

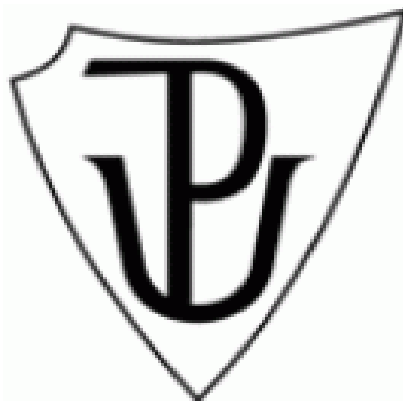
**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

KATEDRA BIOFYZIKY

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Stanovení aldehydů s krátkým řetězcem v nádorových buňkách**



Vypracovala: Belková Julie

Studijní obor: Biofyzika

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

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora: Julie Belková  
Název práce: Stanovení aldehydů s krátkým řetězcem v nádorových buňkách  
Typ práce: Bakalářská  
Pracoviště: Katedra biofyziky  
Vedoucí práce: doc. RNDr. Pavel Pospíšil, Ph.D.  
Rok obhajoby práce: 2023

### **Abstrakt:**

Lipidová peroxidace je řetězová reakce, během které se vytváří karbonylové sloučeniny, jakožto sekundární produkty této reakce. Tato bakalářská práce se zabývá stanovením aldehydů s krátkým řetězcem vznikajících během lipidové peroxidace v nádorových buňkách pomocí HPLC analýzy. K iniciaci lipidové peroxidace byl použit azo iniciátor AAPH. Byl prokázán jeho vliv na vitalitu buněk, kdy se vitalita snižovala s rostoucím časem inkubace AAPH. Ve vzorcích byly detekovány dva aldehydy s krátkým řetězcem, a to acetaldehyd a propanal. U obou byl zaznamenán nárůst při působení AAPH po dobu 0, 15, 30, 45 a 60 minut.

Klíčová slova: Lipidová peroxidace, reaktivní formy kyslíku, acetaldehyd, propanal, AAPH, HPLC  
Počet stran: 31  
Počet příloh: 0  
Jazyk: český

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname: Julie Belková  
Title of thesis: Determination of short-chain aldehydes in cancer cells  
Type of thesis: Bachelor  
Department: Department of biophysics  
Supervisor: doc. RNDr. Pavel Pospíšil, Ph.D.  
The year of defence: 2023

### **Abstract:**

Lipid peroxidation is a chain reaction during which carbonyls are formed as secondary products of lipid peroxidation. This bachelor thesis is about the determination of short-chain aldehydes formed during lipid peroxidation in human cancer cells by HPLC analysis. The azo initiator AAPH was used as the initiator of lipid peroxidation. Its influence on cell viability was measured, where the viability decreased with increasing incubation time of AAPH. Two short-chain aldehydes, such as acetaldehyde and propanal, were detected in the samples and they showed an increase after AAPH treatment for 0, 15, 30, 45 and 60 minutes.

Key words: Lipid peroxidation, reactive oxygen species, acetaldehyde, propanal, AAPH, HPLC  
Number of pages: 31  
Number of attachments: 0  
Language: czech

Ráda bych poděkovala doc. RNDr. Pavlu Pospíšilovi, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce, jeho čas, trpělivost a cenné připomínky. Rovněž bych chtěla poděkovat Mgr. Marku Rácovi, Ph.D. a Renuce Ramalingam Manoharan M.Sc., Ph.D. za jejich pomoc a užitečné informace při práci v laboratoři.

# Seznam zkratek

AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochlorid
DNPB	2,4-dinitrofenylhydrazin
RO•	Alkoxylový radikál
R•	Alkylový radikál
RH	Biomolekula
PBS	Fosfátový pufr
ROOH	Hydroperoxid
HO <sub>2</sub> •	Hydroperoxylový radikál
NaOH	Hydroxid sodný
HO•	Hydroxylový radikál
HClO <sub>4</sub>	Kyselina chloristá
HClO	Kyselina chlorná
N <sub>2</sub>	Molekulární dusík
O <sub>2</sub>	Molekulární kyslík
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxid vodíku
ROO•	Peroxylový radikál
ROS	Reaktivní formy kyslíku
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singletní kyslík
SOD	Superoxid dismutasa
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Superoxidový aniontový radikál
ROOOOR	Tetraoxid
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie



Železitý kationt



Železnatý kationt

# Obsah

1. Úvod .....	1
2. Přehled problematiky.....	2
2.1 Reaktivní formy kyslíku .....	2
2.1.1 Superoxidový aniontový radikál .....	3
2.1.2 Peroxid vodíku .....	4
2.1.3 Hydroxylový radikál.....	4
2.1.4 Singletní kyslík .....	5
2.1.5 Alkylový radikál.....	6
2.1.6 Peroxylový radikál .....	6
2.1.7 Alkoxylový radikál.....	6
2.2 Lipidová peroxidace .....	6
2.2.1 Průběh neenzymatické lipidové peroxidace .....	7
2.2.1.1 Iniclace .....	7
2.2.1.2 Propagace .....	7
2.2.1.3 Terminace.....	8
2.3 Antioxidanty .....	8
2.3.1 Enzymatické antioxidanty .....	8
2.3.2 Neenzymatické antioxidanty.....	9
2.4 Produkty lipidové peroxidace .....	9
2.4.1 Primární produkty lipidové peroxidace .....	9
2.4.2 Sekundární produkty lipidové peroxidace .....	9
2.5 Azo iniciátory.....	11
3. Cíl práce.....	12
4. Materiál a metody.....	13
4.1 Seznam použitých chemikálií .....	13
4.2 Přístrojové vybavení.....	13

4.3	Buněčná linie U937 .....	14
4.4	Určení počtu a vitality buněk.....	14
4.5	Příprava biologických vzorků na měření volných aldehydů pomocí HPLC .....	14
4.6	Příprava biologických vzorků na měření vázaných aldehydů pomocí HPLC .....	15
4.7	Příprava vzorků AAPH na měření aldehydů pomocí HPLC .....	16
4.8	HPLC analýza aldehydů .....	16
5.	Výsledky .....	17
5.1	Vliv azo iniciátoru na vitalitu buněk .....	17
5.2	Tvorba aldehydů s krátkým řetězcem po aplikaci azo iniciátoru.....	18
6.	Diskuze .....	27
7.	Závěr.....	29
8.	Seznam literatury.....	30



# 1. Úvod

Lipidy jsou skupinou biomolekul, které hrají důležitou roli v živých organismech a plní jisté biologické funkce. Vyskytují se v buňkách jako součást buněčných membrán, kde pomáhají udržovat jejich integritu a propustnost, mezi jejich další funkce patří ukládání energie, signalizace mezi buňkami nebo ochrana orgánů. Lipidy mohou podléhat oxidaci, k té dochází zejména u těch lipidů, které obsahují mastné kyseliny s řadou dvojných vazeb (polynenasycené mastné kyseliny).

Lipidová peroxidace je proces, při kterém dochází k poškození lipidů. Reakce může probíhat neenzymaticky, působením reaktivních forem kyslíku, nebo také enzymaticky pomocí různých enzymů, jako je lipoxygenasa, či cyklooxygenasa. Neenzymatická lipidová peroxidace je řetězová reakce skládající se ze třech kroků a to iniciace, propagace a terminace, během kterých vzniká velké množství produktů. Během propagace vznikají primární produkty lipidové peroxidace hydroperoxydy. Tyto primární produkty se mohou účastnit dalších reakcí za vzniku sekundárních produktů lipidové peroxidace. Mezi nejvíce studované sekundární produkty patří především aldehydy, a to konkrétně malondialdehyd a 4-hydroxynonenal, které můžeme považovat za spolehlivé markery lipidové peroxidace.

Teoretická část bakalářské práce je zaměřena na reaktivní formy kyslíku a lipidovou peroxidace, její produkty a nastartování této řetězové reakce pomocí azo iniciátoru. Experimentální část této práce se zabývá stanovením dvou aldehydů s krátkým řetězcem, jakožto sekundárních produktů lipidové peroxidace v nádorových buňkách buněčné linie U937. Mezi stanovené aldehydy pomocí HPLC analýzy patří acetaldehyd a propanal.

## 2. Přehled problematiky

### 2.1 Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou reaktivní sloučeniny, které vznikají z molekulárního kyslíku ( $O_2$ ), a to buď elektronovým přenosem nebo pomocí přenosu energie za aerobních podmínek v buňkách.

Podle přítomnosti nepárových elektronů mohou být ROS rozděleny do dvou skupin (Kohen a Nyska 2002). Radikálové ROS obsahují jeden nebo dva nepárové elektrony a neradikálové ROS sice neobsahují žádný nepárový elektron, ale radikálové ROS z nich mohou vznikat.

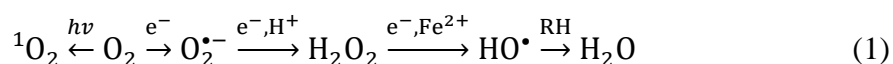
Příklady radikálových ROS jsou:

- superoxidový aniontový radikál ( $O_2^{\bullet-}$ )
- hydroxylový radikál ( $HO^{\bullet}$ )
- hydroperoxylový radikál ( $HO_2^{\bullet}$ )
- peroxylový radikál ( $ROO^{\bullet}$ )
- alkoxylový radikál ( $RO^{\bullet}$ )
- alkylový radikál ( $R^{\bullet}$ ).

Neradikálové ROS jsou:

- peroxid vodíku ( $H_2O_2$ )
- hydroperoxid ( $ROOH$ )
- singletní kyslík ( $^1O_2$ )
- kyselina chlorná ( $HClO$ )

Vznik ROS pomocí přenosu elektronu začíná na  $O_2$ , kdy ten je nejprve redukován elektronem a vzniká  $O_2^{\bullet-}$  (1). Superoxidový aniontový radikál dále pokračuje v reakci, přijme elektron a proton vodíku a vytváří se další ROS a to  $H_2O_2$ . Peroxid vodíku poté reaguje s kationtem kovu a tím je redukován na  $HO^{\bullet}$ . Hydroxylový radikál v dalším kroku oxiduje biomolekulu (RH) za vzniku  $H_2O$  a  $R^{\bullet}$ .



Ke vzniku  $^1\text{O}_2$  z  $\text{O}_2$  nedochází pomocí přesunu elektronů, ale pomocí přenosu excitační energie.

### 2.1.1 Superoxidový aniontový radikál

Superoxidový aniontový radikál je dvouatomová molekula kyslíku s jedním nepárovým elektronem, který může vznikat jak enzymatickými, tak neenzymatickými procesy. Enzymaticky vzniká  $\text{O}_2^{\bullet-}$  jedoelektronovou redukcí  $\text{O}_2$  (2) (Birben a kol. 2012).

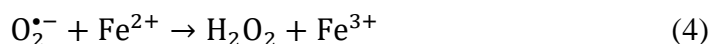


Superoxidový aniontový radikál může při snížení pH přecházet ve svou protonovanou formu, kterou je  $\text{HO}_2^{\bullet}$  (Bielski a kol. 1985) (3).

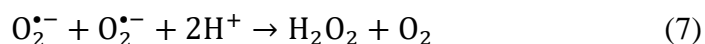


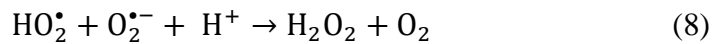
Díky tomu, že  $\text{HO}_2^{\bullet}$  není záporně nabitý, tak může mnohem snadněji difundovat přes membránu a reagovat s lipidy (Metodiewa a Koška 1999).

Superoxidový aniontový radikál se chová jako oxidant, kdy přímá elektrony od železnatého kationtu ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a vzniká  $\text{H}_2\text{O}_2$  a železitý kationt ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (4), ale může se chovat i jako reduktant, kdy naopak elektrony daruje za vzniku  $\text{O}_2$  (5). Kdežto  $\text{HO}_2^{\bullet}$  se chová pouze jako oxidant, kdy při reakci s  $\text{RH}$  vzniká  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{R}^{\bullet}$  (6).



Další důležitou reakcí, kde vystupuje  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , je tvorba  $\text{H}_2\text{O}_2$  pomocí superoxid dismutasy (SOD), která může být různého druhu. Mezi hlavní SOD obsahující různé katalytické kovové ionty řadíme eukaryotickou Cu/Zn SOD, mitochondriální Fe/Mn SOD a Ni SOD (Pospíšil a kol. 2019). Při této enzymatické reakci spolu reagují dva  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , přičemž jeden z nich se oxiduje a druhý redukuje na  $\text{H}_2\text{O}_2$  (7). Ale v případě neenzymatické spontánní reakce tato reakce neprobíhá tak lehce, kvůli odpuzujícím se nábojům  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , proto je častější reakce  $\text{HO}_2^{\bullet}$  se záporně nabitým  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (8) nebo reakce dvou  $\text{HO}_2^{\bullet}$  při nízkém pH (9).

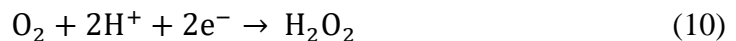




### 2.1.2 Peroxid vodíku

Je to velmi slabá kyselina skládající se ze dvou atomů vodíku a dvou atomů kyslíku, kdy ani na jednom kyslíku se nenachází nepárový elektron, tím pádem to není radikál, ale do skupiny ROS ho řadíme, i když není tak reaktivní, tak je substrátem pro vznik dalšího druhu ROS, přesněji  $\text{HO}^\bullet$ . Vyznačuje se delší dobou života a schopností difundovat přes membrány (Blokchina a Fagerstedt 2010).

Peroxid vodíku vzniká enzymatickou nebo neenzymatickou jednoelektronovou redukcí  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Ale může vznikat také dvou elektronovou redukcí  $\text{O}_2$  katalyzovanou oxidázou (10) anebo dvou elektronovou oxidací vody za pomoci manganatého komplexu.



Má oxidační i slabě redukční vlastnosti, může se také samovolně rozpadat na vodu a  $\text{O}_2$  (11), tento rozklad může být urychlen světelným nebo tepelným zářením, či těžkými kovy (Cahill a Taube 1952).



### 2.1.3 Hydroxylový radikál

Hydroxylový radikál je dvou atomová molekula s jedním nepárovým elektronem na atomu kyslíku. Má velmi silné oxidační vlastnosti, jeho doba života je velmi krátká (méně než 1 ns) a tím pádem nemůže přecházet přes membrány. Tento radikál vzniká z  $\text{H}_2\text{O}_2$  během metabolických procesů, kdy buňka je schopna vyprodukovat okolo 50  $\text{HO}^\bullet$  každou sekundu (Ayala a kol. 2014), to je až okolo čtyř milionů  $\text{HO}^\bullet$  denně, které potom dále mohou iniciovat lipidovou peroxidací.

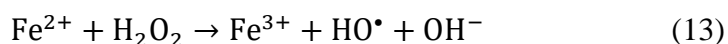
Reaktivita  $\text{HO}^\bullet$  je jedna z nejvyšších ze všech ROS, a to hlavně kvůli nepárovému elektronu a také kvůli velmi kladnému redoxnímu potenciálu. Má schopnost reagovat s většinou organických molekul, jako jsou proteiny, lipidy, sacharidy nebo nukleové kyseliny. Tyhle reakce probíhají v místě vzniku  $\text{HO}^\bullet$  nebo v jeho blízkém okolí. Reakce  $\text{HO}^\bullet$  s BH bývá ve většině případů nevratná. Může tomu tak být u napadení

purinových a pyrimidinových bází DNA, kdy toto poškození je považováno za mutagenní.

Hydroxylový radikál může vznikat jedoelektronovou redukcí  $\text{H}_2\text{O}_2$  pomocí přechodných kovů (Fentonova reakce), jedoelektronovou redukcí  $\text{H}_2\text{O}_2$  pomocí  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Haber-Weissova reakce) nebo také jedoelektronovou oxidací vody (12).



Během Fentonovy reakce spolu reaguje  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{Fe}^{2+}$  za vzniku  $\text{HO}^\bullet$  a  $\text{Fe}^{3+}$  (13). Místo  $\text{Fe}^{2+}$  může reagovat i  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$  nebo  $\text{Zn}^+$  (Pospíšil a kol. 2019).



Haber-Weissova reakce má dva kroky, v prvním vzniká  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{O}_2$  reakcí  $\text{O}_2^{\bullet-}$  s  $\text{Fe}^{3+}$  (14). Druhým krokem už je pouze Fentonova reakce (13).



Kvůli svým silným oxidačním vlastnostem  $\text{HO}^\bullet$  přijímá elektrony a redukuje se na vodu za vzniku  $\text{R}^\bullet$  (15), který dále vede k lipidové peroxidaci nebo oxidaci proteinů.



#### 2.1.4 Singletní kyslík

Singletní kyslík je  $\text{O}_2$ , který se nachází v singletním excitovaném stavu. V tomto stavu se může nacházet na dvou energetických hladinách, liší se podle orientace spinu a obsazování elektronů v degenerovaných orbitalech. První z nich je singletní kyslík ( $^1\Delta_g$ ), který má dva párové elektrony ve stejném orbitalu. Jeho hladina energie je nižší a je tou běžnější formou  $^1\text{O}_2$  (Adam a kol. 2005). Druhý je singletní kyslík ( $^1\Sigma_g^+$ ) s vyšší energií, která má dva anti vazebné elektrony na dvou orbitalech, jeho doba života je velmi krátká a relaxuje zpět na  $^1\text{O}_2$  s nižší energií.

Nevzniká elektronovým přenosem, ale přenosem excitační energie z tripletního stavu  $^3\text{P}^*$  (P značí pigment) na  $\text{O}_2$  (16). Nejprve  $^1\text{P}^*$  přechází na  $^3\text{P}^*$  pomocí mezisystémového přechodu, poté reaguje s  $\text{O}_2$  v tripletním stavu, kde dochází k přenosu energie z  $^3\text{P}^*$  na  $\text{O}_2$  a pigmenty se vrací do stavu základního.



### 2.1.5 Alkylový radikál

Alkylový radikál vzniká spolu s  $\text{H}_2\text{O}$  při reakci BH s  $\text{HO}^\bullet$ . Je to velmi reaktivní organická molekula s krátkou dobou života a její nepárový elektron se nachází a na atomu uhlíku.

### 2.1.6 Peroxylový radikál

Peroxylový radikál vzniká v biologickém systému reakcí  $\text{O}_2$  s  $\text{R}^\bullet$  nebo rozpadem  $\text{ROOH}$ , ale v laboratoři se k jeho vzniku používají azo iniciátory. Tento organický radikál je vysoce energetická molekula, jeho redoxní potenciál závisí na druhu R. Peroxylový radikál se vyznačuje také zejména svojí dlouhou dobou života, kdy například s hemovou skupinou dokáže být v biologickém systému stabilní až po dobu 30 minut (Kang a kol. 2002). Jeho anorganickým protějškem je  $\text{HO}_2^\bullet$ .

### 2.1.7 Alkoxylový radikál

Alkoxylový radikál je organickou paralelou  $\text{HO}^\bullet$ . Může vznikat z  $\text{ROO}^\bullet$  nebo také jednoelektronovou redukcí alkylového  $\text{ROOH}$ .

## 2.2 Lipidová peroxidace

Lipidy jsou základním prvkem buněčných membrán, udržují jejich strukturu a řídí funkci buněk. Patří mezi hlavní cíle napadení ROS, oxidace lipidů je dále potom spojena s řadou různých patologických stavů nebo onemocnění, kterými může být diabetes (Negre-Salvayre a kol. 2008), rakovina, ateroskleróza nebo neurodegenerativní poruchy (Alzheimerova či Parkinsonova nemoc (Gao a kol. 2012)).

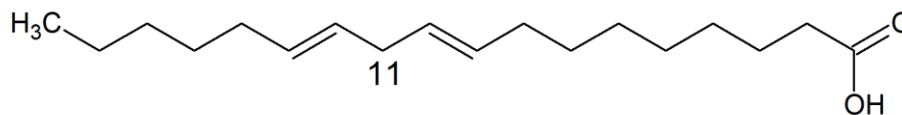
Lipidová peroxidace je proces, při kterém působením oxidačních činidel jako jsou volné radikály dochází k poškození lipidů, zejména jejich polynenasycených mastných kyselin. V buňkách může docházet k lipidové peroxidaci neenzymatickými procesy nejen pomocí ROS, ale tento mechanismus může probíhat i za pomoci enzymů, mezi které patří lipoxygenasa, cyklooxygenasa nebo cytochrom P450 (Ayala a kol. 2014).

## 2.2.1 Průběh neenzymatické lipidové peroxidace

Lipidová peroxidace pomocí ROS je řetězová proces skládající se ze třech kroků: iniciace, propagace a terminace. Ze všech ROS má na neenzymatické peroxidaci lipidů největší podíl  $\text{HO}^\bullet$  a  $\text{HO}_2^\bullet$  (Ayala a kol. 2014).

### 2.2.1.1 Iniciace

Hlavním krokem iniciace je tvorba  $\text{R}^\bullet$ . Nejprve dochází k reakci iniciátoru ve formě volného radikálu s molekulou polynenasycené mastné kyseliny, kdy  $\text{HO}^\bullet$  odštěpuje atom vodíku z RH a vzniká  $\text{R}^\bullet$  z této mastné kyseliny (15). Polynenasycené mastné kyseliny obsahují různý počet dvojných vazeb ve své struktuře, a právě tyto dvojně vazby jsou propojené methylenovými skupinami, které jsou v důsledku přítomnosti dvojně vazby oslabené, proto  $\text{HO}^\bullet$  nejčastěji v tomto místě odštěpuje vodík z molekuly (Yin a kol. 2011). Příkladem může být kyselina linolová (obrázek č. 1), která obsahuje dvě dvojně vazby, a právě vazba mezi uhlíkem a vodíkem na pozici C11 je ta nejslabší v celé molekule.



Obrázek č. 1: Struktura kyseliny linolové

V dalším kroku dojde k přeskupení dvojných vazeb na  $\text{R}^\bullet$  a tím vzniká konjugovaný dien. Ten ihned reaguje s  $\text{O}_2$  za vzniku lipidového  $\text{ROO}^\bullet$  (17).



### 2.2.1.2 Propagace

Propagace začíná vznikem lipidového  $\text{ROO}^\bullet$ , dále tento mechanismus pokračuje vytržením atomu vodíku z RH na lipidový  $\text{ROO}^\bullet$  za vzniku lipidového  $\text{ROOH}$  a dalšího  $\text{R}^\bullet$  (18).



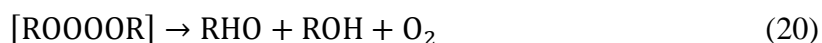
Lipidový  $\text{ROOH}$  je prvním poměrně stabilním produktem lipidové peroxidace.

Pokud lipidový  $\text{ROO}^\bullet$  reaguje s molekulou, která neobsahuje žádný nepárový elektron, tak vzniká další radikál, který pokračuje v řetězové reakci.

### 2.2.1.3 Terminace

Posledním krokem neenzymatické lipidové peroxidace je terminace, kdy proces propagace trvá do doby, než se radikál setká s dalším radikálem za vzniku neradikálu, čímž je řetězová reakce ukončena.

Reakce kdy spolu reagují dva lipidové  $\text{ROO}^\bullet$  se nazývá Russellův mechanismus, při téhle reakci vzniká nestabilní lineární tetraoxid ( $\text{ROOOOR}$ ) (19), který se dále rozkládá na aldehyd, alkohol a  $\text{O}_2$  (20) (Russell 1957).



Tato řetězová reakce nemusí být ukončená pouze reakcí dvou radikálů, ale k terminaci může dojít i při reakci volného radikálu s molekulou antioxidantu, která má schopnost tuto řetězovou reakci ukončit (Young a Woodside 2001). Při neenzymatické lipidové peroxidaci se nejčastěji jako antioxidant používá vitamín E, kterým může být  $\alpha$ -tokoferol.

## 2.3 Antioxidanty

Antioxidanty jsou látky, které dokážou ovlivnit lipidovou peroxidaci neboli inhibovat buněčné poškození volnými radikály. Chrání nás před celou řadou nejrůznějších onemocnění, jako je šedý zákal, autoimunitní onemocnění, alergie, astma nebo dokonce i před stárnutím (Nimse a Pal 2015). Antioxidanty můžeme rozdělit na enzymatické a neenzymatické.

### 2.3.1 Enzymatické antioxidanty

Enzymatické antioxidanty vystupují v reakcích, kde způsobují rozpad volného radikálu a vznik méně reaktivního radikálu. Mezi enzymatické antioxidanty patří SOD, katalasa nebo glutathionperkasa (Mates a kol. 1999).



## 2.3.2 Neenzymatické antioxidanty

Neenzymatické antioxidanty reagují mnohem rychleji s ROS než polynenasycené mastné kyseliny, tím přerušují jejich řetězové reakce, kterou může být lipidová peroxidace. Mezi některé neenzymatické přírodní antioxidanty řadíme vitamín E, vitamín C, karotenoidy nebo flavonoidy (Valko a kol. 2006). Neenzymatické antioxidanty mohou být vyrobeny i uměle, do téhle skupiny antioxidantů patří propylgallát, terciální butylhydrochinon, butylovaný hydroxyanisol nebo butylhydrotoluen (Shahidi a Zhong 2010).

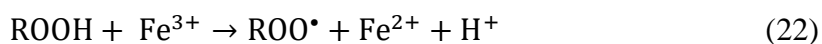
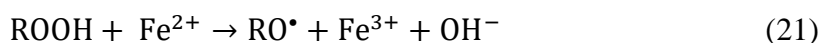
## 2.4 Produkty lipidové peroxidace

Lipidová peroxidace je řetězová reakce, při které vzniká velké množství produktů, které můžeme rozdělit na primární a sekundární.

### 2.4.1 Primární produkty lipidové peroxidace

Mezi primární produkty lipidové peroxidace patří ROOH, které vznikají během druhé fáze lipidové peroxidace a to propagace, kdy reaguje  $ROO^\bullet$  spolu s neradikálem za vzniku dalšího radikálu a právě ROOH.

Vytvořené ROOH mohou podléhat redukci a tím inhibovat poškození molekul (Ayala a kol. 2014). K rozkladu ROOH dochází pomocí dvouelektronové nebo jednoelektronové redukce. Dvouelektronovou redukcí ROOH vyvolávají enzymy peroxidázy nebo selenoprotein P (Ayala a kol. 2014). Při jednoelektronové redukcí se ROOH rozpadá na  $RO^\bullet$  (21) nebo na  $ROO^\bullet$  (22) pomocí přechodných kovů.



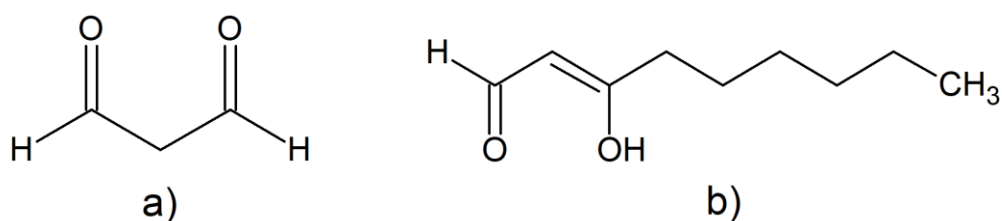
### 2.4.2 Sekundární produkty lipidové peroxidace

Při konečném kroku lipidové peroxidace vznikají sekundární produkty. Tato reakce spojena se vznikem hydroxy mastných kyselin, reaktivních karbonylových sloučenin nebo elektricky excitovaných sloučenin (Pospisil a Yamamoto 2017). Mezi nejvíce studované sekundární produkty patří aldehydy, jako je hexanal,

malondialdehyd nebo 4 – hydroxynonenal. Aldehydy jsou stabilnější, než jejich substráty a mohou snadno difundovat z místa jejich vzniku.

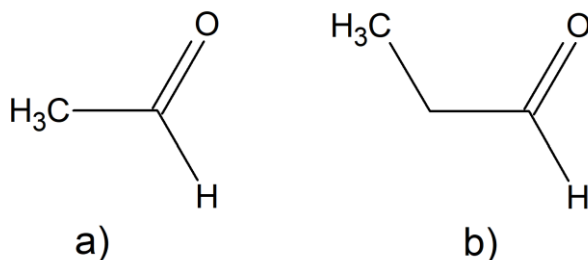
Malondialdehyd patří k mutagenním produktům lipidové peroxidace (Mukai a Goldstein 1976) a je používán jako biomarker lipidové peroxidace (Mas-Bargues a kol. 2021).

Další ze sekundárních produktů lipidové peroxidace je 4-hydroxynonenal, který je považován za velmi toxický, vyznačuje se vysokou reaktivitou, a to především s thiolovou a aminoskupinou (Schaur 2003). Jeho strukturu a strukturu malondialdehydu můžeme vidět na obrázku č. 2.



Obrázek č. 2: a) struktura malondialdehydu, b) struktura 4-hydroxynonenalu

Aldehydy s krátkým řetězcem patří také do skupiny sekundárních produktů lipidové peroxidace. Mezi aldehydy s krátkým řetězcem řadíme sloučeniny od acetaldehydu po hexanal, formaldehyd neřadíme mezi aldehydy s krátkým řetězcem, jelikož neobsahuje žádný řetězec. Strukturu acetaldehydu a propanalu můžeme vidět na obrázku č. 3.



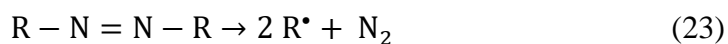
Obrázek č. 3: a) struktura acetaldehydu, b) struktura propanalu

Acetaldehyd neboli také ethanal, je vysoce toxická, mutagenní a karcinogenní sloučenina složená ze dvou uhlíků. Propanal známý také jako propionaldehyd je organická

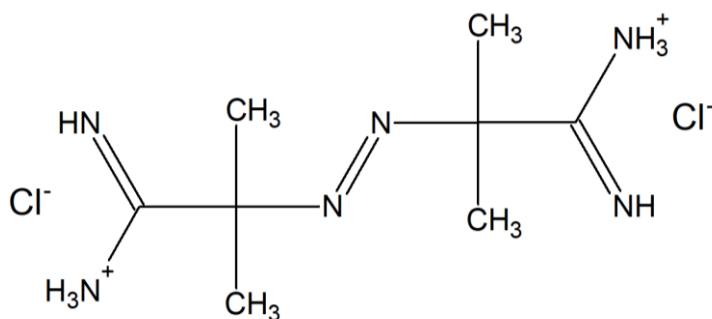
sloučenina skládající se ze třech uhlíků. Patří také mezi toxické produkty. Tyto dva aldehydy vznikají právě v nádorových buňkách během oxidace nenasycené mastné kyseliny, kterou může být kyselina linolová (Nowak a kol. 2011).

## 2.5 Azo iniciátory

Azo iniciátory jsou látky, které se používají v laboratoři při studování lipidové peroxidace. Azosloučeniny fungují, jako iniciátory pro ROS při své spontánní dekompozici při 37 °C (Peyrat-Maillard a kol. 2003). Nejprve dochází ke vzniku dvou R• a molekulárního dusíku (N<sub>2</sub>) rozpadem azo iniciátoru (23), poté R• reaguje s O<sub>2</sub>, který se vyskytuje v okolí a vzniká ROO• (24), který dále způsobuje oxidaci na lipidech za vzniku lipidového radikálu (25).



Azosloučeniny jsou chemické sloučeniny, které obsahují azo skupinu (–N = N–). Azo iniciátory obsahující tuhle skupinu můžeme dělit podle různých vlastností, nejčastěji podle toho, jestli jsou schopny se ve vodě rozpouštět, a to na hydrofilní a hydrofobní azo iniciátory. Mezi hydrofilní patří 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochlorid (AAPH) (obrázek č. 4) nebo 2,2'-azobis(2-kyanopropane) a do skupiny azo iniciátorů rozpustných v lipidech můžeme zařadit 2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitril) (Hanlon a Seybert 1997).



Obrázek č. 4: Struktura 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochlorid (AAPH)

### 3. Cíl práce

Cílem práce je stanovení aldehydů s krátkým řetězcem vzniklých při procesu lipidové peroxidace na nádorových buňkách pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

## 4. Materiál a metody

### 4.1 Seznam použitých chemikálií

- 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihydrochlorid (Sigma-Aldrich, USA),
- kyselina sírová (Lach-Ner, Česká republika),
- 2,4- dinitrofenylhydrazin (Sigma-Aldrich, USA),
- kyselina chloristá (HClO<sub>4</sub>) (Sigma-Aldrich, USA),
- hydroxid sodný (NaOH) (Lach-Ner, Česká republika),
- fosfátový pufr (PBS),
  - chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika),
  - chlorid draselný (CHEMAPOL, Česká republika),
  - hydrogenfosforečnan sodný (Lach-Ner, Česká republika),
  - dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, Česká republika),
- médium RPMI 1640 (Biosera, Francie),
- penicilin (Biosera, Francie),
- streptomycin (Biosera, Francie),
- fetální bovinní sérum (Biosera, Francie),
- trypanová modř (SigmaAldrich, USA),
- voda pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) (Sigma-Aldrich, Izrael),
- acetonitril pro HPLC (Sigma-Aldrich, Izrael),
- acetaldehyd (Sigma-Aldrich, Izrael),
- propanal (Sigma-Aldrich, Izrael).

### 4.2 Přístrojové vybavení

Laminární box s vertikálním prouděním vzduchu SCS 2-4 (Faster, Ferrata, Itálie), inkubátor CO<sub>2</sub> MITRE 4000 series (Contherm, Hutt City, Nový Zéland), stolní centrifuga Centrifuge 5430 R (Eppendorf AG, Hamburg, Německo), automatický počítáč buněk TC20 Automated Cell Counter (Bio-Rad Laboratories, California, USA), třepačka s ohřevem PSC18 (Grant Instruments, Cambs, Velká Británie), homogenizátor UP50H

(Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Německo), chromatograf Alliance e 2695 HPLC System (Waters Corporation, Milford MA, USA), detektor 2998 Photodiode Array Detector (Waters Corporation, Milford MA, USA), chromatografická kolona Symetry C18, 4,6 x 75 mm s velikostí částic 3,5  $\mu\text{m}$  (Waters Corporation, Milford MA, USA).

### 4.3 Buněčná linie U937

Pro měření byla použita buněčná linie U937, která byla poprvé izolována od 37letého pacienta z histiocytárního lymfomu v roce 1976. Buňky byly pěstovány v kultivační ládvi v inkubátoru s 5%  $\text{CO}_2$  atmosférou při teplotě 37  $^\circ\text{C}$  spolu s RPMI-1640 médiem, které obsahovalo 10% roztok fetálního bovinního séra a 1% roztok antibiotik (penicilin a streptomycin v poměru 1 : 1).

### 4.4 Určení počtu a vitality buněk

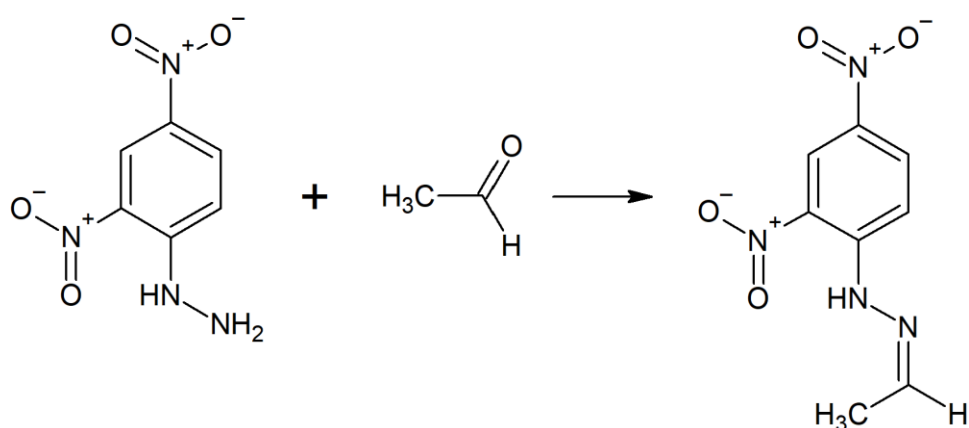
Určení počtu buněk bylo prováděno pomocí automatického počítáče buněk. Nejprve byly buňky smíchány s 0,4% trypanovou modří v poměru 2 : 1. Trypanová modř proniká do mrtvých buněk přes jejich porušenou plazmatickou membránu a obarvuje je, zatímco u živých buněk ke zbarvení nedochází. Poté byly přeneseny na počítací skličko a vloženy do počítáče buněk, tím bylo následně určeno celkové množství buněk na ml, počet živých buněk na ml a procentuální životaschopnost buněk.

Po celou dobu prováděných experimentů se z kultivační láhve v laminárním boxu odebíralo takové množství buněk, aby koncentrace byla 1 000 000 živých buněk na ml.

### 4.5 Příprava biologických vzorků na měření volných aldehydů pomocí HPLC

Příprava vzorků na izolaci aldehydů se nejprve započala odebráním buněk z kultivační láhve, následovala centrifugace buněčné suspenze při 2 460 g po dobu 10 min. Následně byl odebrán supernatant, buněčný pelet byl spolu s 200  $\mu\text{l}$  PBS centrifugován při 2 460 g po dobu 5 min. Opět byl odebrán supernatant a k peletu bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  PBS, proběhla centrifugace při 2 460 g po dobu 5 min.

Po dvojitým promytí buněk pomocí PBS byl odebrán supernatant a k peletu bylo přidáno 180  $\mu$ l HPLC vody spolu s azo iniciátorem AAPH, tak aby výsledná koncentrace byla 10 mM. Vzorky byly inkubovány při 37 °C po dobu 0, 15, 30, 45 a 60 min, aby byla sledována časová závislost tvorby aldehydů. Pro zachování přesného času působení AAPH, byla inkubace prováděna postupně a ostatní vzorky byly drženy v PBS při 37 °C. Následně byly všechny vzorky centrifugovány při 2 460 g po dobu 10 min. Bylo odebráno 125  $\mu$ l supernatantu a smícháno spolu s 1  $\mu$ l 50mM 2,4-dinitrofenylhydrazinu (DNPH) rozpuštěného v 50% kyselině sírové, který způsobí derivatizaci vzniklých aldehydů (obrázek č. 5). Poté probíhala inkubace vzorků 30 min ve tmě při pokojové teplotě, následně došlo k měření vzorků na HPLC.



Obrázek č. 5: Reakční schéma derivatizace acetaldehydu pomocí DNPH

## 4.6 Příprava biologických vzorků na měření vázaných aldehydů pomocí HPLC

Izolace vázaných aldehydů se započala stejně jako u volných aldehydů, buňky byly odebrány z kultivační lahve, následovalo dvojitým promytí buněk pomocí PBS, poté byl odebrán pelet. K peletu bylo přidáno 180  $\mu$ l HPLC vody spolu s AAPH (10 mM). Následovala inkubace vzorků na třepačce s ohřevem při 37 °C po dobu 0, 15, 30, 45 a 60 min. Poté byly vzorky centrifugovány při 2 460 g po dobu 10 min. Supernatant byl odstraněn a k peletu bylo přidáno 200  $\mu$ l HPLC vody, vzorky byly homogenizovány pomocí tyčového homogenizátoru po dobu 90 sekund. Při nízkém pH se aldehydy váží

na proteiny, proto byla poté provedena alkalická hydrolyza. Do vzorků bylo přidáno 40  $\mu\text{l}$  6M NaOH a následně byly inkubovány při 60  $^{\circ}\text{C}$  po dobu 30 min, tím došlo k uvolnění aldehydů navázaných na proteiny. Ke vzorkům bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  35%  $\text{HClO}_4$ , aby došlo k precipitaci vzniklých proteinů vlivem snížení pH. Následně byly vzorky protřepány a centrifugovány při 2 460 g po dobu 10 min. Poté bylo odebráno 125  $\mu\text{l}$  supernatantu a smícháno s 1  $\mu\text{l}$  50mM derivatizačního činidla DNPH rozpuštěného v 50% kyselině sírové. Vzorky byly inkubovány ve tmě při pokojové teplotě po dobu 30 min, následovala jejich analýza s použitím HPLC.

## 4.7 Příprava vzorků AAPH na měření aldehydů pomocí HPLC

Izolace aldehydů vytvořených z azo iniciátoru AAPH byla prováděna následovně. Nejprve bylo do mikrozkušavek přidáno 180  $\mu\text{l}$  HPLC vody spolu s AAPH, aby výsledná koncentrace byla 10mM. Vzorky byly inkubovány na třepačce s ohřevem při 37  $^{\circ}\text{C}$  po dobu 0, 15, 30, 45 a 60 min. Následně bylo odebráno 125  $\mu\text{l}$  supernatantu a smícháno s 1  $\mu\text{l}$  50mM DNPH rozpuštěného v 50% kyselině sírové. Poté byly vzorky inkubovány ve tmě při pokojové teplotě po dobu 30 min a následně změřeny pomocí HPLC.

## 4.8 HPLC analýza aldehydů

K analýze DNPH derivátů bylo využíváno HPLC s konstantní mobilní fází, která byla složena z HPLC vody a acetonitrilu v poměru 2 : 3. Izokratická separace sloučenin probíhala pomocí kolony Symetry C18 (4,6 x 75 mm, velikost částic 3,5  $\mu\text{m}$ ) s celkovým časem analýzy 15 min a nástřikový objem činil 50  $\mu\text{l}$ . Mobilní fáze protékala kolonou rychlostí 0,3 ml/min, kdy teplota kolony byla udržována na 25  $^{\circ}\text{C}$  a na vzorkách byla udržována teplota 8  $^{\circ}\text{C}$ .

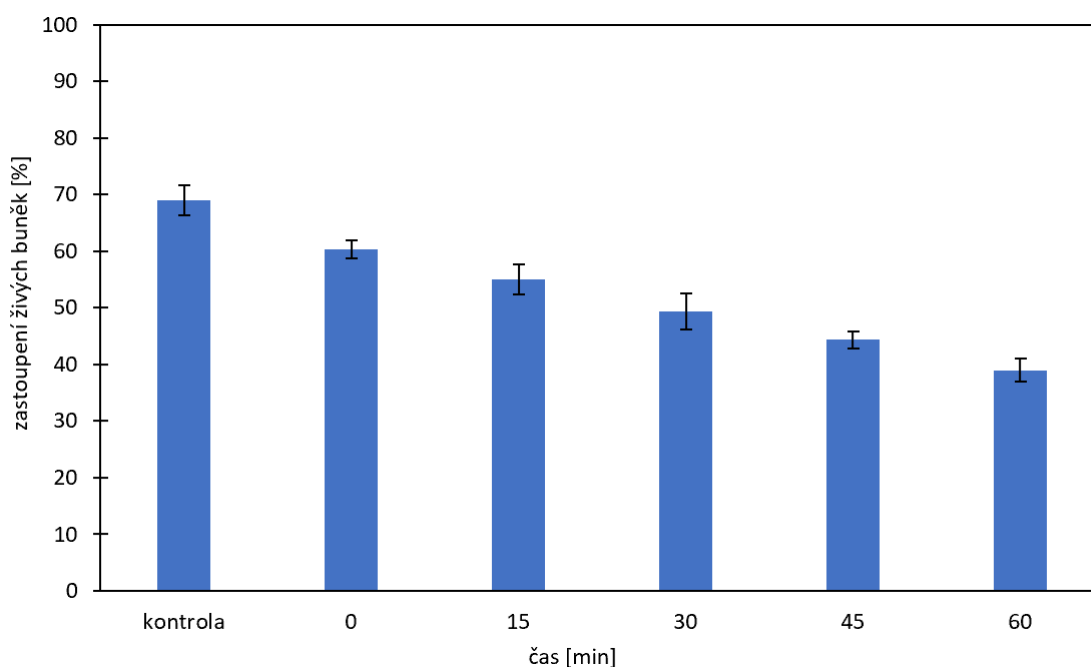
Aldehydy byly detekovány pomocí detektoru s diodovým polem (PDA) v rozsahu vlnových délek 200-400 nm. Pro vyhodnocování jednotlivých chromatogramů byla využívána vlnová délka 360 nm.



## 5. Výsledky

### 5.1 Vliv azo iniciátoru na vitalitu buněk

Bylo provedeno měření vitality buněk po dané době inkubace 10 mM AAPH. Byly připraveny vzorky o koncentraci 1 000 000 buněk/ml v RPMI-1640 médiu, kdy vzorky obsahující pouze buněčnou suspenzi sloužily jako kontrola a u dalších vzorků byla provedena inkubace s AAPH. Naměřené hodnoty byly vyneseny do grafu spolu se směrodatnými odchylkami (obrázek č. 6).

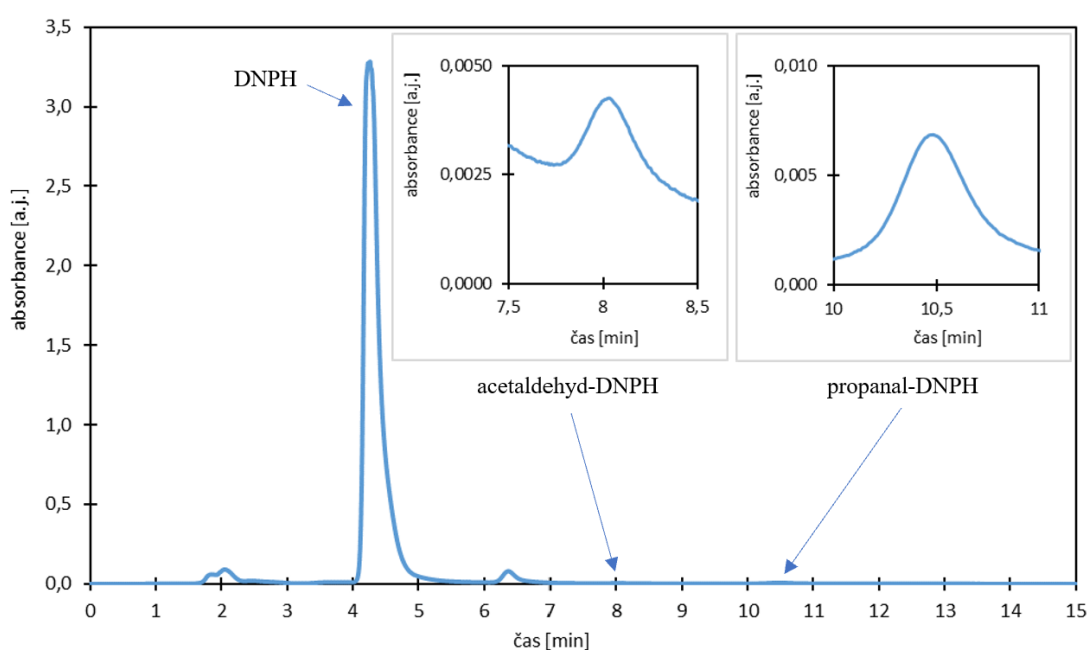


Obrázek č. 6: Graf procentuálního zastoupení živých buněk ve vzorcích, které byly inkubovány po určitou dobu s 10mM AAPH při teplotě 37 °C. Zobrazené hodnoty značí průměry ( $n=3$ ,  $\pm SD$ ).

Z obrázku č. 6 můžeme vidět, že doba inkubace AAPH má vliv na vitalitu buněk. Vitalita nádorových buněk poklesla z 69 % v kontrole na 39 % ve vzorkách s dobou inkubace AAPH 60 min.

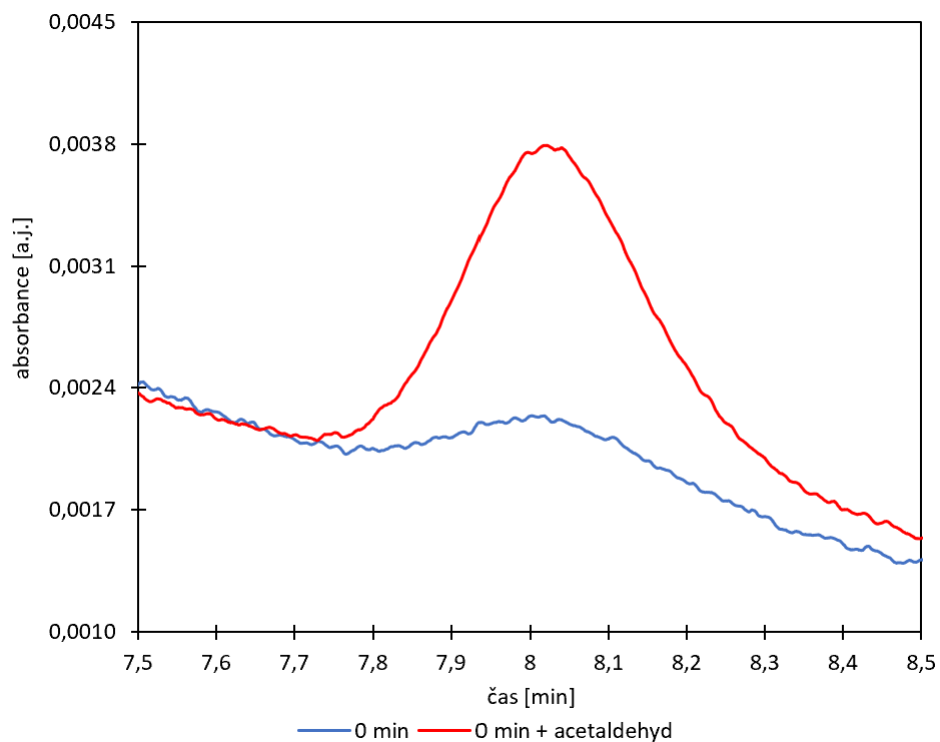
## 5.2 Tvorba aldehydů s krátkým řetězcem po aplikaci azo iniciátoru

Cílem experimentální části této bakalářské práce bylo stanovení sekundárních produktů lipidové peroxidace v nádorových buňkách. Pomocí HPLC analýzy byly ve vzorcích identifikovány dva DNPH deriváty to acetaldehyd-DNPH derivát a propanal-DNPH derivát. Na chromatogramu na obrázku č. 7 lze vidět polohu píku derivatizačního činidla DNPH a také polohy píků jednotlivých DNPH derivátů.



Obrázek č. 7: Chromatogram aldehydových sloučenin derivatizovaných pomocí DNPH v nádorových buňkách U937. Chromatogram s výřezem zobrazující acetaldehyd-DNPH derivát (retenční čas  $t = 8,03$  min) a propanal-DNPH derivát (retenční čas  $t = 10,48$  min).

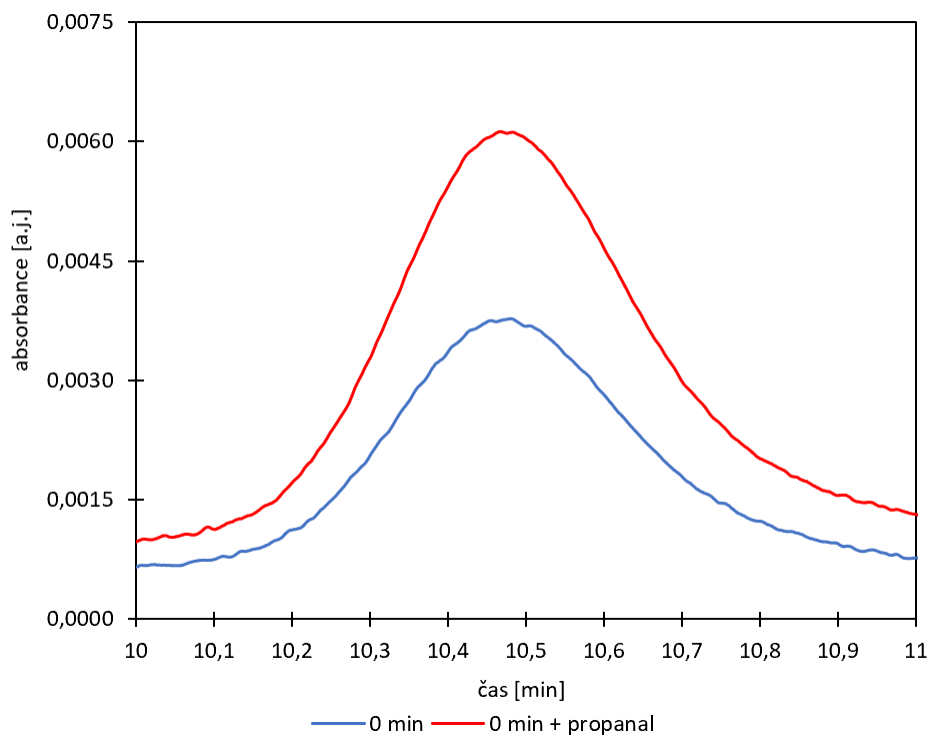
Následně bylo provedeno ověření, že se opravdu jedná o acetaldehyd-DNPH derivát pomocí metody standardního přídavku (obrázek č. 8).



Obrázek č. 8: Chromatogram pro ověření acetaldehyd-DNPH derivátu pomocí metody standardního přídatku. Vzorky byly inkubovány po dobu 0 min spolu s 10 mM AAPH při teplotě 37 °C.

Z obrázku č. 8 vidíme, že se acetaldehyd-DNPH derivát standardního přídatku vytvořil ve shodný retenční čas jako námi izolovaný acetaldehyd-DNPH derivát ze vzorků.

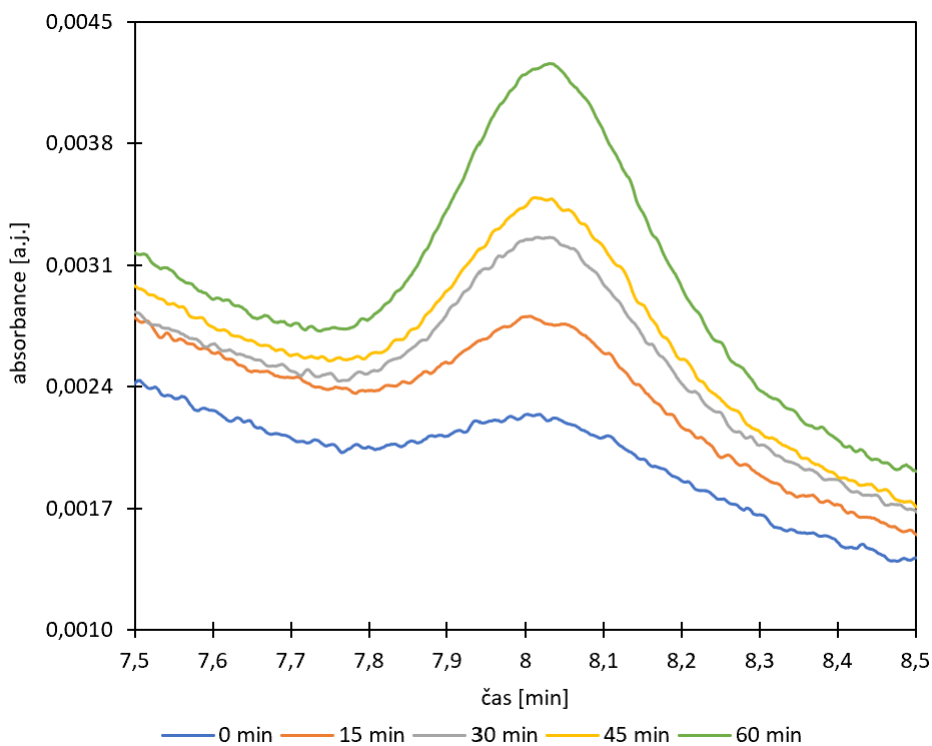
Bylo provedeno ověření i pro další sekundární produkt lipidové peroxidace propanal-DNPH derivát, také pomocí metody standardního přídatku (obrázek č. 9).



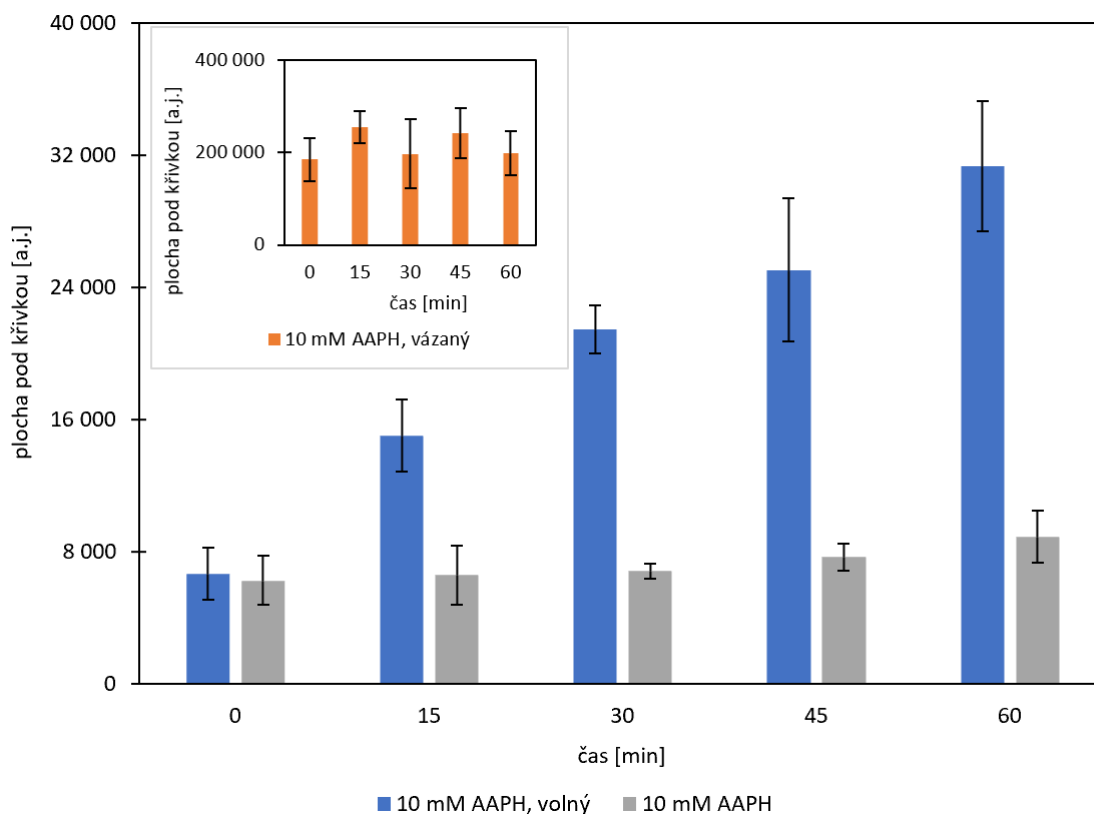
Obrázek č. 9: Chromatogram pro ověření propanal-DNPH derivátu pomocí metody standardního přídatku. Vzorky byly inkubovány po dobu 0 min spolu s 10 mM AAPH při teplotě 37 °C.

Z obrázku č. 9 můžeme vidět, že propanal-DNPH derivát pocházející ze standardního přídatku se vytvořil ve shodný retenční čas, jako námi izolovaný propanal-DNPH derivát ze vzorků.

Poté byla měřena časová závislost vlivu 10 mM AAPH na nádorové buňky s dobou inkubace 0, 15, 30, 45 a 60 min. Jako první byl sledován acetaldehyd-DNPH derivát (obrázek č. 10).



Obrázek č. 10: Chromatogram časové závislosti tvorby acetaldehyd-DNPH derivátu při působení 10 mM AAPH na nádorových buňkách. Vzorky byly inkubovány po určitou dobu spolu s 10 mM AAPH při teplotě 37 °C.



Obrázek č. 11: Graf časové závislosti tvorby volného acetaldehyd-DNPH derivátu při působení 10 mM AAPH na nádorových buňkách v porovnání s acetaldehyd-DNPH derivátem vytvořeným pouze z 10 mM AAPH bez buněk. Graf s výřezem zobrazující časovou závislost tvorby vázaného acetaldehyd-DNPH derivátu při působení 10 mM AAPH na nádorových buňkách. Zobrazené hodnoty značí průměry ( $n=4 \pm SD$ ).

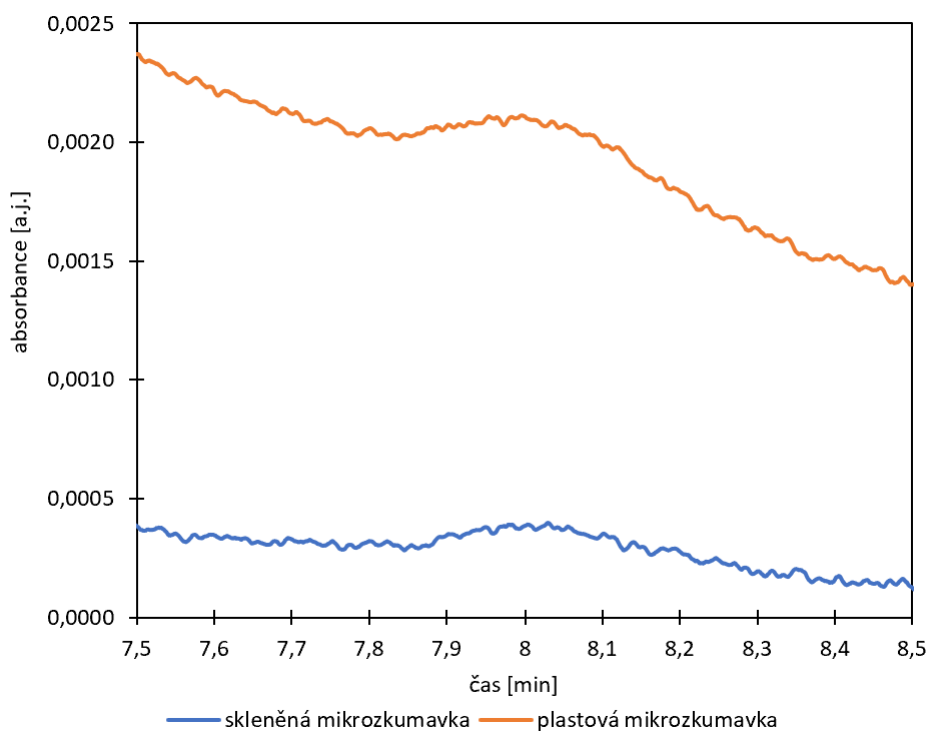
Z obrázků č. 10 a 11 můžeme vidět, že s rostoucím časem působení azo iniciátoru na vzorky s nádorovými buňkami dochází k nárůstu množství acetaldehyd-DNPH derivátu. Při působení 10 mM AAPH ve vzorcích s nádorovými buňkami po dobu 60 min se množství izolovaného acetaldehyd-DNPH derivátu zvětšilo 4,5x oproti působení 10 mM AAPH po dobu 0 min.

Také z grafu na obrázku č. 11 můžeme vidět, že při působení 10 mM AAPH v HPLC vodě bez nádorových buněk, je množství izolovaného acetaldehyd-DNPH derivátu stálé a nezávisí na délce inkubace azo iniciátoru.

Bylo stanoveno množství vázaného acetaldehyd-DNPH derivátu na proteiny v buněčných membránách. Tohle množství zůstává stabilní s rostoucí dobou inkubace 10 mM AAPH a dosahuje hodnot zhruba 6x vyšších než pro volný acetaldehyd-DNPH derivát.

Můžeme si dále povšimnout, že už i při působení 10 mM AAPH po dobu 0 minut, bylo stanoveno určité množství volného acetaldehyd-DNPH derivátu v nádorových buňkách.

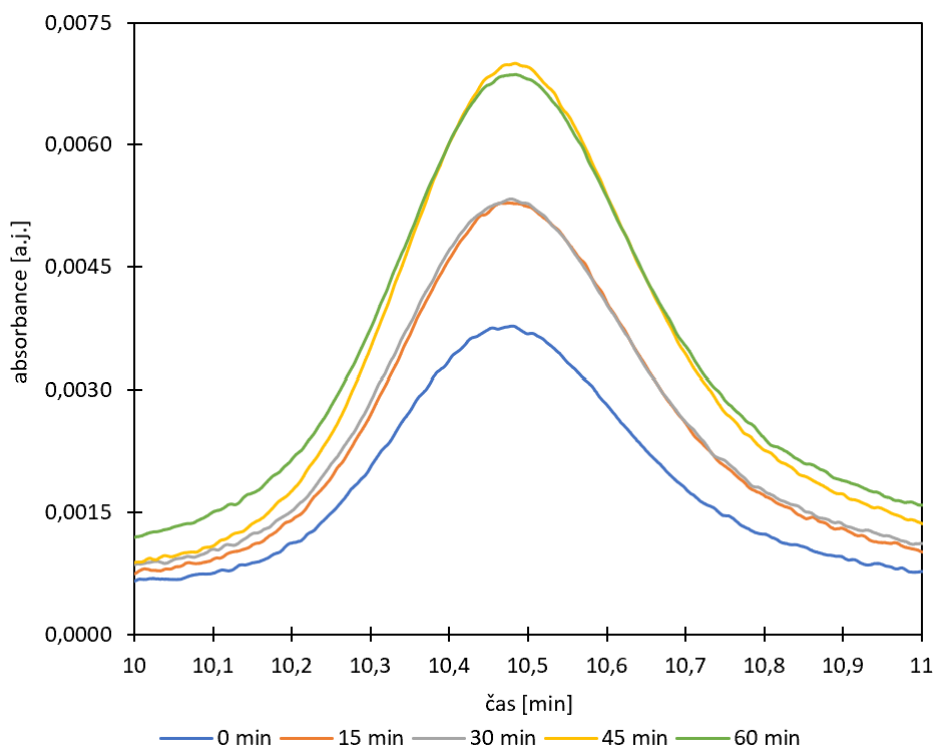
Později bylo ověřeno, že toho množství vzniká při působení derivatizačního činidla na stěny nádoby mikrozkušky z polypropylenu. Množství stanoveného acetaldehyd-DNPH derivátu vytvořeného při působení DNPH v plastové a ve skleněné mikrozkušce můžeme vidět na obrázku č. 12.



Obrázek č. 12: chromatogram zobrazující závislost tvorby acetaldehyd-DNPH derivátu při působení DNPH ve skleněné a plastové mikrozkušce.

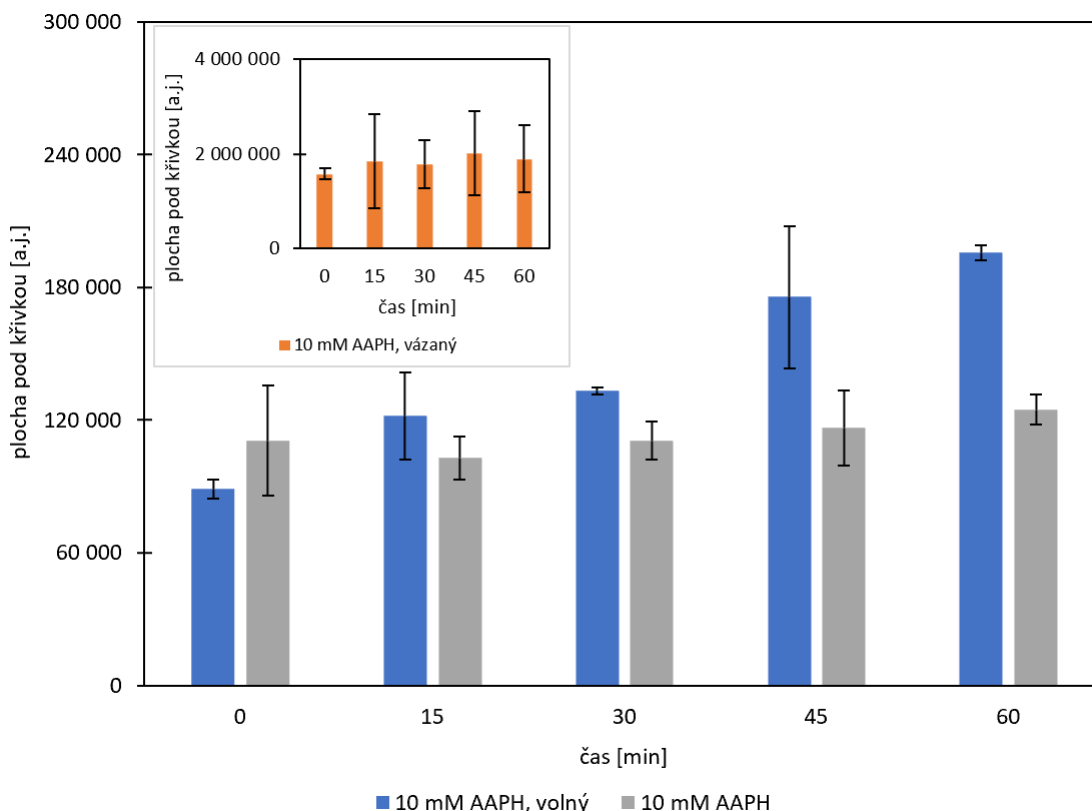
Z grafu vidíme, že při působení derivatizačního činidla ve skleněné mikrozkušce nedochází k vytvoření takového množství acetaldehyd-DNPH derivátu jako při působení DNPH v plastové mikrozkušce.

Následně byl sledován další sekundární produkt lipidové peroxidace, konkrétně propanal-DNPH derivát (obrázek č. 13).



Obrázek č. 13: Chromatogram časové závislosti tvorby propanal-DNPH derivátu při působení 10 mM AAPH na nádorových buňkách. Vzorky byly inkubovány po danou určitou dobu s AAPH při teplotě 37 °C.





Obrázek č. 14: Graf časové závislosti tvorby volného propanal-DNPH derivátu při působení 10 mM AAPH na nádorových buňkách v porovnání s propanal-DNPH derivátem vytvořeným pouze z 10 mM AAPH bez buněk. Graf s výřezem zobrazující časovou závislost tvorby vázaného propanal-DNPH derivátu při působení 10 mM AAPH na nádorových buňkách. Zobrazené hodnoty značí průměry ( $n=4$ ,  $\pm$  SD).

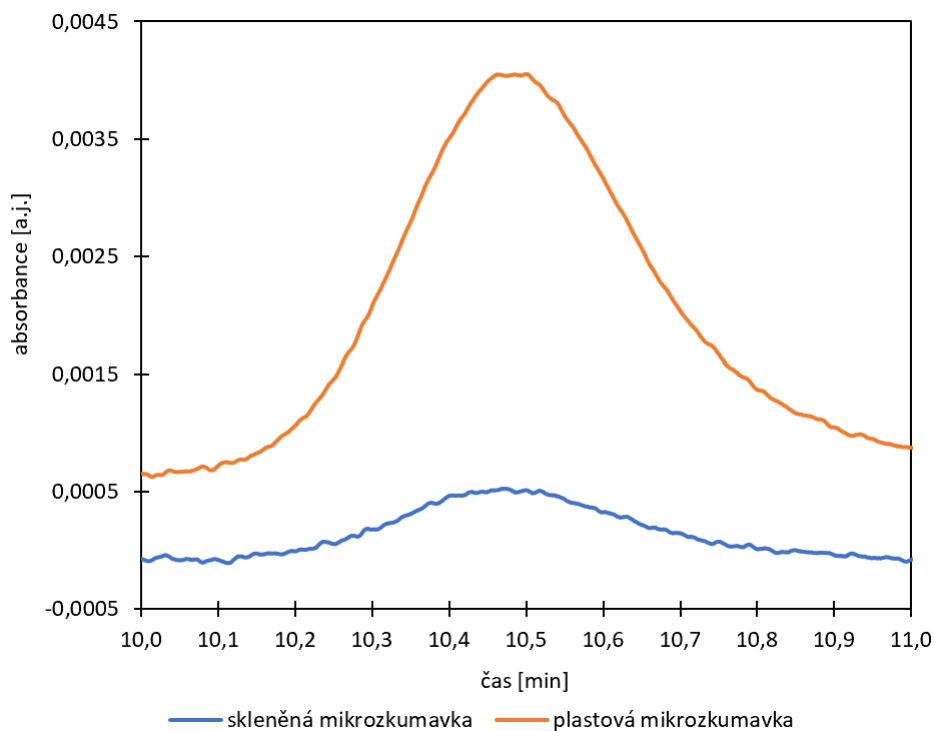
Jak můžeme z předchozích dvou obrázků č. 13 a 14 vidět, tak se vzrůstajícím časem inkubace azo iniciátoru ve vzorcích s nádorovými buňkami dochází k nárůstu množství propanal-DNPH derivátu. Při působení 10 mM AAPH ve vzorcích s nádorovými buňkami po dobu 60 min se množství stanoveného propanal-DNPH derivátu zvětšilo zhruba 2x oproti působení 10 mM AAPH po dobu 0 min.

Také z grafu na obrázku č. 14 můžeme vidět, že při působení 10 mM AAPH v chemickém systému bez nádorových buněk, bylo stanovené množství izolovaného propanal-DNPH derivátu po celou dobu stále a nezávisí na délce inkubace azo iniciátoru.

Bylo stanoveno množství vázaného propanal-DNPH derivátu na proteiny v buněčných membránách. Tohle množství zůstává stabilní s rostoucí dobou inkubace 10 mM AAPH a dosahuje nejvyšších naměřených hodnot pro propanal-DNPH derivát.

Můžeme si dále povšimnout, že už i při působení 10 mM AAPH po dobu 0 minut, bylo stanoveno určité množství volného propanal-DNPH derivátu v nádorových buňkách.

Dále bylo ověřeno, že toho množství vzniká při působení derivatizačního činidla na stěny nádoby mikrozkuhavky z polypropylenu. Množství propanal-DNPH derivátu vytvořeného při působení DNPH v plastové a ve skleněné mikrozkuhavce můžeme vidět na následujícím obrázku č. 15.



Obrázek č. 15: Chromatogram zobrazující závislost tvorby propanal-DNPH derivátu při působení DNPH ve skleněné a plastové mikrozkuhavce.

Z chromatogramu č. 15 vidíme, že při působení derivatizačního činidla ve skleněné mikrozkuhavce dochází k vytvoření mnohonásobně menšího množství propanal-DNPH derivátu než při působení DNPH v plastové mikrozkuhavce.

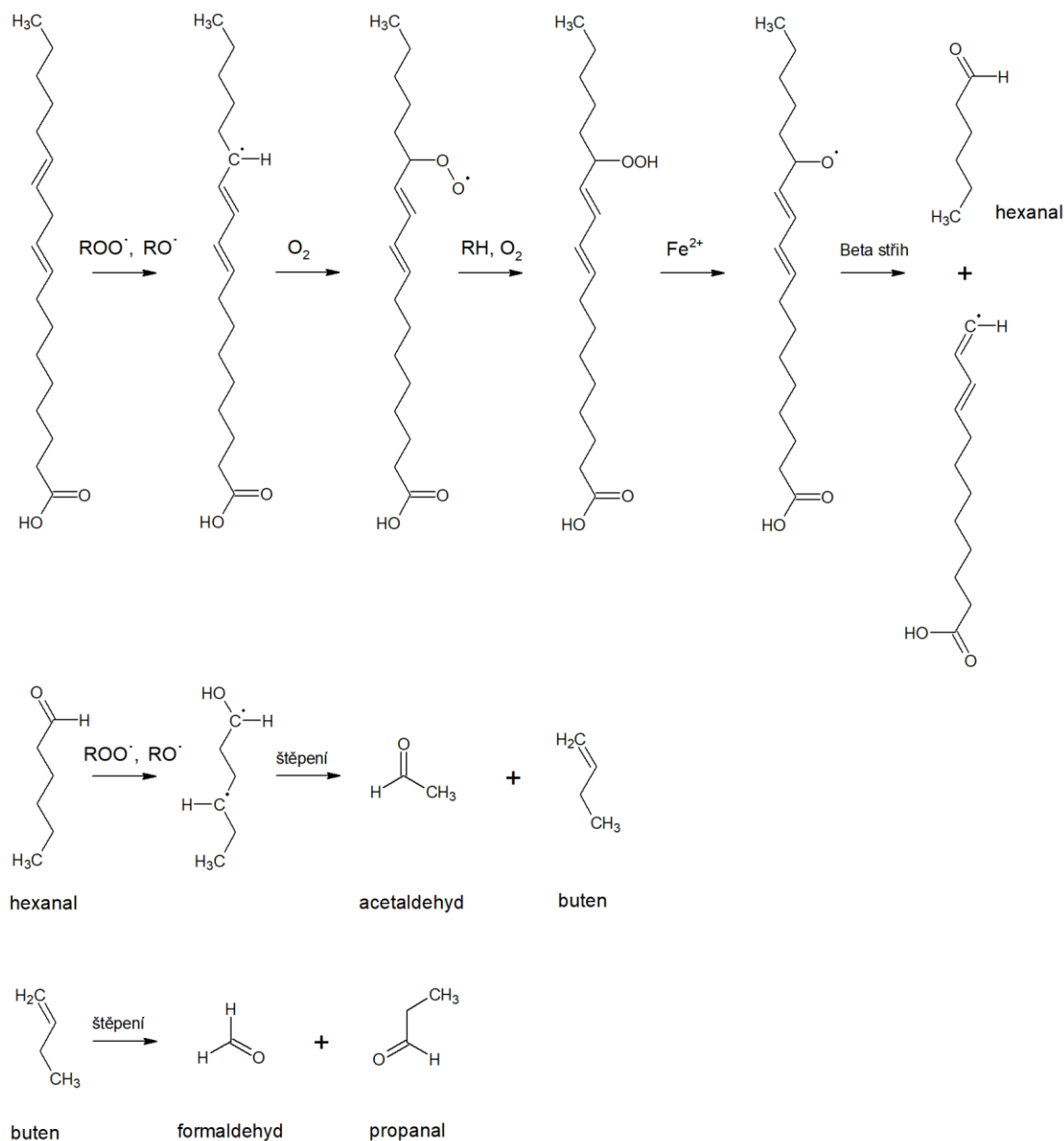
## 6. Diskuze

Lidová peroxidace je řetězová reakce, která se se zájmem studuje už od poloviny minulého století, aldehydy jakožto sekundární produkty lipidové peroxidace se pak studují již od 80.let minulého století. Tato bakalářská práce se zaměřuje na stanovení aldehydů s krátkým řetězcem vytvořených během procesu lipidové peroxidace v nádorových buňkách U937. Jako iniciátor lipidové peroxidace byl použit azo iniciátor AAPH. K detekci sekundárních produktů byla využívána HPLC analýza, pomocí které byly detekovány aldehydy s krátkým řetězcem, a to konkrétně acetaldehyd-DNPH derivát a propanal-DNPH derivát. Tyto aldehydy byly vytvořeny během oxidace mastné kyseliny, která obsahovala dvě a více dvojných vazem. Nejprve došlo k iniciaci reakce za pomoci  $ROO^\bullet$  nebo  $RO^\bullet$  vytvořeného rozpadem AAPH spolu s nenasycenou mastnou kyselinou linolovou, byl vytvořen uhlíkový radikál na kyselině linolové. Ten dále reagoval s  $O_2$  za vzniku  $ROO^\bullet$ . Během procesu propagace byl  $ROO^\bullet$  vytrhnout vodík z RH za vzniku ROOH. Hydroperoxid kyseliny linolové reagoval s  $Fe^{2+}$  za vzniku  $RO^\bullet$  na kyselině linolové. Z  $RO^\bullet$  kyseliny linolové byl beta stříhem vytvořen hexanal (Girotti 1998) a druhým fragmentem byla kyselina s uhlíkovým radikálem, která dále mohla podléhat řetězové reakci. Vzniklý hexanal byl poté rozštěpen na acetaldehyd a buten v přítomnosti radikálu. Štěpení aldehydu na aldehyd s kratším řetězcem a alken popsali již (Norrish a Bamford 1936)). Buten byl poté štěpen na formaldehyd a propanal (Gonzalez-De-Castro a Xiao 2015). Schéma tvorby aldehydů s krátkým řetězcem detekovaných v této bakalářské práci je zobrazeno na obrázku č. 16.

U obou stanovených aldehydů v nádorových buňkách docházelo k nárůstu jejich množství s rostoucím časem inkubace AAPH. Měřením kontrolní hodnoty 0 min působení AAPH byla stanovena jistá hladina aldehydů. Tohle množství aldehydů pochází z reakce derivatizačního činidla se stěnou plastové mikrozkušavky. Kdy derivatizační činidlo je rozpuštěno v kyselině sírové, která může mít vliv právě na plastovou mikrozkušavku. Měřili jsme i množství aldehydů, když derivatizační činidlo působí ve skle, ale naměřené množství nedosahovalo takových hodnot jako v plastu.

Měřením vitality vzorků s různou dobou působení AAPH bylo ukázáno, jaký vliv má AAPH na nádorové buňky. Bylo očekáváno, že s rostoucí dobou působení AAPH vitalita nádorových buněk bude klesat, jelikož AAPH pracuje jako iniciátor lipidové

peroxidace, při které dochází k oxidaci BH a tím k jejich následnému narušení. Měření potvrdilo vliv AAPH na vitalitu buněk. Vliv AAPH na vitalitu buněk popisovala i studie (Firth a kol. 2007), která uvádí že při použití 10mM AAPH a inkubaci 12 hodin dojde k poklesu vitality až o 50 %.



Obrázek č. 16: Schéma tvorby aldehydů s krátkým řetězcem z kyseliny linolové

## 7. Závěr

Teoretická část předkládané bakalářské práce byla zaměřena na téma reaktivních forem kyslíku, lipidové peroxidace a její sekundární produkty a poté na iniciaci lipidové peroxidace pomocí azo iniciátorů.

Cílem experimentální části bakalářské práce bylo stanovení sekundárních produktů lipidové peroxidace v nádorových buňkách iniciované pomocí azo iniciátoru AAPH. Byla použita buněčná linie U937, u které byl studován vliv působení AAPH na vitalitu těchto buněk. S rostoucí dobou inkubace azo iniciátoru vitalita buněk klesala. Sekundární produkty lipidové peroxidace byly izolovány z nádorových buněk, derivatizovány pomocí derivatizačního činidla DNPH a analyzovány pomocí metody HLPC. Pomocí chromatografické analýzy byly stanoveny dva sekundární produkty lipidové peroxidace: acetaldehyd-DNPH derivát a propanal-DNPH derivát. Použitím metody standardního přídatku bylo ověřeno, že se opravdu jedná o tyto aldehydy s krátkým řetězcem. Byla sledována časová závislost tvorby těchto dvou sekundárních produktů lipidové peroxidace při působení AAPH po dobu 0, 15, 30, 45 a 60 min. U acetaldehyd-DNPH derivátu byla zaznamenaná hodnota při působení AAPH po dobu 60 min 4,5x větší než hodnota kontrolní a u propanal-DNPH derivátu došlo k nárůstu 2x, ale u chemického systému bylo množství stanovených sekundárních produktů konstantní po celou dobu inkubace AAPH. Acetaldehyd-DNPH deriváty a propanal-DNPH deriváty je možno považovat za spolehlivé markery lipidové peroxidace iniciované pomocí AAPH v nádorových buňkách U937.

## 8. Seznam literatury

- Adam W, Kazakov DV, Kazakov VP. 2005. Singlet-oxygen chemiluminescence in peroxide reactions. *Chemical Reviews*. 105(9):3371-3387.
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. 2014. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014:1-31.
- Bielski BHJ, Cabelli DE, Arudi RL, Ross AB. 1985. Reactivity of  $^{\bullet}O_2$  radicals in aqueous-solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*. 14(4):1041-1100.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*. 5:9-19.
- Blokhina O, Fagerstedt KV. 2010. Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. *Plant Physiol Biochem*. 48(5):359-373.
- Cahill AE, Taube H. 1952. The use of heavy oxygen in the study of reactions of hydrogen peroxide. *Journal of the American Chemical Society*. 74(9):2312-2318.
- Firth CA, Yang Y-T, Giese SP. 2007. Lipid oxidation predominates over protein hydroperoxide formation in human monocyte-derived macrophages exposed to aqueous peroxyl radicals. *Free Radical Research*. 41(7):839-848.
- Gao H-M, Zhou H, Hong J-S. 2012. NADPH oxidases: Novel therapeutic targets for neurodegenerative diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*. 33(6):295-303.
- Girotti AW. 1998. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipid Research*. 39(8):1529-1542.
- Gonzalez-De-Castro A, Xiao J. 2015. Green and efficient: Iron-catalyzed selective oxidation of olefins to carbonyls with  $O_2$ . *Journal of the American Chemical Society*. 137(25):8206-8218.
- Hanlon MC, Seybert DW. 1997. The pH dependence of lipid peroxidation using water-soluble azo initiators. *Free Radical Biology and Medicine*. 23(5):712-719.
- Kang HW, Yu KW, Jun WJ, Chang IS, Han SB, Kim HY, Cho HY. 2002. Isolation and characterization of alkyl peroxy radical scavenging compound from leaves of *Laurus nobilis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 25(1):102-108.
- Kohen R, Nyska A. 2002. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*. 30(6):620-650.
- Mas-Bargues C, Escrivá C, Dromant M, Borrás C, Vina J. 2021. Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. Human plasma reference values in health and disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 709.
- Mates JM, Perez-Gomez C, De Castro IN. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*. 32(8):595-603.
- Metodiewa D, Kośka C. 1999. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species: Relevance to cyto(neuro)toxic events and neurologic disorders. An overview. *Neurotoxicity Research*. 1(3):197-233.
- Mukai FH, Goldstein BD. 1976. Mutagenicity of malonaldehyde, a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty-acids. *Science*. 191(4229):868-869.
- Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C, Salvayre R. 2008. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *British Journal of Pharmacology*. 153(1):6-20.
- Nimse SB, Pal D. 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*. 5(35):27986-28006.
- Norrish RGW, Bamford CH. 1936. Photodecomposition of aldehydes and ketones. *Nature*. 138(3502):1016-1016.

- Nowak M, Tardivel S, Sayegrih K, Robert V, Abreu S, Chaminade P, Vicca S, Grynberg A, Lacour B. 2011. Impact of polyunsaturated fatty acids on oxidized low density lipoprotein-induced u937 cell apoptosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 18(6):494-503.
- Peyrat-Maillard MN, Cuvelier ME, Berset C. 2003. Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (aaph)-induced oxidation: Synergistic and antagonistic effects. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 80(10):1007.
- Pospisil P, Yamamoto Y. 2017. Damage to photosystem ii by lipid peroxidation products. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*. 1861(2):457-466.
- Pospíšil P, Prasad A, Rác M. 2019. Mechanism of the formation of electronically excited species by oxidative metabolic processes: Role of reactive oxygen species. *Biomolecules*. 9(7):258.
- Russell GA. 1957. Deuterium-isotope effects in the autoxidation of aralkyl hydrocarbons. Mechanism of the interaction of peroxy radicals<sup>1</sup>. *Journal of the American Chemical Society*. 79(14):3871-3877.
- 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(3):e0116958.
- Schaur RJ. 2003. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Molecular Aspects of Medicine*. 24(4-5):149-159.
- Shahidi F, Zhong Y. 2010. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 112(9):930-940.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 160(1):1-40.
- Yin H, Xu L, Porter NA. 2011. Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*. 111(10):5944-5972.
- Young IS, Woodside JV. 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*. 54(3):176-186.