontový radikál se může chovat jako oxidační i redukční činidlo, kdežto jeho protonovaná forma HO_2^\bullet má pouze oxidační účinky. Kvůli zápornému náboji $\text{O}_2^{\bullet-}$ špatně prochází přes membrány, proto se nedokáže šířit na velké vzdálenosti. O tom také vypovídá jeho krátká doba života, která se udává v řádech μs (Schmitt a kol. 2014).

2.1.1.4. Peroxid vodíku

Peroxid vodíku patří mezi neradikálové formy a vzniká redukcí $O_2^{\bullet-}$. V biologických systémech se tak stává při dismutaci $O_2^{\bullet-}$. Dismutace je chemická reakce dvou stejných látek za vzniku dvou různých látek, většinou je jeden reaktant oxidován a druhý redukován. Dismutace $O_2^{\bullet-}$ může nastat dvěma typy – enzymaticky a neenzymaticky. U enzymatické cesty je jedna molekula $O_2^{\bullet-}$ katalyzována pomocí superoxid oxidasy (SOO) za vzniku O_2 a druhá molekula je redukována superoxid reduktasou (SOR) a vzniká H_2O_2 . Souhrnně se tyto katalyzátory označují jako superoxid dismutasy (SOD). Nejčastěji vyskytujícími se SOD jsou Cu-Zn SOD, Mn SOD a Fe SOD. Neenzymatická cesta neboli spontánní dismutace, je závislá na okolím pH a formě výskytu $O_2^{\bullet-}$. Protonovaná forma, která převládá při nízkém pH, jednodušeji dismutuje, a to z toho důvodu, že nenesení žádný náboj a nedochází zde k elektronové restrikci. Naopak $O_2^{\bullet-}$ kvůli zápornému náboji dismutuje velmi obtížně, protože obě molekuly se vlivem náboje odpuzují.



Obr. č. 2: Dismutace $O_2^{\bullet-}$.

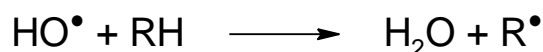
Kvůli jeho slabé schopnosti odštěpit H^+ patří H_2O_2 mezi slabé kyseliny. Peroxid vodíku je jak oxidační, tak redukční činidlo, ovšem jeho oxidačně-redoxní schopnosti jsou velmi nízké. Obecně se H_2O_2 vyznačuje nízkou reaktivitou. Peroxid vodíku se dokáže šířit na větší vzdálenosti než např. $O_2^{\bullet-}$, a protože nenesení žádný elektrický náboj, dokáže procházet přes membrány. Proto je jeho doba života větší, než mají ostatní ROS, a to v řádech ms – s.

2.1.1.5. Hydroxylový radikál

Poslední anorganický zástupce v reakčním schématu je HO^{\bullet} . Hydroxylový radikál je označován jako nejreaktivnější radikál vůbec (Schmitt a kol. 2014).

V laboratoři je možné vytvořit HO• pomocí homolytického štěpení vody UV zářením. Nejčastěji však HO• vzniká redukcí H₂O₂ kovovým iontem, tento proces se nazývá Fentonova reakce (Halliwell a Gutteridge 2007). Ve Fentonově reakci se nejčastěji používá dvojmocné železo, jednomocná měď nebo dvojmocný zinek. Další možností přípravy HO• v laboratoři je Haber-Weisova reakce, která je rozdělena do dvou kroků. První krokem je redukce železitého kationtu pomocí O₂•⁻. Následně tento železnatý kation redukuje H₂O₂, druhým krokem je tedy Fentonova reakce. V biologických systémech také dochází ke vzniku HO• Haber-Weisovou reakcí, při které H₂O₂ může reagovat s volným kovovým iontem nebo s kovem vázaným v metaloproteinech.

Jak již bylo zmíněno, jedná se o velmi reaktivní radikál, proto ochotně reaguje s biomakromolekulami jako jsou lipidy, proteiny a DNA. Mezi jeho základní reakce patří odtržení vodíku z molekuly, při kterém vzniká voda a R• (Obr. č. 3), případně adice na biomakromolekulu.



Obr. č. 3: Schéma odtržení H z biomolekuly pomocí HO•.

2.1.1.6. Peroxylový radikál a alkoxylový radikál

Předchozí zástupci patřili mezi anorganické ROS, nyní se podíváme na organické radikály, které jsou analogem anorganických. V případě O₂•⁻ je jím ROO• a pro HO• se jedná o RO•.

Organická sloučenina je napadena volným radikálem, např. O₂•⁻ nebo častěji HO•, a vytvoří se R•. Tento organický radikál v přítomnosti O₂ přechází na ROO•, ze kterého reakcí s H⁺ vznikne organický hydroperoxid (ROOH). Organický hydroperoxid může reagovat s trojmocným železným kationtem Fe³⁺ a vzniká opět ROO•, nebo s dvojmocným železným kationtem Fe²⁺ za vzniku RO•. Tato dekompozice ROOH může být způsobena nejen ionty přechodných kovů, ale také zahřátím ROOH, který se následně rozpadá na RO• a HO• (Harmon a Boccardi 2016).

V laboratoři se pro přípravu ROO^\bullet a následně RO^\bullet používají azo iniciátory (podrobněji kapitola 2. Azo iniciátory). Azo iniciátor se působením tepla rozpadá na dvě molekuly R^\bullet , ty poté za přístupu kyslíku vytváří ROO^\bullet , který přechází až na RO^\bullet kaskádou reakcí, která je popsána výše. V biologických systémech dochází ke tvorbě ROO^\bullet za pomoci HO^\bullet , který reaguje s biomakromolekulou a vzniká R^\bullet . Tento proces je možné nazvat oxidace volným radikálem a více bude rozebrán v následujících kapitolách.

Oba zmíněné organické radikály mohou vytrhnout H^+ z jiné molekuly a tím vytvořit další R^\bullet , např. při lipidové peroxidaci nebo oxidaci proteinů. Hlavním produktem ROO^\bullet i RO^\bullet v biologických systémech je ROOH . Oba radikály se mohou podílet i na tvorbě $^1\text{O}_2$. Rekombinací ROO^\bullet vzniká tetraoxid (ROOOOR), který se rozpadá na karbonyl ($\text{R}=\text{O}$), organický hydroxid (ROH) a $^1\text{O}_2$. Tento proces, při kterém rekombinací ROO^\bullet vzniká $^1\text{O}_2$, se nazývá Russellův mechanismus (Miyamoto a kol. 2003).

2.1.1.7. Singletní kyslík

Singletní kyslík je jedinou reaktivní formou, která vzniká přenosem excitační energie. Může se nacházet ve dvou stavech. Jedním je ($^1\text{O}_2$ ($^1\Sigma_g^+$)), který má krátkou dobu života a relaxuje do nižšího excitovaného stavu, kterým je druhý stav singletního kyslíku ($^1\text{O}_2$ ($^1\Delta$)). Protože ($^1\text{O}_2$ ($^1\Delta$)) je stálejší, je obecně označován jako singletní kyslík ($^1\text{O}_2$).

Jednou z možností vzniku $^1\text{O}_2$ je fotosenzibilní reakce, kdy je daná fotosenzibilní látka ozářena světlem o určité vlnové délce. Fotosenzibilní látkou může být organické barvivo, např. bengálská červeň, methylenová modř, nebo také biomolekula, např. riboflavin (vitamin B12), chlorofyly nebo žlučový pigment bilirubin (Halliwell a Gutteridge 2007). Ozářená fotosenzibilní látka se excituje a z excitovaného stavu může dojít k přenosu excitační energie na okolní O_2 , ze kterého vznikne $^1\text{O}_2$, a fotosenzibilní látka se vrátí do svého základního energetického stavu. Další variantou vzniku $^1\text{O}_2$ je pomocí Russellova mechanismu, který je popsán výše. V laboratoři lze $^1\text{O}_2$ případně získat ze směsi H_2O_2 a chlornanu (ClO^-), např. sodného (NaClO).

Doba života $^1\text{O}_2$ závisí na skupenské fázi, ve které se nachází. Pokud se nachází v plynné fázi, jeho doba života se pohybuje řádově v desítkách minut. V případě, že se jedná o kapalnou fázi, jeho doba života závisí na typu rozpouštědla. U protického rozpouštědla se doba života pohybuje řádově v μs , pro aprotická rozpouštědla tato doba vzroste na ms – s. Například ve vodě je jeho doba života rovna $\tau = (3,3 \pm 0,5) \mu\text{s}$ (Nonell a Flors 2016).

2.1.2. Antioxidanty

Antioxidanty jsou látky, které udržují správnou rovnováhu množství ROS v biologických systémech a napomáhají tak minimalizaci poškození biomakromolekul, které ROS mohou způsobit. Antioxidanty se dělí do dvou skupiny, enzymatické a neenzymatické. Buňky se dokážou bránit před ROS pomocí enzymatických antioxidantů, mezi které patří mimo jiné SOD a peroxidasa (gluthation, askorbát, katalasa). Superoxid dismutasa reaguje se dvěma molekulami $\text{O}_2^{\bullet-}$, její princip je popsán výše v kapitole o peroxidu vodíku. Peroxidasy převádí H_2O_2 pomocí dvouelektronové redukce na H_2O nebo pomocí dvouelektronové oxidace na O_2 nebo např. ROOH na ROH (Nimse a Pal 2015). Mezi neenzymatické antioxidanty se obecně řadí flavonoidy, vitamíny (A, C, E) a karotenoidy. Často studované neenzymatické antioxidanty jsou α -tokoferol (vitamín A) a kyselina askorbová (vitamín C). Výše uvedené neenzymatické antioxidanty jsou přírodního původu, je ale možné využívat i syntetické neenzymatické antioxidanty, mezi které patří např. butylhydroxytoluen (BHT).

α -tokoferol je antioxidant dobře rozpustný v tucích a jeho hlavní antioxidační funkcí je přerušení propagace řetězové reakce při peroxidaci lipidů. α -tokoferol reaguje s ROO^{\bullet} za vzniku ROOH a α -tokoferylového radikálu (α -tokoferol- O^{\bullet}), který může reagovat různými způsoby. Jednou z možností je reakce s dalším radikálem a vytvoření neradikálového produktu, dále může napadat lipidy nebo může reagovat s dalšími antioxidanty jako je kyselina askorbová nebo ubichinol, které napomáhají regenerovat α -tokoferol (Niki 2014).

Uměle vytvořený antioxidant BHT dokáže odstranit určité ROS, kterými jsou $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} a ROO^{\bullet} (Lambert a kol. 1996). Tato práce se však zaměří pouze na reakci

s ROO•. BHT pracuje na podobném principu jako α -tokoferol. Zamezí propagaci řetězové reakce tak, že reaguje se dvěma molekulami ROO• za vzniku neradikálového komplexu BHT-OOR a ROOH. Tento proces je rozdělen do dvou kroků, během prvního kroku vzniká ROOH a BHT-O•, který reaguje s druhou molekulou a tvoří neradikálový komplex BHR-OOR (Lambert a kol. 1996).

2.2. Azo iniciátory

Jednou z variant, jak připravit organický radikál v laboratoři, je použití látek zvaných azo iniciátory. Jedná se o sloučeniny, které, jak název napovídá, obsahují azo skupinu (-N=N-). Při degradaci azo iniciátorů, např. zahříváním nebo ozáření UV světlem, dochází k jejich rozpadu za vzniku plynného dusíku N₂ a dvou R•. Pokud se v okolí vyskytuje O₂ reaguje s R• a vzniká ROO•, který dále přechází až na RO•. Naopak pokud se v reakční směsi nenachází O₂, je tvorba ROO• inhibována (Krainev a Bigelow 1996).

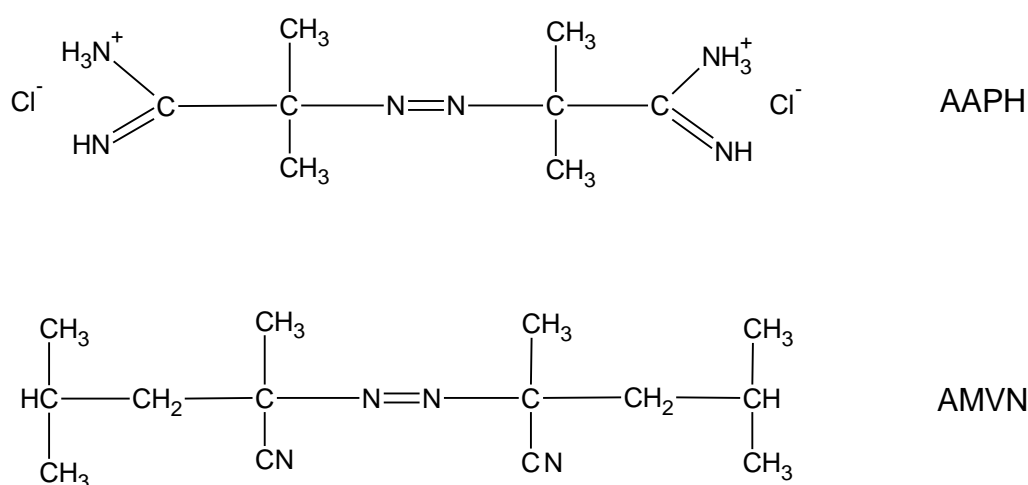
Azo iniciátory můžeme dělit pomocí jejich vlastností např. dle rozpustnosti, zdali je azo iniciátor rozpustný ve vodě nebo např. v tucích. Mezi ve vodě rozpustné azo iniciátory se řadí mimo jiné také 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihydrochlorid (AAPH) a 2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propan] dihydrochlorid (AIPH). Azo iniciátor rozpustný v tucích je 2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitril) (AMVN). Další důležitá vlastnost, která z části souvisí s rozpustností, je interakce s vodou, tedy jestli se jedná o hydrofilní nebo hydrofobní, resp. lipofilní azo iniciátor. Mezi hydrofilní patří výše zmíněný AAPH, naopak lipofilním chováním se vyznačuje AMVN.

2.2.1. Vlastnosti azo iniciátorů AAPH a AMVN

Mezi nejpoužívanější azo iniciátory patří AAPH a AMVN (Obr. č. 4). Velkou výhodou těchto dvou azo iniciátorů je konstantní a velká tvorba organických radikálů během prvních hodin dekompozice. Míru degradace je možné regulovat převážně teplotními podmínkami, z malé části potom rozpouštědlem a změnou pH prostředí. Například pro AAPH v neutrálním vodném roztoku se poločas rozpadu pohybuje okolo

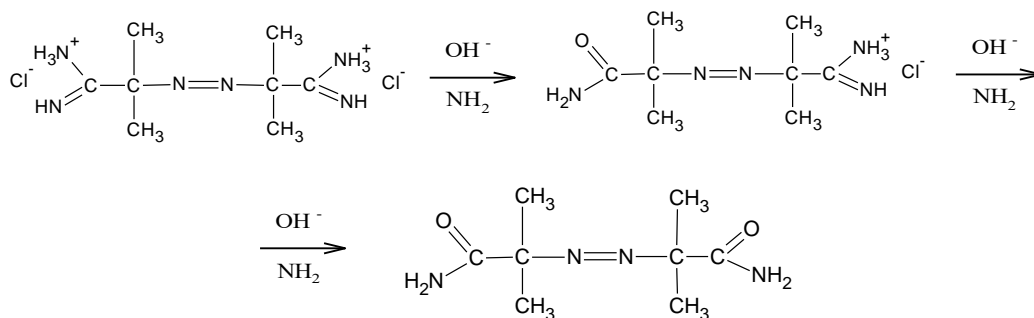
175 hodin (Niki 1990). Hydrofilní AAPH se hojně využívá ve vodních fázích biologických systémů, kde tvoří radikály. Naproti tomu AMVN, který je lipofilní, se používá pro tvorbu radikálu v oblastech obsahujících lipidy, např. v lipozomech nebo na lipidových membránách.

V této bakalářské práci byl použit azo iniciátor AAPH. Při jeho zahřívání dochází buď k degradaci, v případě, že se nachází v prostředí o kyselém pH, nebo k hydrolyze AAPH, pokud se jedná o prostředí zásadité. Reakční schéma hydrolyzy je znázorněné na obrázku č. 5.



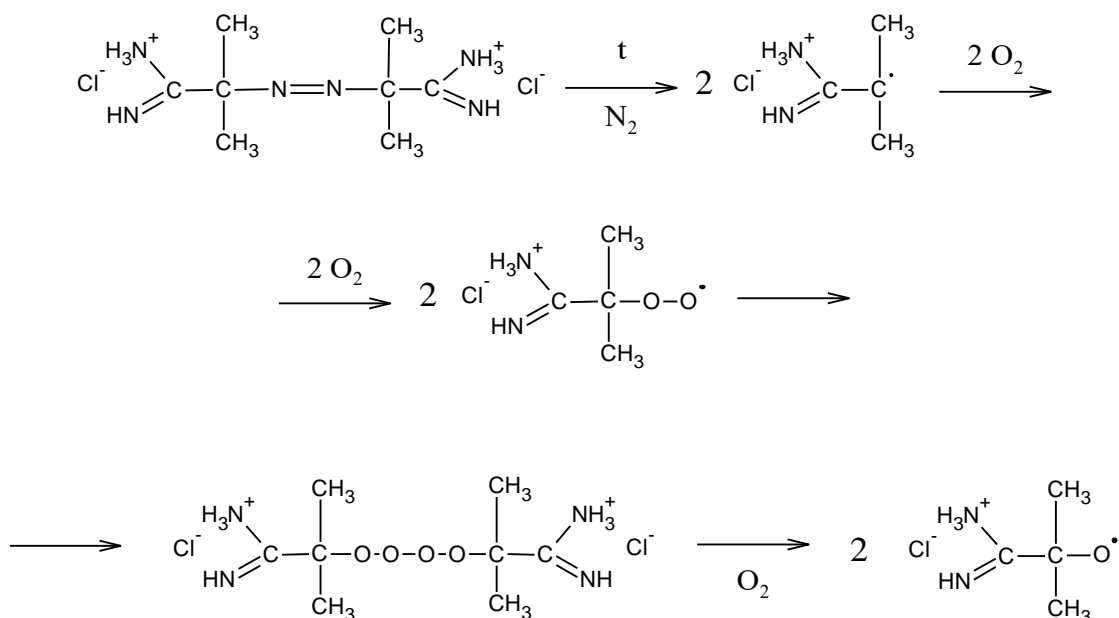
Obr. č. 4: Struktura 2,2'-azobis(2-amidinopropan) hydrochlorid (AAPH) a 2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitril) (AMVN).

Během hydrolyzy dochází k postupně k odštěpení 2 NH₃ skupin, které jsou nahrazeny kyslíkem a na NH skupiny se naváže H. Prvně při hydrolyze jedné NH₃ skupiny vzniká azo-2-carbamoyl-2,2'-amidinopropan hydrochlorid a poté při hydrolyze druhé NH₃ skupiny vzniká 2,2'-azobis(2-carbamoylpropan), který už nepodléhá tepelnému rozpadu jako AAPH (Werber a kol. 2011).



Obr. č. 5: Reakční schéma hydrolyzy AAPH, převzato a upraveno z (Werber a kol. 2011).

Při tepelné degradaci AAPH vzniká organický radikál R^\bullet , který v přítomnosti O_2 tvoří ROO^\bullet . Rekombinací dvou ROO^\bullet vzniká ROOOOR , který se rozpadne a uvolní O_2 a RO^\bullet (Ignold 1968). Reakční schéma termální degradace je znázorněné na obrázku č. 6. Ve své studii Krainev a Bigelow (1996) zjistili, že dominantním radikálem, který se tvoří při tepelné degradaci azo iniciátoru AAPH, je RO^\bullet .



Obr. č. 6: Reakční schéma tepelné degradace AAPH, převzato a upraveno z (Werber a kol. 2011).

Tepelná degradace lipofilního azo iniciátoru AMVN je velmi podobná tepelné degradaci AAPH. Při zahřívání AMVN dochází k jeho rozpadu na dva R^\bullet a molekulu dusíku N_2 . Pokud je ve směsi přístup k O_2 , R^\bullet se mění na ROO^\bullet , ze kterého se dále může vytvořit RO^\bullet . Při použití EPR spektroskopie a spinové pasti 5,5-dimethylpyrolin-N-oxid (DMPO) pro detekci radikálů vytvořených pomocí AAPH a AMVN bylo zjištěno následující. V případě degradace AAPH bylo detekováno pouze RO^\bullet , zatímco při degradaci AMVN byla detekována směs dvou radikálů, ROO^\bullet a RO^\bullet (Krajev a Bigelow 1996).

2.3. Lipidová peroxidace

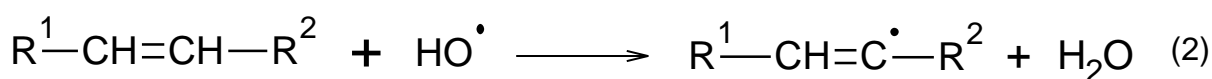
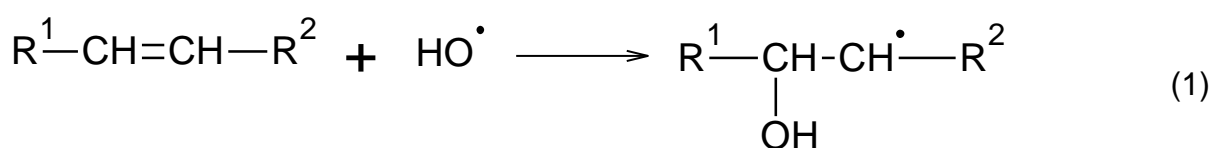
Lipidová peroxidace je oxidativní poškození lipidů, zejména buněčné membrány, která je tvořena fosfolipidovou dvojrůstvou. Tento proces lze rozdělit dle mechanismů na enzymatickou peroxidaci a peroxidaci pomocí ROS, kterou lze dále rozdělit na peroxidaci volnými radikály nebo pomocí 1O_2 . Peroxidace volnými radikály je více popsána níže. Při peroxidaci 1O_2 jsou oxidovány nenasycené lipidy s více dvojnými vazbami tzv. enovou reakcí a tvoří se hydroperoxy, ve kterých dochází k migraci dvojně vazby (Niki 2009). V případě enzymatické oxidace působí např. lipoxygenasa a cyklooxygenasa na kyselinu arachidonovou a vznikají, lipidové hydroperoxy (LOOH), hydroxy-mastné kyseliny, prostaglandiny, prostacykliny, thromboxany a leukotrieny (Niki 2009), což jsou signální látky patřící do skupiny sloučenin zvané eikosanoidy.

2.3.1. Průběh lipidové peroxidace volným radikálem

U lipidové peroxidace volným radikálem je iniciátorem např. HO^\bullet , ROO^\bullet nebo RO^\bullet a nejčastěji jsou napadány lipidy, které obsahují nenasycené mastné kyseliny s více dvojnými vazbami (např. arachidonová, linolová, linolenová a jiné). Právě místo dvojně vazby je v porovnání s jednoduchou vazbou náchylnější na reakci. Průběh lipidové peroxidace je možné rozdělit do tří fází: iniciace, propagace a terminace.

2.3.1.1. Iniclace

Jako iniciátor pro popis této řetězové reakce bude zvolen HO^\bullet , který bude působit na lipid v místě, kde má nenasycená mastná kyselina dvojnou vazbu. Zde jsou dvě možnosti, které mohou nastat (Obr. č. 7). U obou variant vzniká lipidový alkylový radikál (L^\bullet) s nepárovým elektronem na atomu uhlíku. První variantou je odtržení H z dvojné vazby řetězce mastné kyseliny (Halliwell a Gutteridge 2007), vzniká voda a L^\bullet . Druhá možnost je, že dojde k adici HO^\bullet k řetězci na jeden z uhlíků dvojné vazby a na druhém uhlíku bude nepárový elektron.



Obr. č. 7: Reakční schéma adice (1) a odtržení vodíku (2) při iniciaci lipidové peroxidace.

2.3.1.2. Propagace

Lipidový radikál v přítomnosti O_2 reaguje a vytváří lipidový peroxylový radikál (LOO^\bullet), který může odtrhnout H^+ z lipidů, tvořit další L^\bullet a mění se na LOOH . Lipidový hydroperoxid může vytvářet další LOO^\bullet a LO^\bullet , případně se rozpadat na sekundární produkty, kterými jsou lipidové karbonyly (L=O) a lipidové hydroxidy (LOH) (Guéraud a kol. 2010).

2.3.1.3. Terminace

Jednou z možností, jak může být tato řetězová reakce ukončena, je rekombinace dvou radikálů za vzniku neradikálu nebo sloučeniny, která nebude dále propagovat

lipidovou peroxidaci. Další variantou je reakce radikálů s molekulami antioxidantů. Mezi antioxidanty se řadí například kyselina askorbová (vitamín C), α -tokoferol (vitamín E) nebo glutathion peroxidasa.

2.3.2. Produkty lipidové peroxidace

2.3.2.1. Primární produkty

Během peroxidace lipidů dochází ke tvorbě lipidových radikálů, zejména LOO^\bullet a LO^\bullet . Tyto lipidové radikály jsou meziproduktem pro vznik LOOH, jež jsou označovány jako primární produkty lipidové peroxidace. Z LOOH mohou následně vznikat další radikály. Pokud dojde k oxidaci LOOH, vzniká LOO^\bullet , naopak pokud dochází k redukci LOOH, tvoří se LO^\bullet .

2.3.2.2. Sekundární produkty

Kromě LOOH vznikají při lipidové peroxidaci také sekundární produkty, mezi které se řadí L=O a LOH . Karbonylové sloučeniny jsou oproti hydroperoxidům stálejší, nedochází k jejich dekompozici. Zároveň jsou reaktivnější než LOOH, a navíc jsou toxické pro biologické systémy. Aldehydy, které se zde tvoří, jsou například formaldehyd, acetaldehyd, akrolein nebo malondialdehyd (MDA) (Shibamoto 2006). Poslední jmenovaný patří mezi často studované aldehydy v biologických systémech a jedná se o tzv. značku (biomarker) peroxidace ω -3 a ω -6 mastných kyselin. MDA vzniká z nenasycených mastných kyselin obsahujících alespoň dvě dvojně vazby (Guéraud a kol. 2010).

Dalším aldehydem, který vzniká při peroxidaci nenasycených vyšších mastných kyselin s více dvojnými vazbami, je 4-hydroxy-2-*trans*-nonenal (HNE). Jedná se o nenasycený aldehyd, který je reaktivnější a toxičtější než výše zmiňované MDA. Stejně jako MDA slouží jako marker peroxidace lipidů. Jeho efekt na biologické systémy *in vivo* můžeme rozdělit podle jeho koncentrace. Je-li koncentrace vyšší než 100 μM ,

je toxický pro všechny typy buněk. Způsobuje mitochondriální poškození až buněčnou smrt. Obecně se však takto vysoká koncentrace *in vivo* nevyskytuje. Při koncentraci mezi 2 μM a 20 μM inhibuje syntézu DNA a proteinů. Naopak podporuje syntézu fosfolipázy A₂, která hydrolyzuje lipidy. Koncentrace menší než 1 μM je normální hladina HNE ve zdravých tkáních (Halliwell a Gutteridge 2007).

2.4. Proteinová oxidace

Podobně jako lipidy i proteiny podléhají oxidativnímu poškození. Jelikož proteiny jsou specifické a je jich velké množství, studium oxidace proteinů je velmi rozsáhlé téma, obdobně jako studium peroxidace lipidů.

Mezi iniciátory proteinové oxidace řadíme ROS, případně reaktivní formy dusíku (RNS, z anglického Reactive nitrogen species). Při oxidaci proteinů dochází k modifikaci aminokyselin, nejčastěji však bazických (His, Lys), sirmých (Cys, Met) a aromatických (Tyr, Trp) (Afonso a Spickett 2019). Při modifikaci aminokyselinových zbytků dochází ke změně aktivity proteinů. Modifikace mohou být jak vratné, tak i nevratné. Reverzibilní modifikace chrání proteiny před nevratným poškozením a před další modifikací. Naopak při ireverzibilní modifikaci dochází ke ztrátě funkční aktivity a může vést až k degradaci proteinu (Dalle-Donne a kol. 2005). Dalším důsledkem oxidace proteinů je rozštěpení (fragmentace) proteinů, při němž dochází k rozdělení polypeptidového řetězce v peptidové vazbě, nebo síťování (crosslinking) proteinů, což je propojení dvou a více proteinů pomocí několika pevných, většinou kovalentních vazeb, které brání funkci proteinů. Rozštěpení a síťování proteinů mohou způsobit také sekundární produkty lipidové peroxidace, např. 4-HNE, MDA a akrolein (Gęgotek a Skrzydlewska 2019).

2.4.1. Proteinová oxidace volnými radikály

Volné radikály kyslíku i dusíku mohou reagovat s proteiny, peptidy a jejich aminokyselinami různými způsoby. Mohou způsobit například odtržení vodíku, adici, případně substituci. Působící radikály tak mohou atakovat různé postranní řetězce i peptidovou páteř, a proto může vznikat velké množství různých proteinových radikálů.

Volba místa, které bude oxidováno, také záleží na vlastnostech působícího radikálu. Pokud je radikál elektrofilního charakteru (např. HO[•]), tedy přijímá nepárový elektron, směřuje tento radikál do míst bohatých na elektrony. Jejich nejčastější reakcí je odtržení vodíku z C-H případně S-H vazby. Naopak nukleofilní radikály (např. fenylový radikál), které darují nepárový elektron, napadají místo s nedostatkem elektronů (Davies 2016).

U aromatických aminokyselin, jakými jsou Phe, Tyr, Trp a His, dochází převážně k adici volného radikálu, která je rychlejší než odtržení H, na aromatický kruh. Tato adice je následována řadou reakcí, při kterých se jako meziprodukty tvoří proteinové peroxylové radikály (POO[•]).

Působením ROS a RNS na thiolovou skupinu S-H aminokyselin v proteinu vzniká řada modifikací thiolové skupiny. Při oxidaci dochází ke vzniku kyseliny sulfenové (P-SOH) (Dalle-Donne a kol. 2005). Dále může dojít k odtržení vodíku z S-H vazby za vzniku thiolového radikálu RS[•]. Thiolové radikály mohou dále napomáhat k oxidaci proteinů, např. odtržením vodíku z C-H vazby za vzniku proteinového alkylového radikálu (P[•]). Odtržení vodíku z C-H vazby v proteinech může nastat i z α -uhlíku a ne jenom z postranních řetězců. Jestli dojde k odtržení atomu vodíku z α -uhlíku, záleží na sekundární a terciální struktuře proteinů a také na bočních řetězcích. Například u globulárních proteinů nebo struktuře skládaného listu bude odtržení H z α -uhlíku méně časté, než když jsou proteiny v rozbalené struktuře (Davies 2016).

Vzniklé P[•] mohou, pokud nemají přístup O₂, tvořit dimery nebo odtrhnout vodík ze slabé X-H vazby okolních makromolekul. Jestli je ale v okolí dostatek O₂, vzniká POO[•], který má několik možných reakcí. Hlavní reakcí je tvorba proteinových hydroperoxidů (POOH), další variantou je tzv. terminace, kdy se POO[•] potká s dalším radikálem a vznikne proteinový hydroxid (POH) a proteinový karbonyl (P=O). Může také nastat, že se dva POO[•] rekombinují a vytvoří proteinový tetraoxid (POOOOP), který se rozpadá na proteinový alkoxylový radikál (PO[•]). Proteinový alkoxylový radikál může z dalších okolních proteinů odtrhnout H⁺ a tvořit další P[•] a POH, nebo pomocí tzv. β -stříhu vytvořit P=O a P[•].

2.4.2. Produkty oxidace proteinů

Jak je zmíněno výše, POOH jsou hlavním produktem reakční řady P^\bullet . Oproti vzniklým radikálům jsou POOH stabilnější. To ovšem neznamená, že se jedná o finální produkt oxidace proteinů. Jednoelektronovou redukcí POOH dochází k tvorbě PO^\bullet , naopak jednoelektronovou oxidací POOH se tvoří POO^\bullet , které se mohou dále účastnit proteinové oxidace.

Sekundárním produktem, který může vzniknout z POOH, je POH, který se tvoří různými reakcemi. Jednou z možností tvorby POH je reakce POOH s enzymem, například s glutathion peroxidasou nebo peroxiredoxinem. Dále může POH vzniknout redukcí POOH pomocí antioxidantů, jako je glutathion nebo kyselina askorbová (vitamin C). Případně může POOH reagovat s cysteinovým nebo methioninovým zbytkem na proteinech (Davies 2016).

2.5. Primární cíl při oxidaci makromolekul v biologických systémech

V předchozích kapitolách je popsána lipidová peroxidace a proteinová oxidace. Je zřejmé, že pokud dojde k oxidaci ať už lipidů nebo proteinů a bude se tvořit velké množství reaktivních produktů oxidace, může dojít k řetězové reakci a oxidacím dalších biomakromolekul. Ty při nedostatku antioxidantních látek v těle mohou vést k onemocněním, např. ateroskleróze, různým druhům rakoviny nebo Alzheimerově chorobě.

Nyní se však objevuje otázka, která z biomakromolekul je primárním cílem radikálových ROS, zdali je to lipid, protein či DNA. Dlouhou dobu byly lipidy považovány za hlavní cíl ROS, protože řetězové reakce lipidové oxidace *in vitro* produkovaly velké množství produktů (Gebicky a kol. 2000). Tato domněnka byla vyvrácena jednou studií, ve které bylo dokázáno, že proteiny jsou prvním cílem radikálových ROS (Giese a kol. 2000). V této studii byla oxidace makromolekul v buněčné kultuře U937 iniciována pomocí azo iniciátoru AAPH. Výsledkem bylo zjištění, že dochází pouze k tvorbě POOH. Na tuto informaci navázala řada dalších studií, byla zkoumána například reakce HO^\bullet s krevním sérem, lipozomy, buněčnou kulturou Sp2/O-Ag14 (Gebicky a kol. 2000) nebo buněčnou kulturou U937 (Du a Gebicki 2004,

Rác a kol. 2015). V těchto studiích vědci sledovali tvorbu POOH nebo LOOH a došli ke stejnému závěru, že primárním cílem oxidace pomocí radikálových ROS jsou proteiny. Tomuto výsledku napomáhá i fakt, že buňky obsahují až 70 % proteinů. Navíc se ukázalo, že proteiny fungují jako obrana před ROS, aby nedošlo k poškození DNA nebo lipidových vrstev. Poškozené proteiny jsou degradovány a nahrazeny nově syntetizovanými. Pokud je ovšem tvorba produktů proteinové oxidace velká, antioxidační látky nezvládnou inaktivovat reaktivní produkty proteinové oxidace, může dojít k poškození dalších makromolekul jako sekundárních cílů ROS.

2.6. EPR spektroskopie

Elektronová paramagnetická rezonanční spektroskopie je metoda, která se používá pro studium látek s nepárovým elektronem, a je tedy vhodná pro detekci radikálových ROS. EPR spektroskopie je principiálně podobná nukleární magnetické rezonanční spektroskopii s tím rozdílem, že zde je oproti nukleonům v jádře excitován elektron. Tato metoda je založena na tzv. Zeemanově jevu, při kterém dochází k rozdělení energetických hladin pomocí vnějšího magnetického pole. Pokud je nepárový elektron se spinem $\frac{1}{2}$ vystaven vnějšímu magnetickému poli, může se orientovat paralelně nebo antiparalelně s magnetickým polem. Potom vytváří dvě možné energetické hladiny, které se liší podle intenzity magnetického pole. Pokud je elektron ozářen mikrovlnným elektromagnetickým zářením, dojde k přechodu z nižší energetické hladiny do vyšší, a to se projeví jako absorpce energie, která se projeví v absorpčním spektru. EPR spektrometry vykreslují spektra první derivace absorpčního spektra.

2.6.1. Použití spinových pastí pro detekci volných radikálů

Při měření volných radikálů se potýkáme s jedním velkým problémem, a tím je jejich doba života. V kapitole, kde jsme si popisovali různé zástupce ROS, jsme zjistili, že volné radikály mají velmi krátkou dobu života: nanosekundy, mikrosekundy nebo milisekundy. Pro odstranění tohoto problému se v EPR spektroskopii používají spinové pasti. Jejich princip je následující. Spinové pasti, které jsou samy o sobě diamagnetické a samotné je nelze detekovat, vycytávají nepárové elektrony volných radikálů a tvoří

s nimi komplexy. Tyto komplexy mají výrazně delší dobu života, než je doba života volných radikálů, a to minuty až desítky minut, v závislosti na volbě spin trapu a vlastnostech okolního prostředí (např. pH). Takto vytvořený komplex radikálu a spinové pasti se stává paramagnetickým a je poté detekován EPR spektrometrem.

Většina používaných spinových pastí obsahuje nitronovou funkční skupinu $R_1R_2C=NR_3^+O^-$. Ty se poté dělí na lineární a cyklické. Mezi lineární patří například velmi používaný α -fenyl-*tert*-butylnitron (PBN) nebo jeho derivát α -(4-Pyridil-1-oxid)-*N-tert*-butylnitron (4-POBN). Do cyklických se řadí například 5,5-dimethylpyrolin-*N*-oxid (DMPO),

5-diethoxyfosforyl-5-methyl-1-pyrolin-*N*-oxid (DEPMPO) nebo 5-ethoxykarbonyl-5-methyl-1-pyrolin-*N*-oxid (EMPO). DEPMPO a EMPO jsou deriváty DMPO, které byly syntetizovány pro zlepšení vlastností DMPO, jako je poločas rozpadu komplexu s $O_2^{\bullet-}$ nebo reaktivita k $O_2^{\bullet-}$ (Villamena 2017).

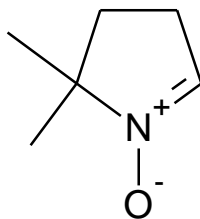
Výhoda metody spinových pastí je taková, že je velmi specifická. Ne každou spinovou past lze použít na všechny radikály. Navíc každá spinová past poskytuje specifické EPR spektrum s daným radikálem, které je popsáno štěpícími konstantami. Proto tato metoda dokáže prozradit nejen, že se v systému nachází volný radikál, ale také, o jaký radikál se jedná.

2.6.2. 5,5-dimethylpyrolin-*N*-oxid (DMPO)

Jedná se o jeden z nejdéle používaných cyklických spinových pastí (Obr. č. 8). Je hydrofilního charakteru a dobře rozpustný ve vodě. Je možné jej využít pro detekci $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} , ROO^{\bullet} i RO^{\bullet} . Ovšem jeho komplexy s $O_2^{\bullet-}$ jsou velmi nestabilní a mají krátkou dobu života, proto je lepší variantou pro detekci $O_2^{\bullet-}$ jeho derivát DEPMPO nebo EMPO. Naopak je velmi využíván pro detekci organických radikálů v biologických systémech, např. na buněčných kulturách, protože má oproti ostatním používaným spinovým pastím nízkou toxicitu (Haseloff a kol 1997).

Detekovaná spektra organických radikálů pomocí DMPO byla počátkem 80. let přisuzována komplexu DMPO s ROO^{\bullet} , a to díky podobnosti se spektrem komplexu DMPO s $O_2^{\bullet-}$. Tato hypotéza byla navíc potvrzena i podobnými hodnotami štěpících

konstant ROO^\bullet a RO^\bullet komplexů s DMPO. Dikalov a Mason (1999) studovali tvorbu komplexů organických radikálů s DMPO. Pomocí radikálů s nepárovým elektronem na nuklidu kyslíku ^{17}O zjistili, že detekované EPR spektrum není DMPO-OOR komplex, ale právě DMPO-OR komplex. Při použití nuklidu ^{17}O štěpící konstanty pro ROO^\bullet a RO^\bullet nebyly podobné, a tak spektrum přisoudili DMPO-OR komplexu. Dikalov a Mason (1999) tvrdí, že při pokojové teplotě dochází k tvorbě DMPO-OOR komplexu, který se ihned rozpadá na RO^\bullet . Ten vzápětí tvoří DMPO-OR komplex, který je detekován.



Obr. č. 8: Struktura spinové pasti 5,5-dimethylpyrolin-N-oxid DMPO.

3. Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je seznámit se s tematikou tvorby reaktivní forem kyslíku, především kyslíkových organických radikálů, metodikou EPR spektroskopie a naučit se pěstovat buněčnou kulturu U937. Následně pomocí EPR spektroskopie detekovat kyslíkové organické radikály v buněčné kultuře U937.

4. Materiál a metody

4.1. Buněčná kultura U937

V této bakalářské práci byla použita buněčná kultura U937. Jedná se o leukemické promonocyty, které jsou schopné se diferencovat na monocyty nebo makrofágy při inkubaci s phorbol 12-myristat 13-acetát (PMA) (Chanput a kol 2015). Tato buněčná kultura byla izolována z hystiocytického lymfomu 37 letého muže (Sundström a Nilsson 1976). Jedná se o velmi využívanou buněčnou kulturu, která napomohla k objasnění mechanismu diferenciaci makrofágů a monocytů.

Buněčná kultura U937 byla získána z Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Byla pěstována v médiu RPMI 1640 s 2 mM L-glutaminem, 10% roztokem fetálního bovinního séra (fetal bovine serum FBS) a 1% roztokem antibiotik (směs penicilin a streptomycin, 1:1), v inkubátoru při 37 °C a 5% CO₂ atmosférou. Test životaschopnosti buněčné kultury byl prováděn pomocí roztoku 0,4% trypanové modři, kdy poškozené buňky mají rozrušenou plazmatickou membránu, a tedy dochází k obarvení. Naopak u živých neporušených buněk k obarvení nedochází. Následně byl pomocí automatického čítače buněk Bio-Rad TC20 Automated Cell counter (Bio-Rad Laboratories, California, USA) určen celkový počet buněk, počet živých buněk a procentuální životaschopnosti buněčné kultury.

4.2. EPR měření

V laminárním boxu z kultivační láhve byl odebrán vzorek buněčné kultury U937, tak aby celková koncentrace buněk byla 3 mil. na 1 ml. Poté byla buněčná kultura třikrát promyta pomocí fosfátového pufru PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄), jenž měl pH 7,4. Během promývání byla buněčná kultura centrifugována pomocí stolní centrifugy Sprout mini centrifuge (Heathrow Scientific, Illinois, USA) při 6000 rpm a po dobu 5 minut. Nejprve byl vzorek smíchán s 50 mM AAPH a zahříván na teplotu 37 °C po dobu 2 hodin v Thermo-Shakeru Biosan TS-100 (Biosan Medical-Biological Research & Technologies, Riga, Litva). Po dvouhodinovém

zahřívání byl vzorek promyt PBS a poté byla přidán 50 mM DMPO. Reakční směs byla po přidání DMPO inkubována po určitou dobu v pokojové teplotě a následně byla nanesena do kapiláry a měřena pomocí EPR spektroskopu Magnettech MiniScope MS 400 (Magnettech GmbH, Berlín, Německo).

EPR spektrometr MiniScope MS 400 byl ovládán počítačem pomocí softwaru MiniScope control a parametry byly nastaveny následovně: střed magnetického pole 335,9698 mT; rozsah skenování 8,9506 mT; doba skenování 60 s; počet skenů 5; moduace 0,1 mT; zeslabení mikrovlnného záření 4,0 dB; zesílení 500. Všechna měření byla provedena nejméně třikrát.

4.3. Použité chemikálie

- α -Tocoferol – Sigma-Aldrich s.r.o., USA
- 2, 2'-azobis(2-amidinopopan) dihydrochloride (AAPH) – Sigma-Aldrich s.r.o., USA
- 5,5-dimethylpyrolin-*N*-oxid (DMPO) – DOJINDO Laboratories, Japan
- Antibiotika (Penicilin-Streptomycin) – Biosera, Francie
- Butylhydroxytoluen (BHT) – Sigma-Aldrich s.r.o., USA
- Fetální bovinní sérum (FBS) – Biosera, Francie
- Fosfátový pufr (PBS):
 - Chlorid sodný (NaCl) – Lach-Ner s.r.o., Česká republika
 - Chlorid draselný (KCl) – CHEMAPOL, Česká republika
 - Hydrogenfosforečnan sodný (Na_2HPO_4) – Lach-Ner s.r.o., Česká republika

- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4) – Lach-Ner s.r.o., Česká republika

- RPMI 1640 with Glutamin – Biosera, Francie

4.4. Použitý software pro zpracování dat

Z naměřených dat byla pomocí programu MultiPlot, který je součástí softwaru ke spektroskopu MiniScope MS 400, určena velikost píku daných spekter. Vždy se měřila velikost druhého píku ve spektru. Následně byla data statisticky zpracována v programu Microsoft Office Excel 365. Naměřená spektra a grafy byly vykresleny v programu Origin 9.0. Pro simulaci spekter byl použit program WINSIM, který je volně ke stažení z: <https://www.niehs.nih.gov/research/resources/software/tox-pharm/tools/index.cfm>.

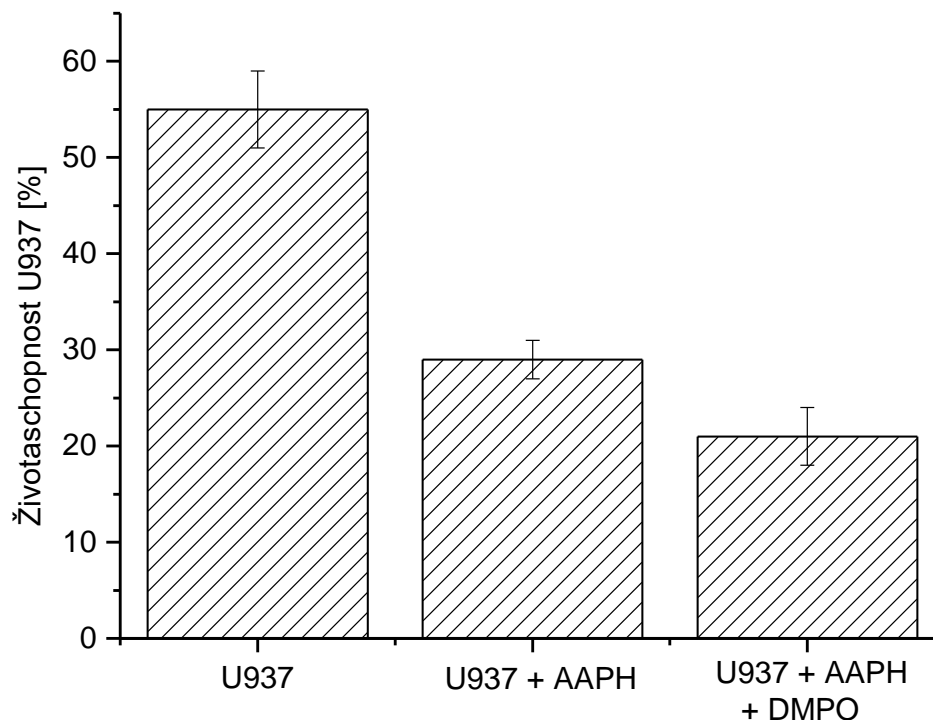
5. Výsledky

5.1. Vliv AAPH a DMPO na životaschopnost buněčné kultury U937

V případě použití buněčných kultur v experimentu je třeba zjistit, jak dané komponenty reakční směsi ovlivní životaschopnost buněčné kultury. V této bakalářské práci byla životaschopnost buněčné kultury U937 testována trypanovou modří. Jako kontrolní vzorek byla použita samotná buněčná kultura U937, u které byla zjištěna životaschopnost před začátkem měření (Obr. č. 9). Následně se určila životaschopnost ve vzorku, který byl zahříván po dobu dvou hodin s azo iniciátorem AAPH a promyt v PBS. Jako poslední hodnota zde vystupuje životaschopnost buněčné kultury U937 ve vzorku, který byl měřen 30 minut po přidání spinové pasti DMPO do vzorku.

Na obrázku č. 9 lze vidět, že dochází ke snížení životaschopnosti buněčné kultury U937 téměř na polovinu, z původních 55 % (Obr. č. 9) na 29 % (Obr. č. 9). Pokles životaschopnosti je způsoben azo iniciátorem AAPH, který tvoří organické radikály napadající integrální a periferní membránové proteiny. Právě na těchto biomakromolekulách dochází k oxidaci způsobenou organickými radikály, převážně ROO^\bullet a RO^\bullet . Přidání spinové pasti DMPO do reakční směsi způsobilo snížení životaschopnosti buněčné kultury U937 ve vzorku na 21 % (Obr. č. 9). Už se ale nejednalo o tak výrazný pokles jako v případě azo iniciátoru AAPH.

Samotný azo iniciátor AAPH vykazuje vysoký EPR signál DMPO-OR komplexu. Aby nedocházelo ke zkreslení EPR signálu a bylo zřejmé, že naměřený EPR signál DMPO-OR komplexu pochází z RO^\bullet tvořených oxidací membránových proteinů buněčné kultury U937, bylo třeba po ukončení zahřívání odstranit AAPH z reakční směsi. Z tohoto důvodu byla reakční směs pro následující měření vždy po zahřívání promyta pomocí pufru PBS. Až poté následovalo přidání DMPO do vzorku.



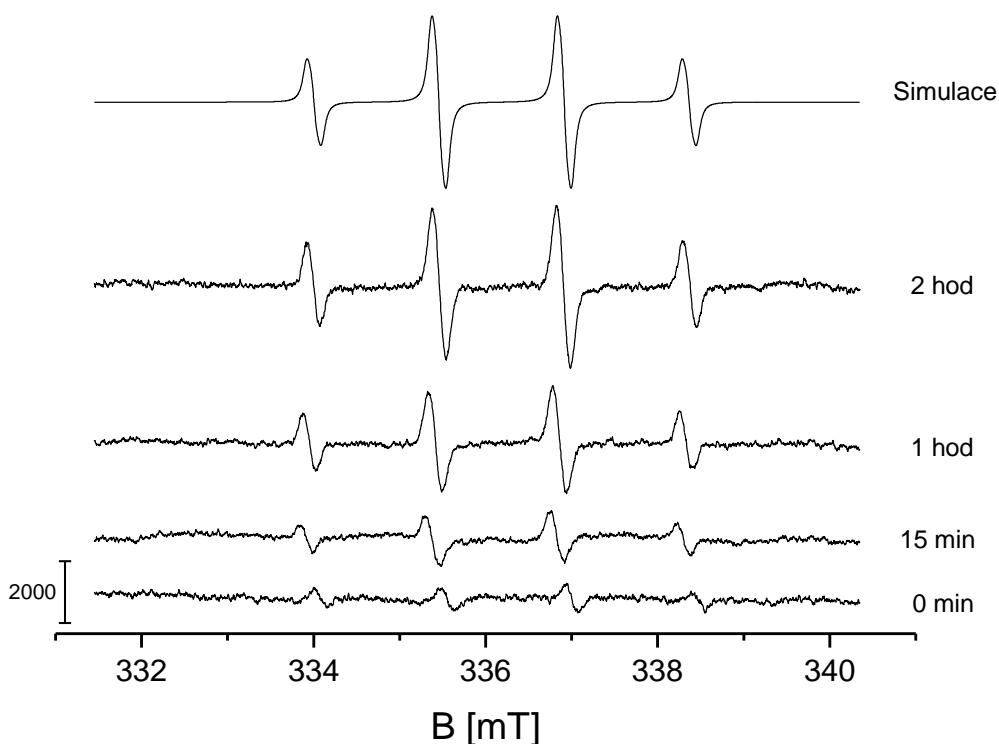
Obr. č. 9: Vliv AAPH a DMPO na životaschopnost buněčné kultury U937 v reakční směsi. Životaschopnost samotné buněčné kultury U937 byla brána jako kontrolní vzorek. Vzorek buněčné kultury U937 s 50 mM AAPH inkubován při 37 °C po dobu 2 hodin. Vzorek U937 + AAPH + DMPO znázorňuje životaschopnost buněčné kultury po dvouhodinové inkubaci buněčné kultury U937 s 50 mM AAPH při teplotě 37 °C a následném přidání 50 mM DMPO. Životaschopnost vzorku U937 + AAPH + DMPO byla měřena po 30 minutách od přidání DMPO.

5.2. Závislost doby působení azo iniciátoru AAPH na velikosti EPR signálu DMPO-OR komplexu

Pro určení vhodné doby, po kterou bude vzorek s azo iniciátorem AAPH zahříván a tedy doba, po kterou bude docházet k tepelné degradaci azo iniciátoru, bylo třeba proměřit vzorky s různou dobou zahřívání a sestavit z nich časovou závislost (Obr. č. 10). Reakční směs, která obsahovala AAPH a buněčnou kulturu U937, byla zahřívána

po určitou dobu. Ukázalo se, že ideální doba zahřívání vzorku, při které byl EPR signál DMPO-OR komplexu dostatečně velký, jsou 2 hodiny.

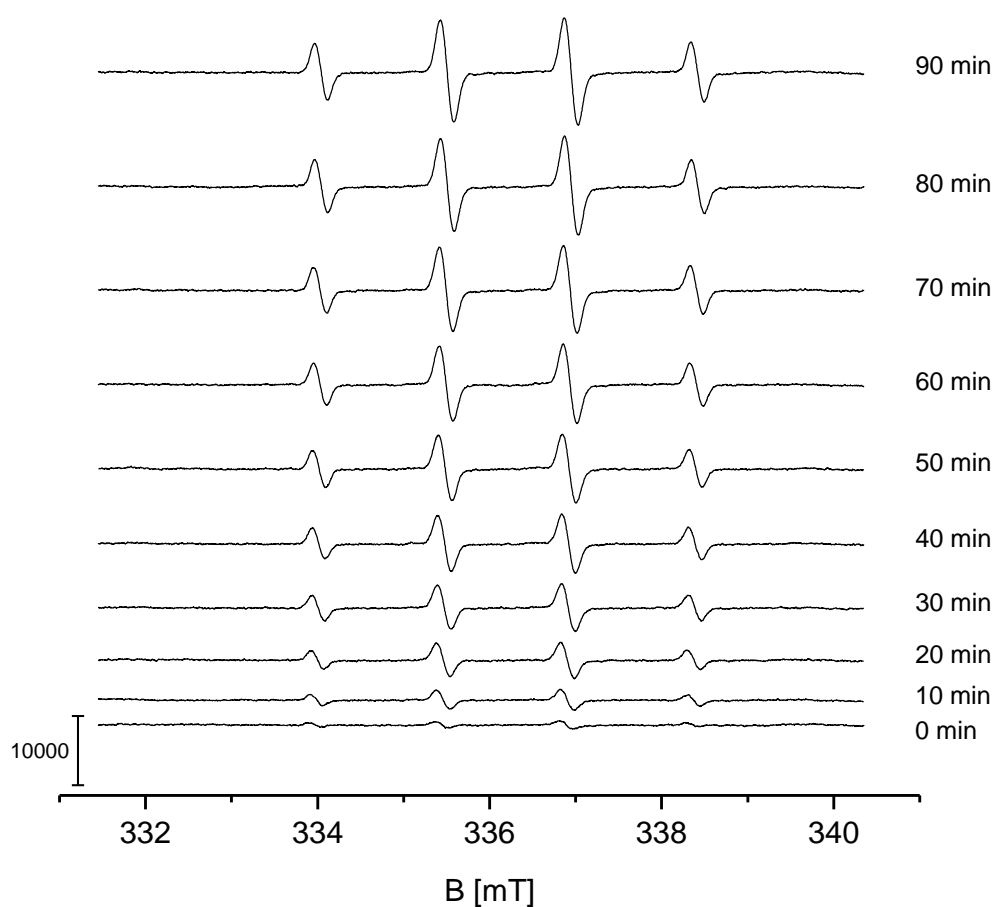
Na obrázku č. 10 je zobrazeno EPR spektrum DMPO-OR komplexu, které se skládá z kvartetu, který má dva centrální píky větší než píky krajní. Byla provedena simulace naměřeného spektra pomocí programu WINSIM. Simulace je znázorněna na obrázku č. 10.



Obr. č. 10: EPR spektra DMPO-OR komplexu v závislosti na délce inkubace vzorku při teplotě 37 °C. Vzorky obsahovaly 50 mM AAPH a buněčnou kulturu U937. Vzorek byl inkubován při teplotě 37 °C po dobu 0 a 15 minut, 1 a 2 hodin. Následně byl vzorek promyt v PBS a do reakční směsi byl přidán 50 mM DMPO. Vzorek byl ponechán v pokojové teplotě po dobu 20 minut a poté měřen. Simulace spektra byla provedena v programu WINSIM a byly použity tyto štěpící konstanty: $a^N = 14,65$ G, $^{\beta}a^H = 14,55$ G, $^{\gamma^1}a^H = 0,70$ G, $^{\gamma^2}a^H = 0,25$ G. Korelace simulovaného a naměřeného spektra je $R = 0,981$ dle programu WINSIN.

5.3. Závislost doby působení spinové pasti DMPO na velikosti EPR signálu DMPO-OR komplexu

Ideální doba zahřívání byla stanovena na 2 hodiny při teplotě 37 °C. Dále bylo třeba zjistit, po jakou dobu je vhodné nechat působit spinovou past DMPO. Po dvouhodinovém zahřívání byl vzorek promyt v PBS. Do reakční směsi byl přidán DMPO a měření probíhalo v různých časových intervalech od přidání DMPO (Obr. č. 11). Mezi měřeními byl vzorek uchovávan v pokojové teplotě.



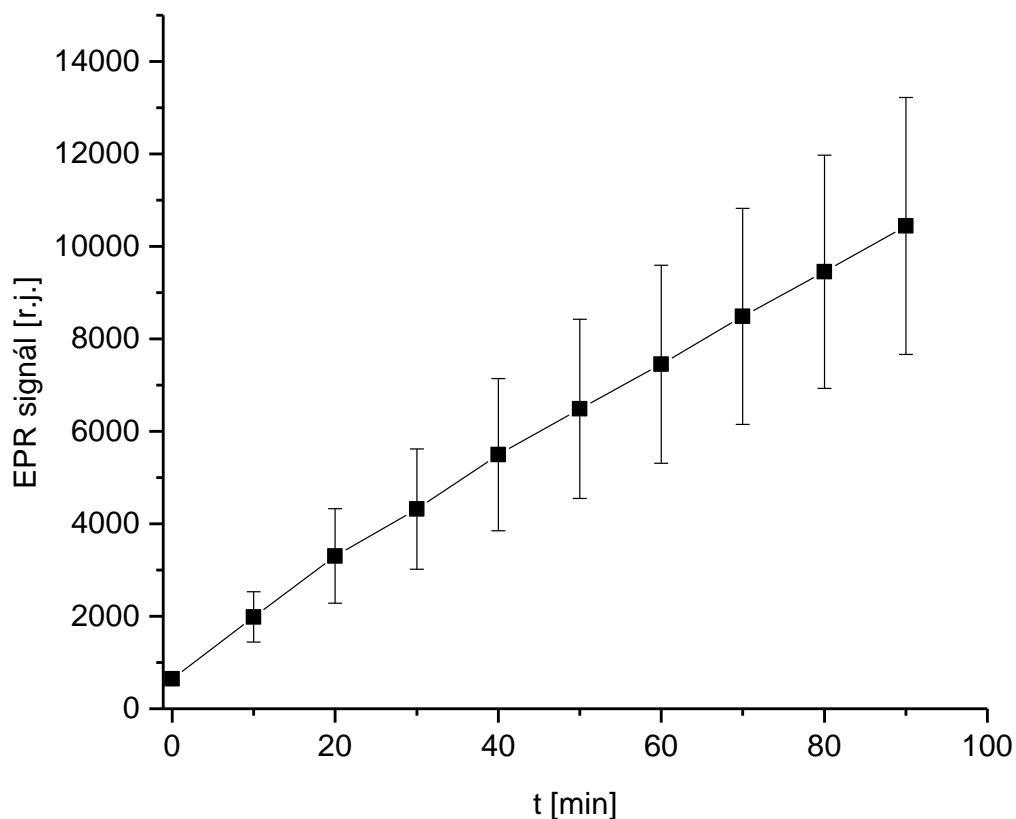
Obr. č. 11. EPR spektra DMPO-OR komplexu v závislosti na době působení spinové pasti DMPO na vzorek. Byl měřen vzorek, který obsahoval 50 mM AAPH a buněčnou kulturu U937. Vzorek byl inkubován při teplotě 37 °C po dobu 2 hodin. Následně byl promyt v PBS a do reakční směsi byl přidán 50 mM DMPO. Vzorek byl poté měřen v 0. až 90. minutě po přidání DMPO v desetiminutových intervalech. Mezi měřeními byl vzorek uchovávan v pokojové teplotě.

Na obrázku č. 11. lze pozorovat, že dochází k nárůstu EPR signálu DMPO-OR komplexu po celou dobu od přidání spinové pasti. Proto je možné z tohoto měření usuzovat, že dochází k propagaci oxidace buněčné kultury U937, přesněji oxidace na membránových proteinech pomocí vytvořených kyslíkových organických radikálů.

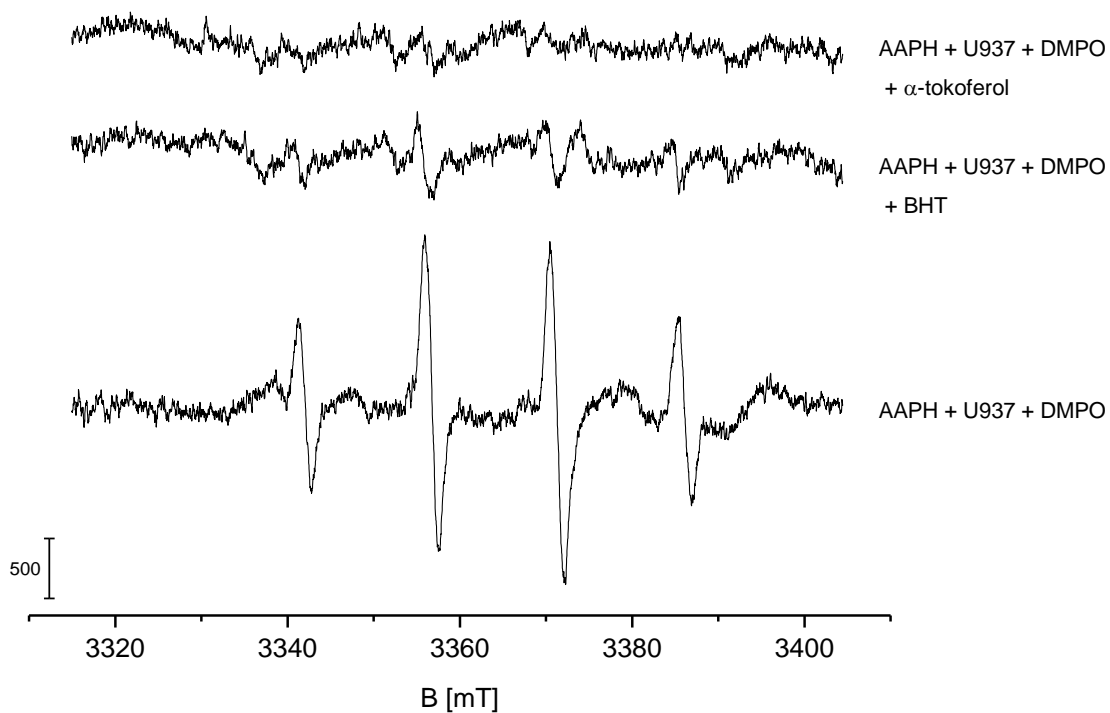
Tento nárůst velikosti EPR signálu DMPO-OR komplexu je kvantitativně zobrazen na obrázku č. 12, ze kterého je možné uvažovat lineární závislost velikosti EPR signálu DMPO-OR komplexu na době působení spinové pasti DMPO. Je zde vidět velmi nízký EPR signál DMPO-OR komplexu i v 0. minutě měření. To je z důvodu, že měření probíhá 5 minut, během kterých došlo ke tvorbě DMPO-OR komplexu, který byl detekován.

5.4. Vliv antioxidantů peroxylového radikálu na EPR signál DMPO-OR komplexu

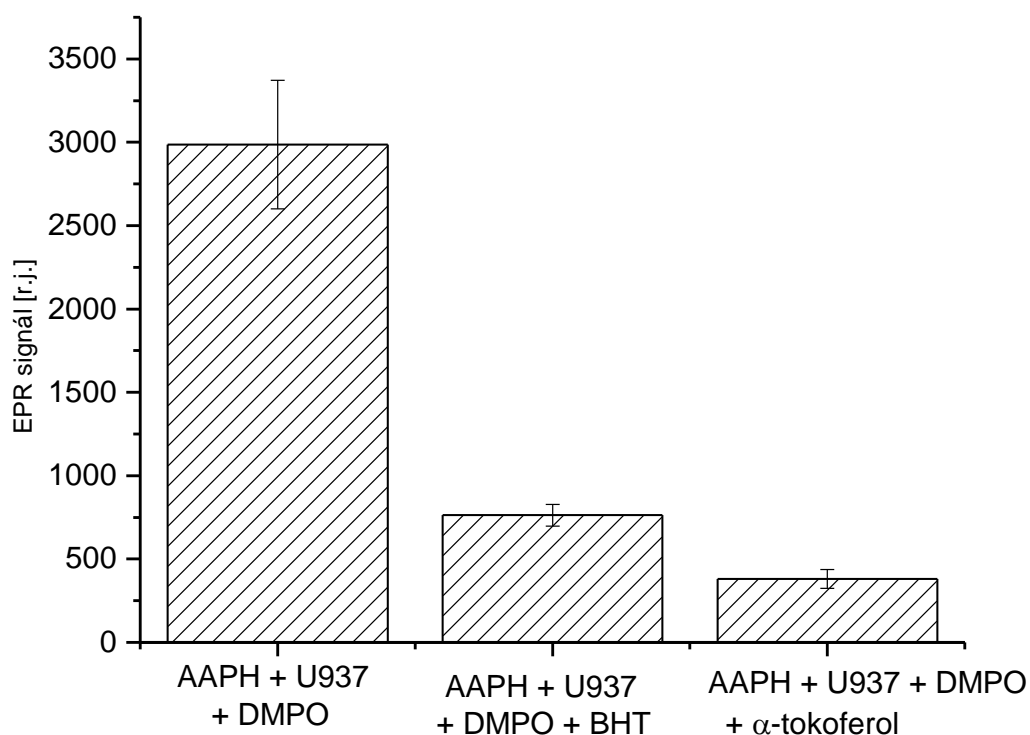
Na obrázku č. 13 jsou zobrazena EPR spektra DMPO-OR komplexu při použití antioxidantu BHT a α -tokoferolu. Při porovnání se vzorkem, který neobsahoval žádný antioxidant (Obr. č. 13) došlo k výraznému potlačení v případě BHT nebo k úplnému potlačení EPR signálu DMPO-OR komplexu v případě α -tokoferolu. Kvantitativně je tento jev vyjádřen na obrázku č. 14, BHT potlačil EPR signál DMPO-OR komplexu na 26 % původní hodnoty, zatímco α -tokoferol potlačil EPR signál DMPO-OR komplexu až na 14 % původní hodnoty.



Obr. č. 12.: Velikost EPR signálu DMPO-OR komplexu v závislosti na době působení spinové pasti DMPO. Byl měřen vzorek, který obsahoval 50 mM AAPH a buněčnou kulturu U937. Vzorek byl inkubován při teplotě 37 °C po dobu 2 hodin. Následně byl promyt v PBS a do reakční směsi byl přidán 50 mM DMPO. Vzorek byl poté měřen v 0. až 90. minutě po přidání DMPO v desetiminutových intervalech. Mezi měřeními byl vzorek uchovávan v pokojové teplotě. Byla odečtena velikost druhého píku ve spektrech komplexu DMPO-OR.



Obr. č. 13: Vliv antioxidantů peroxylového radikálu na tvorbu EPR spektra DMPO-OR komplexu. Vzorky obsahovaly 50 mM AAPH a buněčnou kulturu U937. Reakční směs byla zahřívána po dobu 2 hodin při 37 °C. Následně se vzorek promyl v PBS. Poté byl do vzorku přidán 50 mM DMPO, 50 mM DMPO a 5 mM BHT, nebo 50 mM DMPO a 5 mM α -tokoferol.



Obr. č. 14: Vliv antioxidantů peroxylového radikálu na velikosti EPR signálu DMPO-OR komplexu. Vzorky obsahovaly 50 mM AAPH a buněčnou kulturu U937. Reakční směs byla zahřívána po dobu 2 hodin při teplotě 37 °C. Vzorek (AAPH + U937 + DMPO) obsahoval 50 mM DMPO, vzorek (AAPH + U937 + DMPO + BHT) obsahoval 50 mM DMPO a 5 mM BHT a vzorek (AAPH + U937 + DMPO + α -tokoferol) obsahoval 50 mM DMPO a 5 mM α -tokoferol. Byla odečtena velikost druhého píku ve spektrech komplexu DMPO-OR. Velikost EPR signálu komplexu DMPO-OR ve vzorku obsahující BHT byla snížena na 26 % oproti vzorku bez antioxidantů, v případě vzorku obsahující α -tokoferol byl EPR signál komplexu DMPO-OR snížen až na 14 %.

6. Diskuze

Zkoumání mechanismů tvorby reakcí ROS v buňkách je velmi důležité. Protože u člověka může nadměrná tvorba ROS vést až k různým onemocněním například ateroskleróze, Alzheimerově chorobě či různým druhům rakoviny, je velmi užitečné znát mechanismy působení ROS. Proti ROS však působí antioxidanty, které snižují množství ROS v buňce.

Měření životaschopnosti ukázalo, jaký vliv má AAPH na buněčnou kulturu U937. Očekávalo se, že AAPH sníží životaschopnost ve vzorku, vzhledem k tomu, že AAPH iniciuje oxidaci biomakromolekul buněčné kultury, které tím mohou ztrácet svou integritu. Bylo zjištěno, že došlo k rapidnímu snížení životaschopnosti v reakční směsi, a to téměř o polovinu. Ve své studii Park a kol. (2003) uvádí pokles při použití stejné koncentrace, tedy 50 mM AAPH, na 58 % původní hodnoty. Ve studii Duggan a kol. (2002) byl zjištěn pokles životaschopnosti buněčné kultury U937 až na 50 % v případě použití 10 mM AAPH a inkubaci 12 hodin.

Po proměření závislosti působení spinové pasti DMPO na vzorek, byla stanovena doba působení DMPO na 30 minut. Při této době působení měl EPR signál DMPO-OR komplexu dostatečnou velikost. Na tomto místě je dobré podotknout, že doba života komplexu spinové pasti s kyslíkovým organickým radikálem, není tak dlouhá, jako doba, po kterou probíhalo měření. Může tedy docházet k rozpadu DMPO-OR komplexu, který není detekován. Použitá koncentrace spinové pasti byla dostatečně velká, aby byla umožněna tvorba velkého množství DMPO-OR komplexu po celou dobu působení i měření.

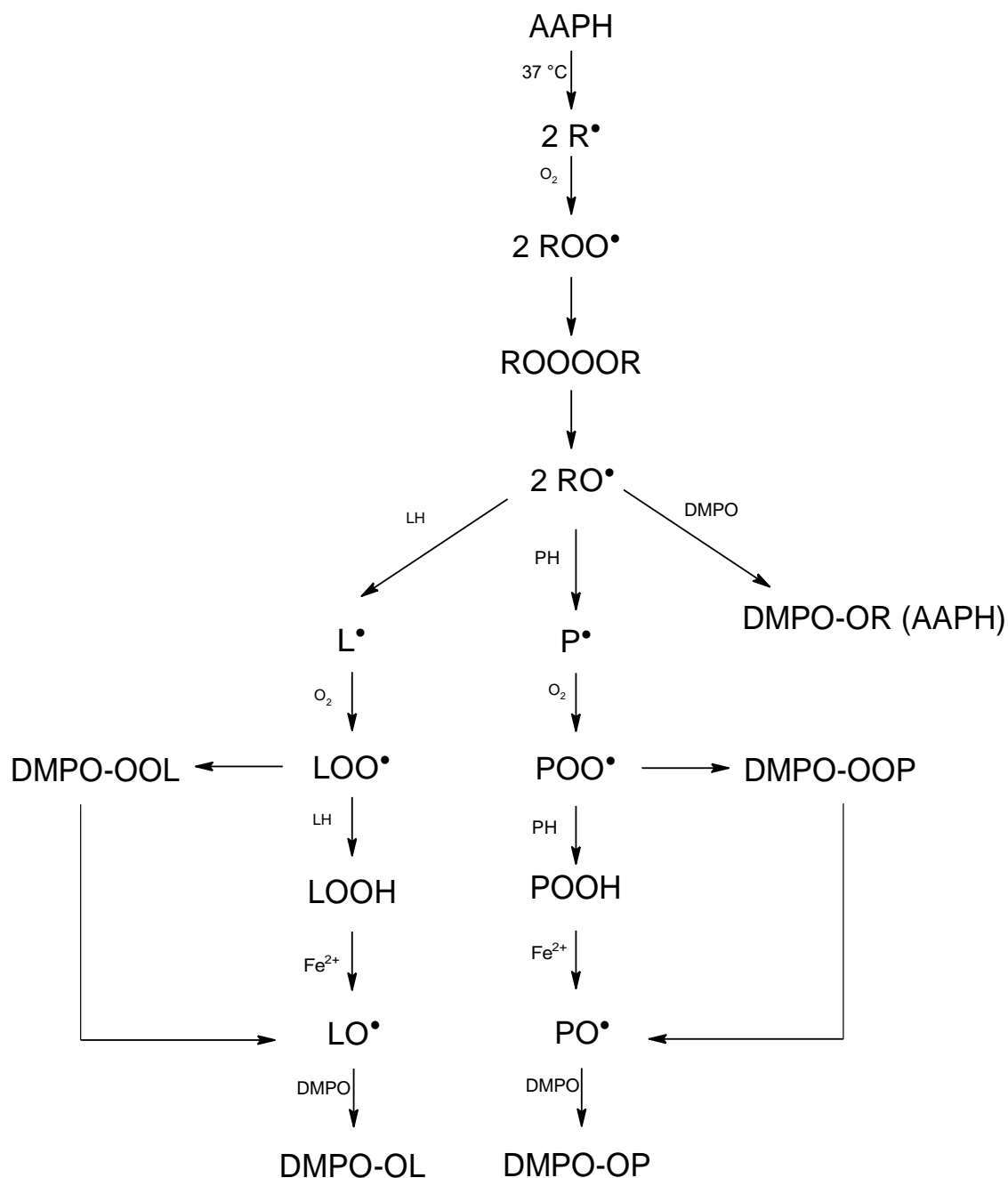
Tvorba DMPO-OR komplexu může být různého původu. Jedná se o proteinový (PO^\bullet), lipidový (LO^\bullet) alkoxylový radikál nebo je detekovaný RO^\bullet původem z azo iniciátoru AAPH (Obr. č. 15). Při použití dané metodiky, kdy byl vzorek po dvouhodinovém zahřívání promyt pomocí PBS, můžeme majoritní přítomnost DMPO-OR (AAPH) komplexu vyloučit. Jelikož AAPH má v porovnání s buňkami U937 nízkou hmotnost, při promytí dojde k odstranění AAPH ze vzorku. Napomáhá tomu i fakt, že DMPO je přidáno do reakční směsi až po promytí, kdy došlo k odstranění

AAPH. Předpoklad je takový, že RO^\bullet vzniklé z AAPH již začaly oxidovat buněčnou kulturu v průběhu dvouhodinového zahřívání.

Jelikož dochází k oxidaci na plazmatické membráně, jsou zde dvě makromolekuly, které mohou být oxidovány. Těmi jsou lipidy v lipidové dvojvrstvě plazmatické membrány nebo membránové proteiny. Pokud zohledníme vlastnost použitého azo iniciátoru AAPH, který je hydrofilní, oxidace by měla probíhat ve větší míře na integrálních membránových proteinech, protože AAPH bude hůře interagovat s lipidy v plazmatické membráně. Tuto hypotézu potvrzuje i studie Gieseg a kol. (2000), ve které bylo dokázáno, že při použití azo iniciátoru AAPH na buněčné kultuře U937 dochází k oxidaci proteinů. V této práci detekovali vzniklé ROOH a došli k závěru, že v dochází k majoritní tvorbě POOH a minoritní nebo téměř žádné tvorbě LOOH. Na jejich výsledky pak navázaly další studie, které k podobným závěrům došly při použití buněčné kultury U937 (Du a Gebicki 2004), ale i při použití buněčné kultury Sp2/O-Ag14 (Gebicky a kol. 2000). I když pomocí EPR spektroskopie nelze rozlišit, zdali je detekován DMPO-OP komplex nebo DMPO-OL komplex, tak je detekovaný EPR signál prisuzován DMPO-OP komplexu. Pro přesnější rozeznání původu by bylo třeba provést sérii měření pomocí kombinace vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie.

Při měření tvorby kyslíkových organických radikálů na buněčné kultuře U937 iniciovanou azo iniciátorem AAPH bylo detekováno spektrum DMPO-OP komplexu. Otázkou ale zůstává, zda je PO^\bullet tvořen přímou cestou z POO^\bullet přes POOH, nebo zda ve vzorku dochází k tvorbě DMPO-OOP komplexu z POO^\bullet a následném rozpadu DMPO-OOP komplexu na PO^\bullet a následné interakci s DMPO za tvorby DMPO-OP komplexu, jak je zaznačené na obrázku č. 15. Ve své práci Dikalov a Mason (1999) uvádějí, že k tvorbě RO^\bullet převážně dochází rozpadem DMPO-OOR komplexu.

Použití antioxidantů BHT a α -tokoferolu výrazně potlačilo EPR signál DMPO-OP komplexu. Jak BHT, tak α -tokoferol jsou antioxidanty, které interagují s POO^\bullet , aby zamezili řetězové reakci. Potlačení EPR signálu DMPO-OP komplexu pomocí antioxidantů verifikuje tvrzení, že PO^\bullet vzniká rozpadem DMPO-OOP komplexu. Pokud by PO^\bullet vznikal převážně z POOH, nedošlo by k tak výraznému snížení EPR signálu DMPO-OP komplexu, protože reakcí POO^\bullet a antioxidantem může vznikat i POOH, a docházelo by tedy i k následné tvorbě PO^\bullet a DMPO-OP komplexu.



Obr. č. 15: Schéma tvorby organických radikálů na azo iniciátoru AAPH, na proteinech (PH) a lipidech (LH). Je znázorněna tepelná degradace AAPH při teplotě 37 °C. Schéma popisuje vznik lipidových (LOO•) a proteinových (POO•) peroxylových radikálů a jejich komplexy se spinovou pastí DMPO-OOL a DMPO-OOP. Dále je zde zobrazen vznik lipidových (LOOH) a proteinových (POOH) hydroperoxidů, lipidových (LO•) a proteinových (PO•) alkoxylových radikálů a jejich komplexy se spinovou pastí DMPO-OP, DMPO-OL.

7. Závěr

Tato bakalářská práce byla zaměřena na tvorbu kyslíkových organických radikálů na buněčné kultuře U937 pomocí azo iniciátoru AAPH. Pro detekci tvořených kyslíkových organických radikálů byla použita EPR spektroskopie s využitím spinové pasti DMPO.

Pomocí tepelné degradace azo iniciátoru AAPH byla iniciována propagace oxidace proteinů na buněčné kultuře U937. Během propagace docházelo ke vzniku POO^\bullet na membránových proteinech buněčné kultury U937. Proteinové peroxylové radikály tvořily DMPO-OOP komplexy se spinovou pastí DMPO, které nebylo možné detekovat, protože DMPO-OOP komplex je velmi nestabilní, rozpadá se a vzniká z něj PO^\bullet . Proteinový peroxylový radikál pak reaguje s DMPO za vzniku DMPO-OP komplexu, který byl detekovat pomocí EPR spektroskopie.

Byla proměřena časová závislost velikosti EPR signálu DMPO-OP komplexu na době působení spinové pasti DMPO. Zjistilo se, že dochází k lineárnímu nárůstu EPR signálu DMPO-OP komplexu v průběhu měření. Tento fakt potvrdil, že dochází k propagaci proteinové oxidace v delším časovém úseku.

Při měření s antioxidanty peroxylového radikálu BHT a α -tokoferolu byl zaznamenán výrazný útlum EPR signálu DMPO-OP komplexu. Výsledky měření s antioxidanty potvrzují, že PO^\bullet převážně vzniká rozpadem DMPO-OOP komplexu. Pokud by majoritní tvorba PO^\bullet probíhala rozpadem POOH, nedocházelo by k tak výraznému snížení EPR signálu DMPO-OP komplexu při použití BHT a α -tokoferolu, protože oba antioxidanty mohou převádět PO^\bullet na POOH.

V této práci byla studována oxidace biomakromolekul a tvorba kyslíkových organických radikálů pouze pomocí EPR spektroskopie. Tato metoda ovšem neumožňuje rozlišit, původ detekovaného DMPO-OR komplexu, zda se jedná převážně oxidací proteinů, a tedy tvorbu DMPO-OP komplexu, nebo zda ve větší míře dochází k oxidaci lipidů v plazmatické membráně a tvorbu DMPO-OL komplexu. Podrobnějším zkoumáním, např. pomocí kombinace vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektroskopií, by bylo možné navázat na tuto práci.

8. Seznam literatury

- Afonso C. B., Spickett C. M. (2019) Lipoproteins as targets and markers of lipoxidation. *Redox Biology* **23**, 101066.
- Dalle-Donne I., Scaloni A., Giustarini D., Cavarra E., Tell G., Lungarella G., Colombo R., Rossi R., Milzani A. (2005) Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics. *Mass Spectrometry Reviews* **24**, 55-99.
- Davies M. J. (2016) Protein oxidation and peroxidation. *Biochemical Journal* **473**, 805-825.
- Dikalov S. I., Mason R. P. (1999) Reassignment of organic peroxy radical adducts. *Free Radical Biology and Medicine* **27**, 864–872.
- Du J., Gebicki J. M. (2004) Proteins are major initial cell targets of hydroxyl free radicals. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**, 2334-2343.
- Duggan S., Rait C., Platt A., Gieseg S. P. (2002) Protein and thiol oxidation in cells exposed to peroxy radicals is inhibited by the macrophage synthesised pterin 7,8-dihydroneopterin. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1591**, 139–145.
- Gebicki J.M., Du J., Collins J., Tweeddale H. (2000) Peroxidation of proteins and lipids in suspensions of liposomes, in blood serum, and in mouse myeloma cells. *Acta Biochimica Polonica* **47**, 901-911.
- Gęgotek A., Skrzydlewska E. (2019) Biological effect of protein modifications by lipid peroxidation products. *Chemistry and Physics of Lipids* **221**, 46-52.
- Gieseg S., Duggan S., Gebicki J.M. (2000) Peroxidation of proteins before lipids in U937 cells exposed to peroxy radicals. *Biochemical Journal* **350**, 215-218.
- Guéraud F., Atalay M., Bresgen N., Cipak A., Eckl P. M., Huc L., Jouanin I., Siems W., Uchida K. (2010) Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radical Research* **44**, 1098-1124.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (2007) *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed., Oxford University Press, New York, U.S.A., 851 stran.
- Harmon P., Boccardi G. (2016). Oxidative susceptibility testing. In: *Pharmaceutical Stress Testing, Predicting Drug Degeneration*. 2nd ed., (Baertschi S. W., Alsante K. M., Reed R. A.), CRC Press, Boca Raton, 168-191.
- Haseloff R. F., Mertsch K., Rohde E., Baeger I., Grigor'ev I. A., Blasig I. E. (1997) Cytotoxicity of spin trapping compounds. *FEBS Letters* **418**, 73–75.
- Chanput W., Peters V., Wichers H. (2015) THP-1 and U937 Cells. In *The Impact of Food Bioactives on Health*, Springer, New York, U. S. A., 147–159.
- Ignold K. U. (1968) Peroxy Radicals. *Accounts of Chemical Research* **2**, 193-201.
- Koolman J., Röhm K. -H. (2012) *Barevný atlas biochemie*. 4. vydání, Grada, Praha, 498 stran.
- Krainev A. G., Bigelow D. J. (1996) Comparison of 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH) and 2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile) (AMVN) as free radical initiators: a spin-trapping study. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transaction 2* **4**, 747-754.
- Lambert C. R., Black H. S., George Truscott, T. (1996) Reactivity of butylated hydroxytoluene. *Free Radical Biology and Medicine* **21**, 395–400.
- Miyamoto S., Martinez G. R., Medeiros M. H. G., Di Mascio P. (2003) Singlet molecular oxygen generated from lipid hydroperoxides by the Russell mechanism: Studies using ¹⁸O-labeled linoleic acid hydroperoxide and monomol light emission measurements. *Journal of the American Chemical Society* **125**, 6172-6179.
- Niki E. (1990) Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. *Methods in Enzymology* **186**, 100-108.
- Niki E. (2009) Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology and Medicine* **47**, 469-484.
- Nimse S. B., Pal D. (2015) Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances* **5**, 27986–28006.

- Nonell S., Flors C. (2016). *Singlet oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences*. Vol. 1. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 472 stran.
- Pandey K. B., Rizvi, S. I. (2010) Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **3**, 2-12.
- Park J. E., Yang J. H., Yoon S. J., Lee J. H., Yang E. S., Park J. W. (2002) Lipid peroxidation-mediated cytotoxicity and DNA damage in U937 cells. *Biochimie* **84**, 1198–1204.
- Rác M., Křupka M., Binder S., Sedlářová M., Matušková Z., Raška M., Pospíšil P. (2015) Oxidative damage of U937 human leukemic cells caused by hydroxyl radical results in singlet oxygen formation. *Plos One* **10**, e0116958.
- Shibamoto T. (2006) Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**, 12-25.
- Schmitt F.-J., Renger G., Friedrich T., Kreslavski V. D., Zharmukhamedov S. K., Los D. A., Kuznetsov V. V., Allakhverdiev S. I. (2014). Reactive oxygen species: Re-evaluation of generation, monitoring and role in stress-signaling in phototrophic organisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1837**,835-848.
- Sundström C., Nilsson K. (1976) Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *International Journal of Cancer* **17**, 565–577.
- Villamena F. A. (2017) Chapter 5 – EPR Spin Trapping. In *Reactive Species Detection in Biology*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 163-202.