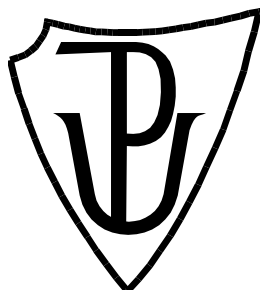


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Tvorba organických radikálů rozpadem
organických hydroperoxidů**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Pavel Poláček
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Pavel Pospíšil, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2017

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

V Olomouci dne.....

Podpis.....

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl velice poděkovat vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Pavlu Pospíšilovi, Ph.D. za odborné rady, cenné připomínky, poskytnuté materiály a trpělivost. Mé poděkování patří rovněž Mgr. Marku Rácovi, Ph.D. a Adityovi Kumarovi, M. Sc. za odborné vedení a přátelský přístup při vypracování praktické části této diplomové práce. Dále děkuji všem členům kolektivu Technologického centra Centrum regionu Haná, kteří mi byli vždy ochotni poradit. Jmenovitě pak především Mgr. Tiboru Stolárikovi. Děkuji za možnost uskutečnit tuto diplomovou práci v rámci projektu (IGA_PrF_2017_017). V neposlední řadě děkuji své rodině, přátelům a přítelkyni Zdence Směšné za podporu při studiu a pomoc v každodenním životě.

OBSAH

Bibliografické informace	6
Bibliographic information	7
Cíle práce	8
Úvod	9
Teoretická část	10
1. Reaktivní formy kyslíku	11
1.1 Definice a rozdělení ROS	12
1.2 Tvorba ROS	12
1.3 Eliminace ROS v buňkách	14
1.4 Oxidativní stres	16
1.5 Organické radikály	16
<i>1.5.1 Proteinové hydroperoxydy</i>	<i>17</i>
<i>1.5.2 Lipidové hydroperoxydy</i>	<i>19</i>
<i>1.5.2.1 Detekce hydroperoxidů a peroxidů v lipidech</i>	<i>21</i>
<i>1.5.3 Peroxylové a alkoxylové radikály</i>	<i>22</i>
<i>1.5.3.1 Detekce a důkazy tvorby peroxylových a alkoxylových radikálů</i>	<i>23</i>
1.6 Elektronová paramagnetická rezonanční spektroskopie	24
<i>1.6.1 Princip EPR</i>	<i>24</i>
<i>1.6.2 EPR spin-trapová metoda</i>	<i>26</i>
<i>1.6.2.1 Detekce radikálů pomocí EPR spin-trapové metody</i>	<i>26</i>
1.7 Imuno spin-trapping	28

Praktická část	31
2. Materiál a metody	32
2.1 Chemikálie	32
2.2 Přístrojové vybavení	32
2.3 Příprava proteinových hydroperoxidů	32
2.4 Příprava reagentů pro FOX test	33
2.5 Měření na EPR spektrometru	33
2.6 Příprava reagentů pro imuno spin-trapping	33
3. Výsledky	35
3.1 Detekce singletního kyslíku a hydroxylového radikálu	35
3.2 Detekce albuminových hydroperoxidů pomocí metody FOX test	39
3.3 Imuno spin-trapping organických radikálů s vycytávačem spinů DMPO	42
4. Diskuze	44
5. Závěr	46
6. Seznam použitých zkratk	47
7. Seznam použité literatury	48

Bibliografické informace:

Jméno a příjmení autora:	Bc. Pavel Poláček
Název práce:	Tvorba organických radikálů rozpadem organických hydroperoxidů
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Oddělení biofyziky, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Pavel Pospíšil, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2017
Abstrakt:	Diplomová práce se zaměřuje na tvorbu organických radikálů vzniklých rozpadem z albuminových hydroperoxidů (ROOH). Teoretická část diplomové práce shrnuje dosavadní poznatky o reaktivních formách kyslíku (ROS) (tvorba, eliminace a oxidace biomolekul), oxidativním stresu a tvorbě organických radikálů (proteinové, lipidové hydroperoxydy, peroxylové a alkoxylové radikály). Experimentální část se zabývá tvorbou albuminových ROOH a jejich detekci pomocí FOX testu. Následně detekcí organických radikálů pomocí elektronové paramagnetické rezonanční spektroskopie a imuno spin-trappingu.
Klíčová slova:	Volné kyslíkové radikály, lipidové a proteinové hydroperoxydy, peroxid vodíku, oxidační stres, peroxylové a alkoxylové radikály, katalasa, EPR spektrometrie, imuno spin-trapping, FOX test.
Počet stran:	61
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Bibliographic information:

Autor's name: **Bc. Pavel Poláček**

Title: Formation of organic radicals by the decomposition of organic hydroperoxides

Type of thesis: Masters

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

Supervisor: **doc. RNDr. Pavel Pospíšil, Ph.D.**

The year of presentation: 2017

Abstract: In this thesis we focused on the formation of organic radicals by the decomposition of albumin hydroperoxides (ROOH). The theoretical part of this Masters thesis summarizes the current knowledge about reactive forms of oxygen (ROS) (formation, elimination and biomolecule oxidation), oxidative stress and formation of organic radicals (protein and lipid hydroperoxides, peroxy and alkoxy radicals). Experimental part deals with the formation of albumin ROOH and their detection by FOX assay. Then detection of organic radicals by electron paramagnetic resonance spectroscopy and immuno spin-trapping.

Keywords: Free oxygen radicals, lipid and protein hydroperoxides, hydrogen peroxide, oxidative stress, peroxy and alkoxy radicals, catalase, EPR spectrometry, immuno spin-trapping, FOX assay.

Number of pages: 61

Number of appendices: 0

Language: Czech

Cíle práce:

- Vypracování literární rešerše na problematiku tvorby organických radikálů rozpadem organických hydroperoxidů.
- Seznámení se s detekcí organických radikálů za pomoci elektronové paramagnetické rezonanční spektroskopie a stanovení organických hydroperoxidů za pomoci FOX test.

Úvod

Mezi reaktivní formy kyslíku (zkráceně ROS) patří volné radikály, které jsou vysoce reaktivní sloučeniny s krátkou dobou života. Reaktivita volných radikálů souvisí s existencí nepárového elektronu ve vnější části elektronového obalu molekuly, který poskytuje volnému radikálu značnou reaktivitu (Valko a kol., 2004). Nejjednodušším volným radikálem je atom vodíku (H), který obsahuje jen jeden elektron a to nepárový. Některé volné radikály mohou také obsahovat i jiné atomy např. atom kyslíku (O). Volné radikály jsou velmi reaktivní, nestálé sloučeniny, které napadají v buňkách organismu vše, co je biologické stavby (lipidy, proteiny a nukleové kyseliny). Mohou měnit jejich strukturu a poškodit je do takové míry, kdy buněčné části nemohou správně biologicky fungovat.

Reaktivní formy kyslíku vznikají přirozeně při některých chemických reakcích, plní mnohé důležité funkce (likvidace fagocytovaného materiálu v granulocytech, průnik spermie do vajíčka apod.) a působí při buněčné smrti (apoptóza). Jejich tvorba je v rovnováze s antioxidantními mechanismy, které mají ochranný vliv. Narušení této rovnováhy ve prospěch volných radikálů vede k tzv. oxidativnímu stresu.

Cílem mé diplomové práce je studium a detekce rozpadu organických hydroperoxidů na organické radikály. Pro jejich detekci byl použit FOX test a pro detekci radikálů bylo použito EPR spin-trapové metody a imuno spin-trappingu. Obě metody mají hlavní použití v detekci volných radikálů, ale musíme použít tzv. vychytávače spinů (spin-trapy), které jsou schopné převést volné radikály na adukty vychytávačů spinů s delší dobou života a tím je možné je detekovat. Pomocí metody EPR spin-trapové metody se detekují paramagnetické radikály a pomocí imuno spin-trappingu neparagnetické nitronové adukty.

Teoretická část

1. Reaktivní formy kyslíku

Vznikají při chemických reakcích (např. autooxidace) a často záměrně (neutrofilie nebo syntasa oxidu dusnatého), například mitochondrie produkují superoxidový aniontový radikál ($O_2^{\bullet-}$), který je ve větším množství nebezpečný pro buňku, a proto musí být odstraňován enzymem superoxid dismutasou obsahující mangan (MnSOD), jinak by docházelo k poškození u eukaryotických organismů (McCord a Fridovich, 1969). Časem byly objeveny další antioxidanty, které působí proti volným radikálům (kapitola **1.3 Eliminace ROS v buňkách**).

Reaktivní formy kyslíku jsou všude na Zemi, v živočiších, rostlinách a v aerobních bakteriích, kde se vyskytují v množství, které přirozené regulační mechanismy dokáží neutralizovat (Pokorný, 2005). Jsou důležitou součástí obrany buňky proti infekci, buněčné signalizace, apoptózy a stárnutí buněk (Hawkins, 2001; Halliwell a Gutteridge, 2007; Halliwell, 2011; Tulah, 2013; Kroeller-Schoen a kol., 2014), dále pak jsou důležité také v procesu dozrávání spermií, kdy hladina ROS může ovlivnit interakci spermie a vajíčka (Buonocore a kol., 2010). Bohužel ROS mohou být také nebezpečné při vysoké koncentraci v buňce, kdy mohou poškodit proteiny, lipidy, nukleové kyseliny a buněčné struktury. Například v DNA poškozují purinové a pyrimidinové báze, kde způsobují dvouřetězcové zlomy a cross-link DNA. Tato poškození mohou být příčinou mutagenese, karcinogeneze, procesu stárnutí, nemocí souvisejících s věkem (Dai a kol., 2009; Harman, 2009) a neurodegenerativních nemocí (Parkinson a Alzheimer) (Ames, 1983; Halliwell, 2006; Finch, 2007; Halliwell a Gutteridge, 2007; Halliwell, 2007).

Nejdůležitějším zdrojem ROS pro člověka je pravděpodobně imunitní systém (Halliwell a Gutteridge, 2007; Lambeth, 2007). Reaktivní formy kyslíku pomáhají imunitnímu systému zabíjet infekční organismy rychlou a silnou odpovědí, tím nás chrání před infekcemi. Patogeny dokážou reagovat na určitou hladinu ROS v organismu zvýšením obranného antioxidantního systému, který zpomaluje fyziologickou odpověď imunitního systému. Hladina ROS v organismu se proto mění a její vyšší hodnota je pro patogeny velký problém, protože samy nestíhají včas zareagovat a jsou pak posléze postupně zlikvidovány (Halliwell a Gutteridge, 2007; Imlay, 2008). Jakmile je hrozba patogenů odstraněna, hladina ROS se v buňce po imunitní reakci postupně snižuje (Morgenstern, 1997; Halliwell, 2006; Hultqvist a kol., 2009).

Lidské tělo reguluje ROS/antioxidativní rovnováhu velmi opatrně, aby se hladina antioxidantů a oxidativního poškození příliš neměnila (Halliwell, 1999; Halliwell, 2000).

1.1 Definice a dělení ROS

Reaktivní formy kyslíku můžeme definovat jako chemické látky obsahující atom či molekulu kyslíku a jsou děleny na dva druhy: radikálové ROS a neradikálové ROS. Nejčastěji jsou ROS v literatuře nazývané jako „volné kyslíkové radikály“. Termín ROS je zkratka převzatá z angličtiny: „Reactive oxygen species“.

První skupina radikálových ROS obsahuje $O_2^{\bullet-}$, oxid dusnatý, hydroxylový radikál (HO^{\bullet}) a hydroperoxylový radikál (HO_2^{\bullet}). Radikálová skupina ROS je považována za více reaktivní, protože obsahuje vždy jeden či více nepárových elektronů ve vnější vrstvě molekulového orbitalu a má vysoce pozitivní redoxní potenciál (Halliwell a Gutteridge, 2007). Radikály jsou schopné oxidovat biomolekuly (lipidy, proteiny a nukleové kyseliny) v buňkách a vytvořit posléze organické radikály (např. peroxylové (ROO^{\bullet}) a alkoxylové (RO^{\bullet}) radikály) (Gutteridge a Halliwell, 2000; Halliwell a Gutteridge, 2007).

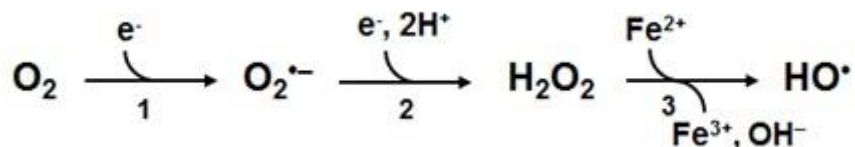
Druhá skupina neradikálových ROS zahrnuje peroxid vodíku (H_2O_2), peroxytriat, hydroxid, singletní kyslík (1O_2) a kyselinu chlornou. Tyto neradikály, jak je také můžeme nazvat, neobsahují nepárový elektron, ale mohou být chemicky reaktivní a vytvořit radikály za určitých podmínek.

1.2 Tvorba ROS

Tvorba ROS je součástí redoxních procesů (např. buněčné dýchání v mitochondriích, oxidativní vzplanutí), ale také interakce buněk s vnějšími (exogenními) a vnitřními (endogenními) zdroji. Mezi exogenní zdroje ROS patří fyzikální zdroje (γ , UV a viditelné záření) nebo chemické zdroje (xenobiotika) (von Sonntag, 1987; Halliwell a Gutteridge, 1989). Endogenní zdroje ROS zahrnují autooxidaci, mitochondriální elektronový transportní řetězec, fagocytární reakce, reakce cytochromu P450 a další.

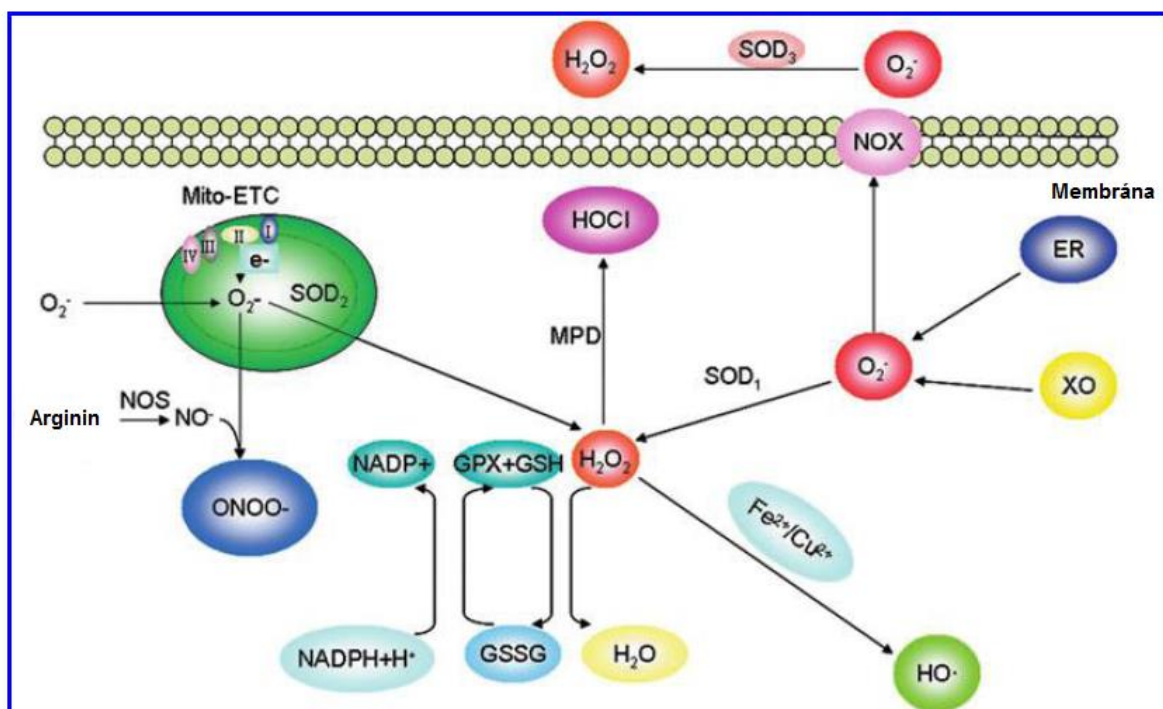
Reaktivní formy kyslíku se vytváří při přenosu excitační energie nebo elektronu. Přenos excitační energie nastává při přenosu energie z tripletního chromoforu na O_2 za vzniku singletního kyslíku (1O_2) (Halliwell a Gutteridge, 2007). Při přenosu elektronu dochází k redukci O_2 za vzniku superoxidového aniontového radikálu ($O_2^{\bullet-}$) (Obrázek 1, reakce 1) katalyzovaná několika typy membránových nebo cytoplasmatických enzymů. Redukce je uskutečněna za pomoci komplexu I a komplexu III v mitochondrii katalyzované NADPH oxidasou. Superoxidový aniontový radikál může dismutovat na peroxid vodíku (H_2O_2) spontánně (Obrázek 1, reakce 2) nebo pomocí enzymu superoxid dismutasa (SOD). Dále

pak pomocí katalasy nebo peroxidasy se H_2O_2 redukuje na H_2O a O_2 . Za přítomnosti iontů kovu (Fe^{2+} a Cu^{2+}) dochází k tvorbě HO^\bullet (Obrázek 1, reakce 3) prostřednictvím Fentonovy nebo Haber-Weissovy reakce (Kyaw a kol., 2004). Peroxid vodíku se také dokáže sám rozložit pomalou samovolnou disociací, tato metoda se používá k laboratorní přípravě O_2 .



Obrázek č. 1. Stručný popis redukce O_2 , superoxidového radikálu a redukce H_2O_2 . Převzato a modifikováno od Pospíšil a kol. (2013).

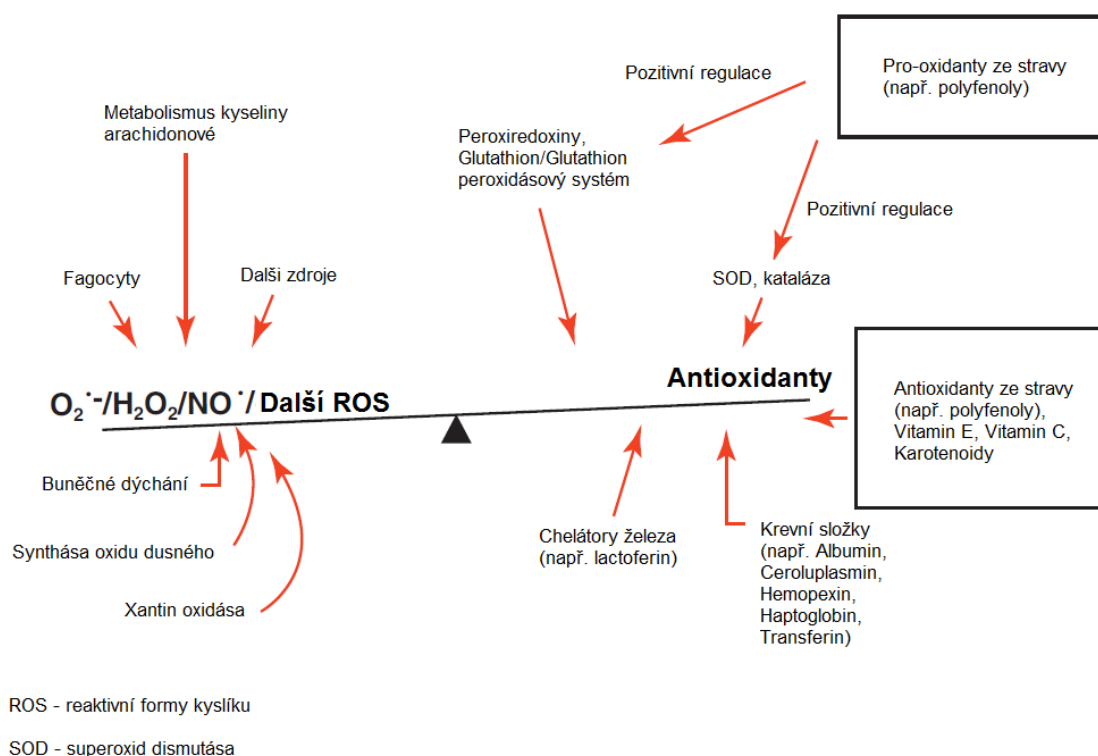
Ve většině případů mají radikály krátkou dobu života, protože velmi rychle reagují s biomolekulami za vzniku dalších radikálů (Hawkins and Davies, 2001). Přehled několika reakcí ROS s buněčnými komponentami je znázorněno na Obrázku 2.



Obrázek č. 2: Buňky udržují redoxní homeostázu mezi vznikem a eliminací ROS pomocí jednotlivých reakcí na obrázku 1. Převzato a modifikováno od Shi a kol. (2012).

1.3 Eliminace ROS v buňkách

Hladina ROS v buňkách je udržována na nízké úrovni pomocí antioxidantních systémů, které eliminuje ROS, a tak chrání biomolekuly před škodlivým účinkem ROS. Antioxidanční systém můžeme rozdělit na neenzymatický a enzymatický. Toto rozdělení představuje většinu celkové antioxidantní kapacity buněk (Obrázek 3) (Ristow a kol., 2009; Jang a kol., 2010; Palomero a Jackson, 2010).



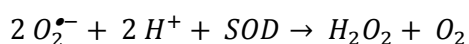
Obrázek č. 3: Přibližný popis rovnováhy mezi antioxidanty a ROS udržovaný v buňkách. (Převzato a modifikováno od Halliwell (2011)).

Neenzymatické antioxidanty jsou tvořeny nízkomolekulárními látkami (askorbát, α -tokoferol, koenzym Q10 a další látky) (Valko a kol., 2007). Při interakci ROS s

neenzymatickými antioxidanty jsou antioxidanty oxidovány ROS za vzniku radikálu antioxidantu, který je následně eliminován.

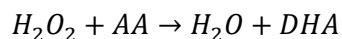
Enzymatické antioxidační systémy zahrnují enzymy superoxid dismutasy (SODy), peroxidasy a peroxiredoxiny. Superoxid dismutasy rychle odstraňují vytvořený $O_2^{\bullet-}$ pomocí katalyzované dismutace, kdy do reakce vstupují dva $O_2^{\bullet-}$, přičemž jeden je redukován na H_2O_2 a druhý na O_2 (viz reakce 4). Živočichové mají MnSODy v mitochondriální matrix a mědnato-zinečnaté typy SOD (CuZnSOD) v mitochondriálním mezimembránovém prostoru a ve zbytku buňky (Fridovich, 1995). Rostliny mají také SODy, které mají ve svém aktivním místě železo (FeSOD) (Alscher a kol., 2002). Bakterie obsahují všechny již už zmíněné SODy, ale mají navíc SODy obsahující nikl (NiSOD) (Halliwell a Gutteridge, 2007). Všechny SODy katalyzují dříve zmíněnou reakci a je jedno jaký obsahují prvek (Fridovich, 1995; Halliwell a Gutteridge, 2007).

reakce č. 4



Peroxid vodíku je eliminován pomocí enzymů z rodiny peroxidas nebo katalasy. Substrátem pro peroxidasu může být např. askorbát nebo glutathion. Reakcí pomocí askorbát peroxidasy (AA) vzniká z H_2O_2 H_2O a redukováný dehydroaskorbát (DHA) (reakce 5)

reakce č. 5



V případě, že oba substráty pro enzym jsou H_2O_2 , dochází k úplnému rozkladu H_2O_2 pomocí katalasy na H_2O a O_2 (reakce 6)

reakce č. 6



Peroxiredoxiny jsou peroxidasy a mohou být považovány za nejdůležitější enzymy v odstranění H_2O_2 u zvířat, bakterií a rostlin (Rhee, 2006). Jsou to homodimery neobsahující žádnou prosthetickou skupinu a jejich redoxní reakce je závislá na cysteinu v aktivním místě. Známe nejméně tři typy peroxyredoxinů: typický 2-cys (nejběžnější), atypický 2-cys a 1-cys peroxydiredoxin. Buňky mají řadu mechanismů na reaktivování oxidovaných peroxyredoxinů (Rhee a kol., 2006) např. u zvířat je nezbytný selen pro aktivitu thioredoxin reduktázy, která udržuje thioredoxiny v redukovaném stavu pro peroxiredoxiny.

1.4 Oxidativní stres

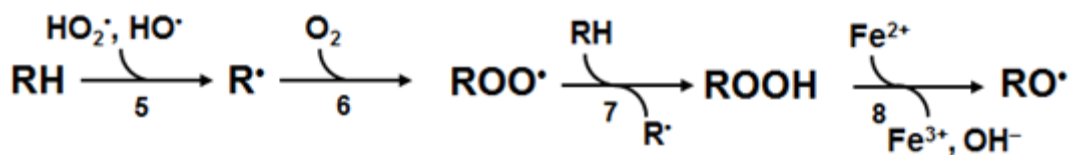
Během oxidativního stresu dochází k narušení oxidační-antioxidační rovnováhy vedoucí k potenciálnímu oxidativnímu poškození (Sies, 1991). Oxidativní stres může vzniknout při poklesu hladiny antioxidantů, při zvýšené produkci ROS, kdy je buňka vystavena vyšším hladinám O_2 , dále přítomností toxinů produkujících ROS (paraquat) nebo při zvýšené aktivaci přirozených systémů produkujících ROS (např. fagocytů) (Halliwell a Gutteridge, 2007).

V posledních letech byly vyvinuty biomarkery (např. malondialdehyd, 4-hydro-2-nonenal, 4-hydroxy-4-hexenal, akrolein, izoprostany a další) pro monitorování oxidativního stresu a jím způsobeného oxidativního poškození v lidských tkáních a tekutinách. Pro měření oxidativního stresu se nejvíce používá krev a moč. Bohužel tato měření špatně detekují oxidativní poškození v malém množství buněk, a navíc poškození některých orgánů se vůbec neodrazí na buňkách v krvi (např. poškození v mozku) (Moller a Loft, 2002; Jacob a kol., 2003; Halliwell, 2005; Halliwell a Gutteridge, 2007; Bjelakovic a kol., 2008; Loke a kol., 2008; Halliwell, 2009; Meagher a kol., 2010; Rytter a kol., 2010; Xu a kol., 2010).

1.5 Organické radikály

Lipidové a proteinové alkylové radikály (R^\bullet) se tvoří vytržením slabě navázaného H z nenasycených mastných kyselin a aminokyselin pomocí HO^\bullet (Obrázek 4, reakce 5). Při přítomnosti O_2 , R^\bullet reaguje s O_2 za vzniku lipidového a proteinového peroxylového radikálu (ROO^\bullet) (Obrázek 4, reakce 6). Vytržení dalšího H z nenasycených mastných kyselin a aminokyselin pomocí ROO^\bullet dochází k tvorbě lipidového a proteinového $ROOH$ a dalšího

R[•] (Obrázek 4, reakce 7) (Ravanat a kol., 2000). Organické ROOR jsou obecně primárními produkty lipidové peroxidace a proteinové oxidace. Dosud jsou studovány nejvíce lipidové ROOH, ale v poslední době se zvedá zájem i o proteinové ROOH.



Obrázek č. 4. Stručný popis jednotlivých reakcí a jejich komponent pro vznik organických radikálů. Převzato a modifikováno od Pospíšil a kol. (2013).

Organické ROOH se při nedostatku iontů přechodných kovů (Fe^{2+} , Cu^{2+}) a redukujících látek nahromadí v buňce a jsou vysoce stabilní. Různě se pohybují díky chybějícímu nepárovému elektronu a vysoké polaritě z místa vytvoření k cíli. V opačné situaci, kdy jsou ionty přechodných kovů a redukující se látky přítomny v blízkosti ROOH, dochází k redukci ROOH na lipidové a proteinové RO^{\cdot} (viz obrázek č. 3, reakce 8).

1.5.1 Proteinové hydroperoxydy

Proteiny jsou první cíle ROS v buňce, protože se vyskytují v buňce nejvíce ze všech buněčných komponent. Reakcí proteinů s ROS vzniká relativně hodně produktů. V proteinech dochází např. k oxidaci vedlejších řetězců, fragmentaci kostry proteinu, dále pak dochází k dimerizaci nebo agregaci proteinu, ke změnám v konformaci a buněčném chování proteinu a další (Obrázek 5).

Důsledky oxidace proteinů

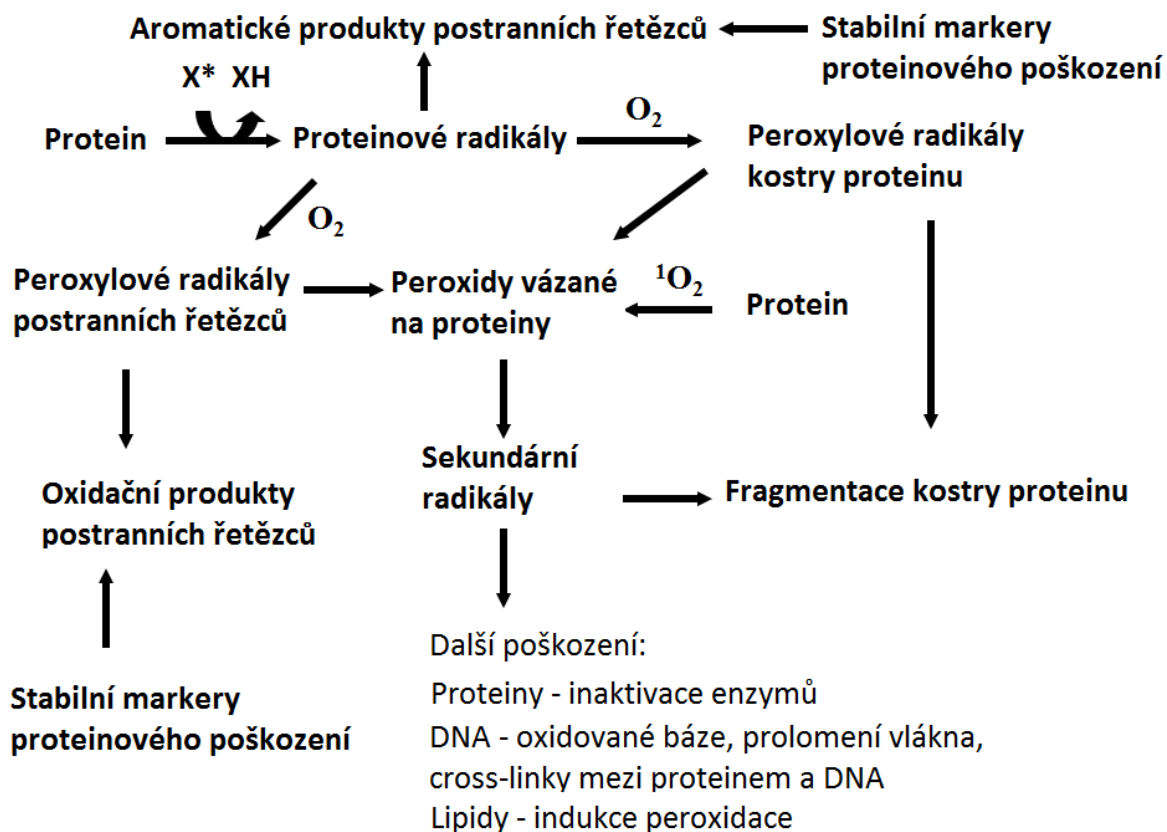


Obrázek č. 5: Důsledky oxidace proteinů. Převzato a modifikováno od Davies a Hawkins (2004).

Produkty vznikající během oxidace proteinů jsou dle výzkumů relativně inertní a odstraňovány intracelulárními či extra-celulárními enzymy (Dean a kol., 1991; Pacifici a Davies, 1990; Dean a kol., 1992; Grant a kol., 1992). Další výzkumy dokázaly, že některé produkty (např. redukční zbytky navázané na proteiny a proteinové peroxy) mohou iniciovat další chemické reakce, které vedou ke zvýšení oxidativního stresu (Simpson a kol., 1992; Giese a kol., 1993; Simpson a kol., 1993).

Nejnovější výzkumy se zabývají přítomností radikálů v protein-radikálové řetězové reakci a byly provedeny pomocí EPR spin-trapové metody (Davies a kol., 1995; Davies, 1996). Bohužel přesná stechiometrie oxidace proteinů není stále známá.

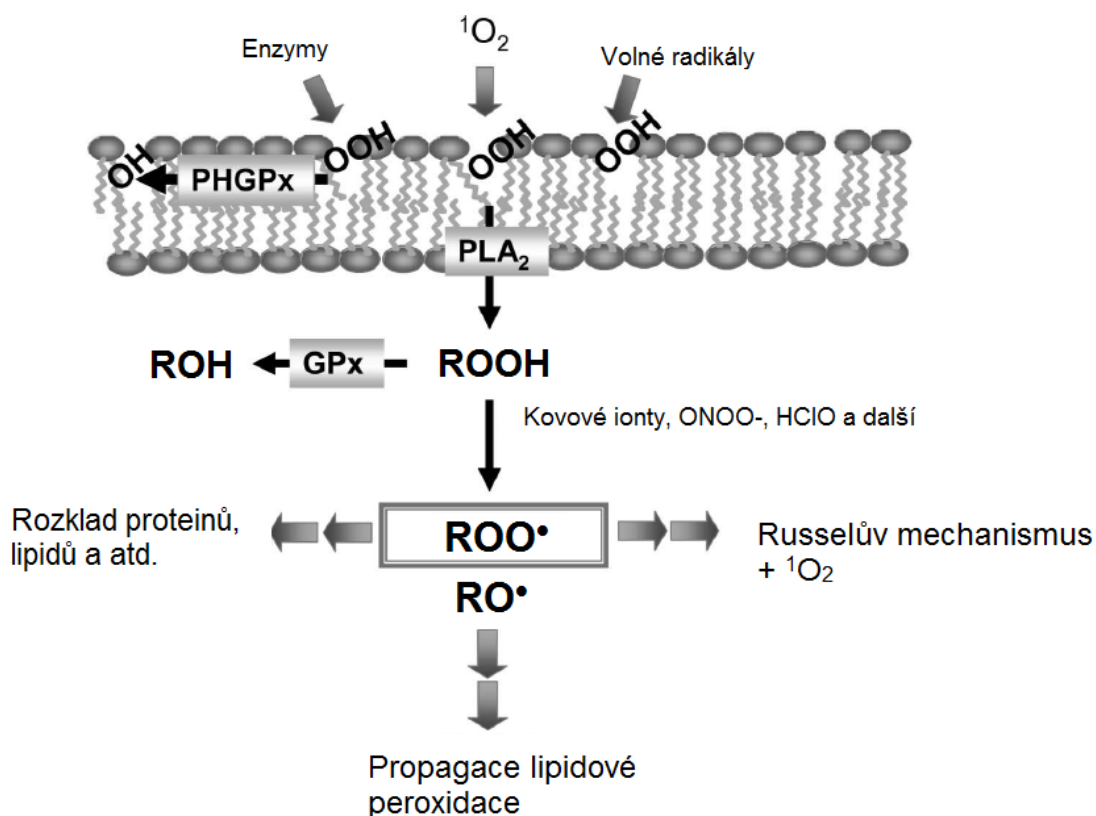
Proteiny reagují s ROS za tvorby proteinových radikálů, které posléze interagují a tvoří např. aromatické produkty postranních řetězců, peroxylové radikály kostry proteinu a postranních řetězců, peroxidů vázaných na proteiny a další (Obrázek 6).



Obrázek č. 6: Reakce proteinů s ROS. Převzato a modifikováno od Davies a Hawkins (2004).

1.5.2 Lipidové hydroperoxydy

Důležitým chemickým dějem, kterému podléhají lipidy a je součástí oxidativního stresu, je lipidová peroxidace (Rowley a kol., 1984; Otamiri a Sjordahl, 1989; Baynes, 1991; Esterbauer a kol., 1992; Berliner a Heinecke, 1996; Markesbery, 1997). Během tohoto procesu jsou lipidy v buněčných membránách oxidované na lipidové ROOH (Girotti, 1998). Lipidové ROOH a cyklické peroxidy mastných kyselin jsou primárními produkty lipidové peroxidace, které pak podléhají přeměnám za vzniku sekundárních produktů lipidové peroxidace (Gardner, 1989; Esterbauer, 1993; Girotti, 1998; Spiteller, 1998). Některé sekundární produkty lipidové peroxidace (např. malondialdehyd, 4-hydro-2-nonenal a 4-hydroxy-4-hexenal) jsou velmi reaktivní a způsobují poškození (např. narušení struktury a funkce biomolekul (Terao a Matsushita, 1977; Frankel a kol., 1979). Většina reakcí lipidů je popsána na obrázku 7.



Obrázek č. 7: Schéma znázorňující vznik a rozpad ROOH v membráně. Fosfolipidové ROOH mohou být redukovány na méně reaktivní ROH pomocí PHGPx nebo jsou hydrolyzovány fosfolipasou A2 uvolňující ROOH mastných kyselin. Tyto ROOH jsou redukovány GPx nebo rozkládány kovovými ionty, ONOO⁻ či pomocí HClO. Při tomto rozkladu vznikají peroxyly mastných kyselin (ROO[•]) anebo alkoxylové radikály (RO[•]). Tyto látky se mohou účastnit reakcí, které vedou ke vzniku lipidových fragmentačních produktů a taky dávají za vznik ¹O₂ pomocí Russellova mechanismu. Převzato a modifikováno od Miyamoto a kol. (2007).

Lipidová peroxidace může probíhat dvěma způsoby – enzymaticky a neenzymaticky. V případě neenzymatické peroxidace lipidů se jedná o proces přeměny lipidů, který je často nekontrolovatelný, degenerativní a patologický. Na reakci se nejvíce z ROS podílejí HO[•] a HO₂[•]. Celkově se tato reakce dělí na tři fáze: iniciace, propagace a terminace (Ayala, 2014). Neenzymatická peroxidace lipidů probíhá především v biologických membránách a lipoproteinech, kde se mění fluidita, propustnost membrán, membránový potenciál, dochází k ovlivnění membránových enzymů a tvorbě chemoatraktivních látek pro makrofágy.

Enzymatická peroxidace lipidů probíhá v aktivních centrech hydroperoxidas a endoperoxidas (cyklooxygenasa a lipoxygenasa) a produkuje biologicky aktivní látky

(prostaglandiny, leukotrieny), které jsou důležité v řízení buněčných dějů a v ochranných pochodech (Štípek a kol., 2000).

V průběhu obou mechanismů peroxidace lipidů vznikají také deriváty mastných kyselin, zvané oxylipiny. Oxylipiny jsou deriváty mastných kyselin obsahující jednu nebo více kyslíkových skupin, jsou biologicky aktivní a mají důležitou roli jako obranné signály nebo antimikrobiální sloučeniny.

Lipidové ROOH vzniklé při peroxidacích jsou relativně stabilní v organických roztocích za pokojové teploty. Rozkládají se pomocí kovových iontů (Fe^{2+} , Cu^{2+}) redukcí na RO^{\bullet} anebo oxidací na ROO^{\bullet} (reakce 7 a 8).

reakce č. 7



reakce č. 8



Dále mohou být rozloženy při ohřátí, při expozici UV světlem nebo při přítomnosti hemových proteinů (Girotti, 1998). Mohou také podléhat redukcí na méně aktivní ROH pomocí enzymů patřící do skupiny GPx či glutathion transferas (GST) (Ursini a Bindoli, 1987).

1.5.2.1 Detekce hydroperoxidů a peroxidů

První používanou metodou pro detekci lipidových hydroperoxidů je reakce s jódem v kyselém prostředí, při které reaguje přesně jeden jodidový iont pro každou hydroperoxidovou skupinu v reakci (Jessup a kol., 1994). Nicméně tato metoda trpí citlivostí k O_2 a světlu, proto její hlavní použití je ve standardizaci jiných metod.

Další široce používanou metodou je technika zahrnující redukcí ROOH pomocí Fe^{2+} v kyselých organických rozpouštědlech a vznik komplexů železitých iontů (Fe^{3+}) s xylenolovou oranží (XO) (Wolff, 1994; Gay a kol., 1999). Vzniklý komplex XO/ Fe^{3+} je měřen pomocí absorpční spektroskopie (Gay a kol., 1999). Tato metoda je jinak

označována jako FOX test a v dnešní době se hlavně používají její vylepšené verze PCA-FOX (Gay a Gebicki, 2002) a M-PCA-FOX (Gay a Gebicki, 2003). Metoda FOX assay je relativně rychlá, bez citlivosti k O₂ a úrovně absorbance jsou stabilní. Bohužel hlavním nedostatkem je nepřesná stechiometrie mezi vzniklými ROOH a Fe³⁺ a vysoká citlivost k malé změně v pH (Gay a kol., 1999; Gay a kol., 1999).

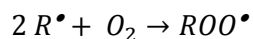
Mezi další techniky měření hydroperoxidů a peroxidů můžeme zařadit infračervenou spektrofotometrii (Ralph a kol., 1958), konduktometrii, separace pomocí HPLC s normální nebo reverzní fází v kombinaci s LC/MS/MS (Morgan a kol., 2008), kombinace HPLC-ESR, ESI/MS, MS/MS (Guo a kol., 2003) a EPR spin-trapová metoda.

1.5.3 Peroxylové a alkoxylové radikály

Peroxylové radikály jsou součástí mnoha oxidativních metabolických a degradačních reakcí (Howard, 1973). Příkladem těchto reakcí je např. autoperoxidace, dále pak chemicky (Witting, 1980) či biologicky indukovaná lipidová peroxidace (Recknagel a kol., 1977; Slater, 1984) a rozpad ROOH pomocí kovových komplexů (reakce 8) (Hrycay a O'Brien, 1971; Griffin a Ramirez, 1981; Kalyanaraman a kol., 1983; Dix a Marnett, 1985). Zmíněné reakce mohou být dále katalyzovány pomocí dalších ROO•, které vznikají při tvorbě prostaglandinu H (De Groot a kol., 1975; Rahimtula a O'Brien, 1976; Porter, 1980; Vliegthart a Veldink, 1982).

Peroxylové radikály vznikají hlavně reakcí radikálů R• obsahujících ve svém středu C s O₂ (reakce 9) nebo interakcí ROOH s kovovými komplexy (Fe³⁺) (reakce 8) (Kochi, 1973; Neta a kol., 1990; Davies a kol., 1995; Davies a kol., 1996).

reakce č. 9



Vzniklé ROO• procházejí velkým množstvím reakcí, které dávají za vznik dalším sloučeninám obsahujícím karbonylové skupiny (aldehydy nebo ketony), alkoholům a ROOH, ale mohou také dimerizovat, kdy vznikne tetroxid (ROO-OOR) reakcí dvou ROO• (reakce 10). Tetroxid se může rozložit na karbonyl a organický hydroxid (Bartlett a

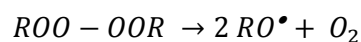
Guaraldi, 1967; Adamic a kol., 1969; Bennett a kol., 1970; Howard, 1972; Bennett, 1990; von Sonntag a Schuchmann, 1997).

reakce č. 10

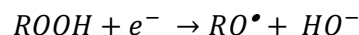


Alkoxylové radikály mohou vznikat rozpadem z ROOOOR (reakce 10 a reakce 11) nebo jednoelektronovou redukcí ROOH (reakce 12) (Berdnikov a kol., 1972; Gilbert a kol., 1981; Gilbert a kol., 1981; von Sonntag, 1987; Chamulitrat a kol, 1988; Davies, 1989).

reakce č. 11



reakce č. 12



Alkoxylové radikály jsou součástí mnoha důležitých reakcí, podobně jako ROO[•] (např. pyrolýza a fotolýza mnoha organických peroxidů, esterů organických či anorganických kyselin). Důkazy o existenci RO[•] v reakcích jsou diskutovány v mnoha člancích z poloviny 20. století (Leffler, 1949; Bell a kol., 1951; Waters, 1952; De La Mare a Vaughan, 1957; Gray a Williams, 1959; Walling, 1957; Karnojitzky, 1958). Problémem bohužel je, že RO[•] nemohou být izolovány a většina důkazů je nepřímá (Gray a Williams, 1959). Na tyto problémy z poloviny století navázaly další studie (Chamulitrat a kol, 1988; Davies, 1989) které detekovaly RO[•], ale i ROO[•] radikály rozpadem ROOH.

1.5.3.1 Detekce a důkazy tvorby peroxylových a alkoxylových radikálů

Jednoznačné důkazy tvorby ROO[•] a RO[•] bylo v mnoha biologických systémech těžké získat. Přímá detekce není většinou možná, i když pokusy o detekci pomocí EPR byly uskutečněny. Při pokusech o detekci ROO[•] a RO[•] za pomoci EPR byly použity spin-trapy

(tzv. vychytávače spinů α -phenyl-N-tert-butylinitron (PBN) a 2-methyl-2-nitrosopropan (MNP)), ale výsledky nebyly důvěryhodné kvůli fotochemické a termální nestabilitě výsledných aduktů vychytávačů spinů vzniklých při reakci spinu trapu s radikálem (Howard a Tait, 1978; Janzen a kol., 1978; Pfab, 1978). Dosažené výsledky kontrastují s dalšími výzkumy, kdy se podařilo zachytit ROO^\bullet a RO^\bullet za pokojové teploty ve tmě při použití stejných vychytávačů spinů PBN a MNP (Ohto a kol., 1977; Niki a kol., 1983; Yamada a kol., 1984).

Jiné studie ROO^\bullet a RO^\bullet pomocí EPR vybraly cyklické vychytávače spinů nitronové stavby 5,5-dimethyl-1-pyrrolin (DMPO), α -(4-pyridyl N-oxid)-N-tert-butylinitron (POBN). Tyto vychytávače spinů měly vytvořit detekovatelný adukt vychytávače spinů a poskytnout charakteristická EPR spektra pro sledované radikály. Bohužel jednotlivé studie a výsledky nelze porovnat, protože byly provedeny za jiných podmínek a rozpouštědel, a proto jsou další práce k objasnění tohoto problému nutné (Janzen a kol., 1978; Rosen a Rauckman, 1980; Kalyanaraman a kol., 1983).

1.6 Elektronová paramagnetická rezonanční spektroskopie

Elektronová paramagnetická rezonanční spektroskopie (jiný název je elektronová spinová rezonanční spektroskopie neboli ESR) je metodou pro studium molekul obsahujících nepárové elektrony (např. kyslíkové, organické radikály a paramagnetické ionty přechodných kovů). Elektronová paramagnetická rezonanční spektroskopie jednoznačně dokáže určit přítomnost látek obsahujících nepárové elektrony i při velmi nízké koncentraci a této vlastnosti se využívá při studiu mechanismů chemických a elektrochemických reakcí. Dále pak je EPR schopné poskytnout cenné informace o vnitřní struktuře molekul např. lokalizace nepárových elektronů v molekule, aktivních center a intramolekulárních pohybů.

1.6.1 Princip EPR

Pro měření je potřeba EPR spektrometr, který se skládá ze zdroje elektromagnetického záření (v rozsahu mikrovln), dále pak z mikrovlnného detektoru, silného elektromagnetu a rezonátoru, do kterého se vkládá vzorek v skleněné či křemenné kapiláře.

Elektronová paramagnetická rezonanční spektroskopie je založena na Zeemanově jevu, při kterém dochází k štěpení energetických hladin elektronů v magnetickém poli.

Absorpce elektromagnetického záření (mikrovlnná frekvence v elektromagnetickém spektru) paramagnetickým vzorkem (látka s nepárovým elektronem) umístěným v magnetickém poli probíhá za určité frekvence a hodnotě magnetického pole, která závisí na typu přítomné paramagnetické látky a její charakteristice. Toto popisuje rovnice 1, kde h = Plankova konstanta, ν = frekvence, g = konstanta závislá na typu radikálu, β = Bohrov magneton a H = aplikované magnetické pole.

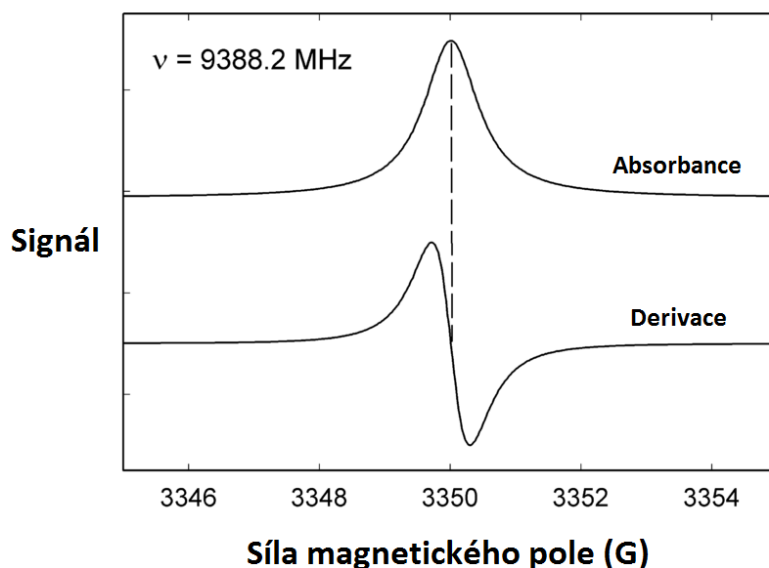
rovnice č. 1

$$h\nu = g\beta H$$

Výhoda EPR je, že když nejsou přítomny žádné radikály nebo nepárové elektrony, tak nedochází k žádným absorpcím a eliminuje se tak tím i absorpce pozadí, která bývá problematická pro jiné spektroskopické techniky při zkoumání biologických vzorků.

Největším omezením EPR je doba života volných radikálů za fyziologických podmínek. Tato omezení EPR vedla k dalšímu výzkumu a vyvinutí EPR spin-trapové metody.

Výsledkem EPR měření je EPR spektrum, ve kterém dostaneme záznam absorpce mikrovlnného záření v závislosti na velikosti magnetického pole, a jednotlivá spektra jsou ve formě první derivace absorpčního spektra. Spektrem EPR tedy rozumíme závislost derivace dI/dH velikosti absorpce vysokofrekvenční energie na intenzitě vnějšího magnetického pole.



Obrázek č. 8: Porovnání absorpčního spektra a EPR spektra. Převzato a modifikováno z https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/21/EPR_lines.png/749px-EPR_lines.png.

1.6.2 EPR spin-trapová metoda

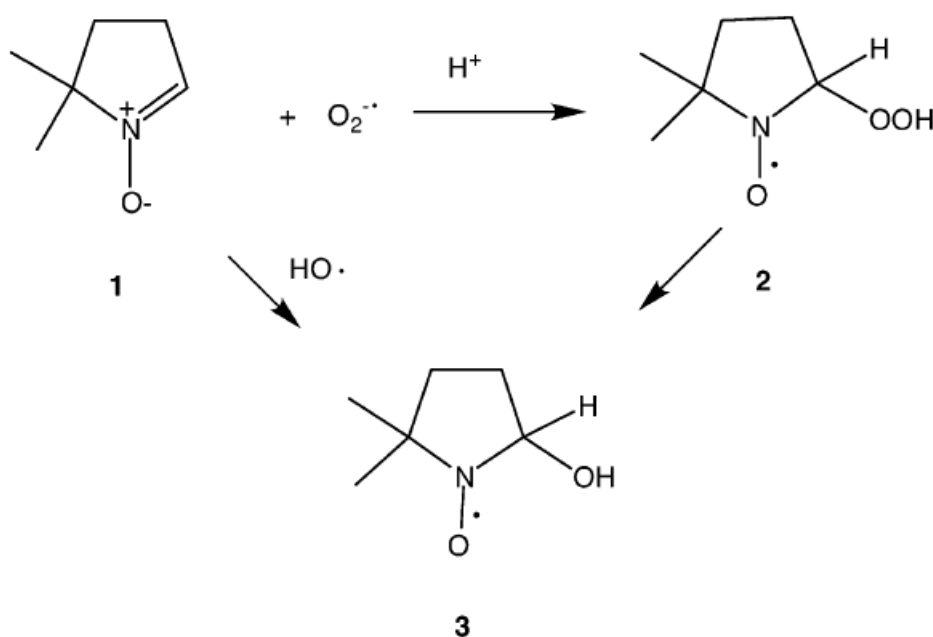
Spin-trapová metoda byla vyvinuta na konci 60. let 20. století jako rozšiřující technika EPR pro detekci reaktivních radikálů v chemických systémech (Iwamura a Inamoto, 1967; Janzen, 1971; Lagercrantz, 1971; Perkins, 1980; Janzen a Haire, 1990; Villamena a Zweier, 2004). Při EPR spin-trapové spektroskopii využíváme vycytávače spinů organické stavby obsahující ve svém středu nitronové nebo nitroso stavby. Vycytávače spinů reagují s radikály za tvorby aduktu vycytávače spinů.

Výběr vycytávače spinů pro daný radikál podléhá několika kritériím. Prvním kritériem je doba potřebná k vytvoření páru radikál-vycytávač, která je mnohem kratší než doba reakce radikálu s okolím. Dalším kritériem je, že každý vycytávač se používá pro detekci určitého radikálu, a proto jich existuje více druhů. Poslední kritérium je nejdůležitější, protože je o stabilitě páru radikál-vycytávač, kdy vycytávač a radikál vytvoří kovalentní vazbu a tento pár je stabilní a měřitelný pomocí EPR. Všechna výše zmíněná kritéria by měla být při experimentu zohledněna a navržena v rámci technických a laboratorních možností tak, aby se podařilo změřit požadovaný radikál. Specifická reakce vycytávačů s volnými radikály udělala z EPR pomocí vycytávače spinů vysoce specifický nástroj pro detekci volných radikálů v biochemických systémech, buňkách, tkáních a zvířatech (Hawkins a kol., 2009).

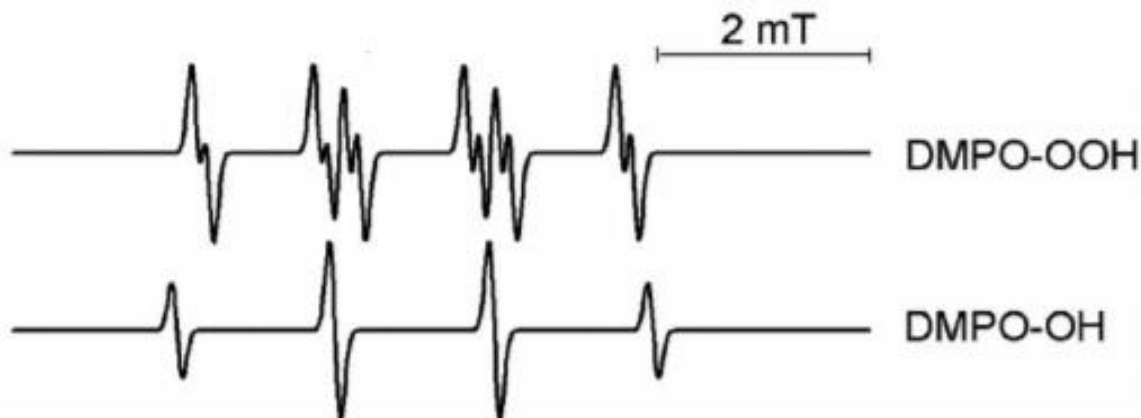
Bohužel i EPR spin-trapová metoda proteinových radikálů *in vivo* má své omezení. Prvním je pronikání vycytávačů spinů do buněk, druhým omezením je nestabilita aduktů vycytávače spinů v tkáních, dále pak ztráta dielektrického vzorku a nízká koncentrace těchto aduktů v přítomnosti antioxidantů, které mohou reagovat s vycytávačem spinů.

1.6.2.1 Detekce radikálů pomocí EPR spin-trapové metody

Při detekci radikálů $O_2^{\cdot-}$ a HO^{\cdot} pomocí vycytávače spinů DMPO vzniká superoxidový (DMPO-OOH) a hydroxylový (DMPO-OH) adukt vycytávače spinů (obrázek 9), který má různá EPR spektra (Finkelstein a kol., 1980). Spektrální rozlišení DMPO-OOH a DMPO-OH (obrázek 10) (Vojta a kol., 2015) měla velký vliv na porozumění role $O_2^{\cdot-}$ a HO^{\cdot} v mnoha biologických procesech zahrnujících také imunitní odpověď vůči hostiteli (Britigan a kol., 1986; Pou a kol., 1989; Ramos a kol., 1992). Stále se ale neví, proč přítomnost atomu O ovlivňuje tvar EPR spektra u DMPO-OOH a DMPO-OH aduktů vycytávače spinů.



Obrázek č. 9: Vycytávač spinů DMPO (č. 1) a jeho dvě vznikající formy v reakci s $O_2^{\cdot-}$ a HO^{\cdot} : DMPO-OOH (č. 2) a DMPO-OH (č. 3). Převzato a modifikováno od Rosen a kol. (2004).



Obrázek č. 10: Odlišná EPR spektra DMPO-OH a DMPO-OOH aduktů vychytávače spinů. Převzato a modifikováno od Vojta a kol. (2015).

Pro detekci radikálu HO[•] se může také použít vychytávač spinů POBN a 3,3,5,5-tetramethyl-1-pyrrolin (TMPO). Reakcí vychytávače spinů POBN s HO[•] vzniká POBN-OH adukt vychytávače spinů, který má poločas života v řádu několika hodin. Jiným vychytávačem spinů s podobným poločasem života aduktu vychytávače spinů, který je vhodný například pro detekci ¹O₂, je TEMPD (2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidin). Využití vychytávačů spinů pro detekci radikálů v biologických systémech je stále přezkoumáváno (Davies a kol., 1996; Berliner a kol., 2001; Villamena a Zweier, 2004).

Spin-trapová metoda byla původně vyvinuta pro zkoumání radikálů nízkomolekulárních látek (O₂^{•-} a HO[•]) a je dnes rozsáhle používán pro zkoumání tvorby radikálů na proteinech, lipidech, DNA/RNA a polysacharidech jak v izolovaném, tak i komplexním biologickém systému (Davies, 1993; Clement a kol., 2001; Davies a Hawkins, 2004).

1.7 Imuno spin-trapping

Metoda imuno spin-trappingu navazuje na EPR spin-trapové metody a posouvá je o kousek dále. Imuno spin-trapping kombinuje specifitu, senzitivitu spin-trapové metody a interakci mezi antigenem a protilátkou. Je založena na detekci nitronové části v DMPO-protein-radikál odvozeného aduktu vychytávače spinů pomocí protilátky proti DMPO.

Vychytávač spinů DMPO byl vybrán pro svoji známou vhodnou farmakokinetiku (příjem, distribuci, metabolismus a exkreci) v biologických systémech (např. buňky, paraziti a zvířata) (Anzai a kol., 2003), je nejméně toxický, je rozpustný ve vodě a

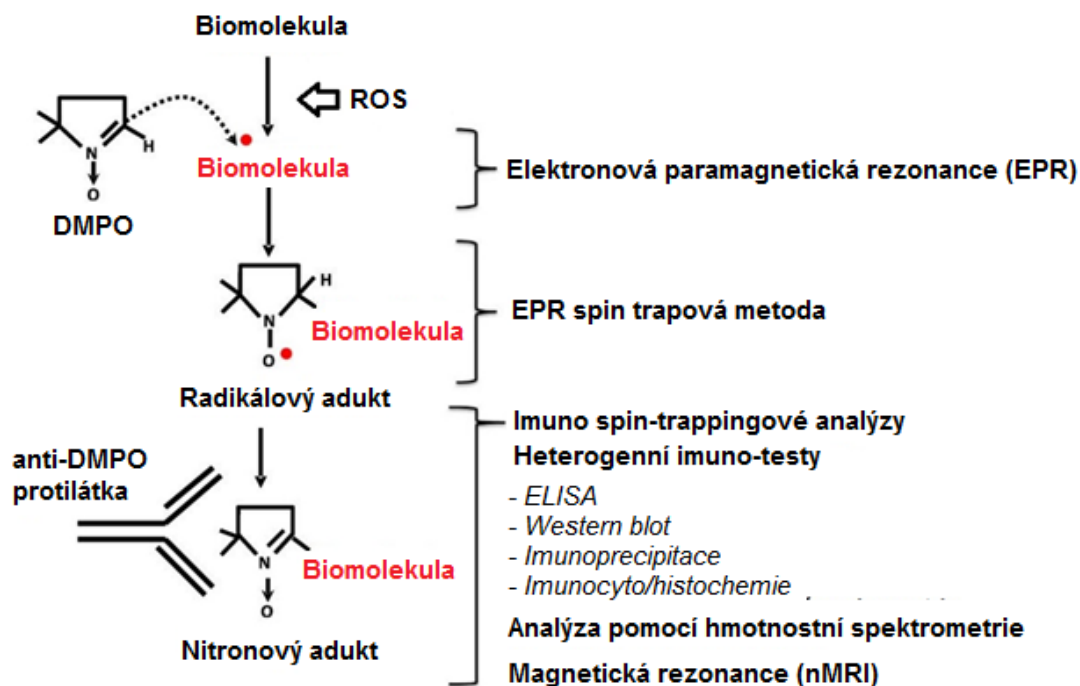
v organických rozpouštědlech. Díky této vlastnosti může vstoupit do jakékoliv buněčné části, a tak se navázat na proteinové a DNA radikály, kdykoliv jsou vytvořeny. Nitronové adukty vychytávače spinů vytvořené pomocí DMPO zůstávají stabilní a mohou být dále využity při imuno spin-trappingu (Mason, 2004; Ramirez a kol., 2005; Ramirez a kol., 2007).

Proteinové a DNA radikály jsou zachyceny pomocí DMPO a vytvářejí nitronové adukty. Vytvořené nitronové adukty jsou rozeznávány anti-DMPO protilátkou. Protilátka proti DMPO rozeznává jen DMPO, ale ne molekulu, na kterou je navázán, proto je nutná další separace, a proto se imunoanalýza označuje jako heterogenní. Výsledná separace oddělí biomolekulové radikály od volných DMPO radikálů a malých molekulových DMPO radikálů (Guo a kol., 2004).

Celkově můžeme imuno spin-trapping rozdělit na 3 hlavní kroky (Ramirez a kol., 2005; Ramirez a kol., 2007). Prvním krokem je zachycení vytvořených stabilních nitronových aduktů z makromolekulárních radikálů. Dalším krokem je separace anebo extrakce nitronových aduktů a posledním krokem je imunodetekce spojená s lokalizací nitronových aduktů pomocí metody ELISA nebo Western-blot.

Produkce anti-DMPO protilátek (Detweiler a kol., 2002) pomohla detekovat velké množství proteinových radikálů pomocí DMPO imuno spin-trappingu (Ramirez a Mason, 2005; Gomez-Mejiba a kol., 2009). Mezi proteiny, ve kterých byly detekovány proteinové radikály, patří např. myoglobin (Detweiler a kol., 2002; Detweiler, 2005; Bhattacharjee a kol., 2007; Lardinois a kol., 2008), hemoglobin (Ramirez a kol., 2002; Ramirez a kol., 2003; Deterding a kol., 2004; Detweiler, 2005), cytochrom c (Chen a kol., 2004), neuroglobin (Lardinois a kol., 2008), Cu/Zn-SOD (Ramirez a kol., 2005; Ramirez a kol., 2009; Ranguelova a kol., 2010), Mn-SOD (Ansenberger-Fricano a kol., 2013), katalasa (Bonini a kol., 2007), myeloperoksidasa (Siraki a kol., 2007; Siraki a kol., 2008), eozinofil peroksidasa (Ranguelova a kol., 2010), laktoperoksidasa (Guo a kol., 2004; Bonini a kol., 2007), mikroglobulin (Guo a kol., 2004), albumin (Ramirez a kol., 2005; Ranguelova a kol., 2010) a další.

Techniky užité pro analýzu



Obrázek č. 11: Porovnání jednotlivých technik pro studium biomolekulárních radikálů. Převzato a modifikováno od Gomez-Mejiba a kol. (2009)

Výhodou imuno spin-trappingu před EPR spin-trapovou metodou je proveditelnost aplikace této technologie v jakékoliv výzkumné, klinické a akademické laboratoři bez nutnosti komplikovaného vybavení či specialisty v oboru fyziky. Další výhodou je možnost detekovat vícero proteinových radikálů ve stejném systému a určení jejich přibližné molekulární hmotnosti.

Imuno spin-trapping je moderní, jednoduchá, spolehlivá, dostupná, citlivá a specifická metoda pro detekci proteinových radikálů *in situ*, *in vitro*, *ex vivo* a *in vivo* a mohla by být velmi užitečná v toxikologickém výzkumu.

Praktická část

2. Materiál a metody

2.1 Chemikálie

APS (10%), akrylamid-bisakrylamid (AB-3 a AB-6), bromfenolová modř, commassie blue brilliant (CBB 250), gelový roztok 3x, glycerol, H₂O₂ (3%), heptahydrát síranu železnatého (BDH Prolabo), hydroxid sodný (Lach-ner), (Sigma-Aldrich), chlornan sodný (Sigma-Aldrich katalasa z hovězích jater (1600 units/mg) (Sigma), kyselina molybdenová (Sigma-Aldrich), kyselina sírová (96%) (Lach-ner), lower-buffer, mléko, PBS-T, ponceau červeň, přenášeč pufr (Transfer-buffer 1%), odbarvovací roztok (destain solution), roztok primární protilátky proti DMPO, roztok sekundární protilátky proti DMPO, sérum hověziho albuminu (Sigma-Aldrich), TEMED, upper-buffer, xylenová oranž (Sigma-Aldrich), α -(4-pyridyl N-oxid)-N-*tert*-butylnitron (POBN) (Sigma-Aldrich), 2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidin (TEMPD) (Aldrich), 5,5-dimethyl-1-pyrrolin (DMPO) (Sigma-Aldrich).

2.2 Přístrojové vybavení

Analytické váhy AtD HM-200, dvoupaprskový spektrometr Unicam UV550 (Thermo Spectronic, Cambridge, Velká Británie), elektroforetická jednotka Biorad power pac 1000, EPR spektrometr Miniscope MS 400 (Magnettech, Berlín, Německo) chladicí box LIE FKV 410, magnetická míchačka vortex IKA big squidminiodstředivka (Fisher Scientific, Pardubice, Česká republika), míchadlo s magnetickým ohřevem IKA C-MAG HS 7, mrazicí box LIE G 5216 513 L, pH elektroda SemTix 81, pH metr Inolab pH 7110, Trans-blot SD semidry transfer cell a další běžné vybavení laboratoře (pipety, kádinky, eppendorfky a jiné).

2.3 Příprava proteinových hydroperoxidů

Albuminové ROOH byly připravovány z albuminu o koncentraci (100 mg/ml), který reagoval s kyselinou molybdenovou (H₂MoO₄) (100 mM) a H₂O₂ (100 mM). Následovala 30minutová inkubace na ledu a po této inkubační době byla reakce zastavena katalasou (2000 jednotek/ml).

V reakci vznikl ¹O₂ a HO[•] radikál. Vzniklý ¹O₂ reagoval s vycytávačem spinů TEMPD za vzniku detekovatelné TEMPONE sloučeniny a HO[•] reagoval s DMPO za vzniku DMPO-OH detekovatelného aduktu vycytávače spinů. Singletní kyslík oxidoval albumin za vzniku albuminových ROOH. Albuminové ROOH se nechaly reagovat s oxidačním činidlem NaClO (100 mM) nebo redukčním činidlem FeSO₄ (1 mM) za vzniku organických radikálů. Organické radikály reagovaly s vycytávačem spinů DMPO za vzniku DMPO-OH

aduktů vychytávače spinů. Adukt DMPO-OH a sloučenina TEMPONE byla posléze detekovatelná pomocí EPR spektrometru kam se přenesla kapilára vzorku.

Výsledný objem vzorku vložený do kapilár byl 30 μ l, albumin tvořil 24/27 μ l, vychytávač spinů 3 μ l a v případě použití NaClO/FeSO₄ další 3 μ l.

2.4 Příprava reagentů pro FOX test

Pro přípravu FOX test byly použity tyto roztoky: H₂SO₄ (250 mM), FeSO₄ (5 mM) a XO (5 mM).

Zásobní roztoky heptahydrátu (FeSO₄) a XO se naředily pomocí H₂SO₄ (poměr 1:1). Výsledné naředěné roztoky XO (2,5 mM) a FeSO₄ (2,5 mM) se smíchaly také v poměru 1:1. Výsledný použitý vzorek obsahoval 800 μ l albuminu, H₂MoO₄ a H₂O₂ (100 mg/ml) a 200 μ l směsi XO a heptahydrátu a byl posléze umístěn na 30 minut do tmy, aby proběhla správná inkubace. Měření výsledných vzorků probíhalo na absorpčním spektrometru při vlnové délce 560 nm.

2.5 Měření na EPR spektrometru

Použitý EPR spektrometr měří v rozsahu 50 až 450 mT při frekvenci 9,5 GHz. Tento přístroj je vysoce citlivý, dokáže detekovat až 8×10^9 jednotek spinů za 0,1 mT.

Přístroj je propojen s počítačem ve stejné místnosti za stejné pokojové teploty a byl ovládán pomocí programu Miniscope Control (verze 6.51). Během měření přístroj zaznamenával 4096 dat za 1 minutu a měření vždy trvalo 1 minutu, jen se 5krát opakovalo. Výsledné spektrum je zprůměrované z jednotlivých měření. Programem Miniscope Control byla data následně zpracována, zprůměrována a vykreslena finální křivka, která byla uložena a vyhodnocena v programu Multiplot (verze 2.26).

2.6 Příprava reagentů pro imuno spin-trapping

Prvně se připravil 10 % a 4 % sample gel. Pro přípravu 10 % gelu se použilo AB-6/AB-3 (2 ml), gelový pufr (3x) (3,3 ml), glycerol (1 ml), H₂O (3,5 ml), APS (10 %) (50 μ l) a TEMED (5 μ l). Pro 3 % sample gel AB-3 (0,5 ml), gelový pufr (1,5 ml), H₂O (4 ml) APS (10 %) (45 μ l) a TEMED (4,5 μ l). Následovalo tuhnutí obou gelů po dobu 30 minut (celkově 60 minut).

Vzorek již připraveného albuminu 9 μ l (viz **2.3 příprava proteinových hydroperoxidů**) byl smíchán s 1 μ l DMPO a 19 μ l extrakčního pufru. V případě použití NaClO a FeSO₄ obsahoval vzorek 9 μ l albuminu, 1 μ l DMPO, 18 μ l extrakčního pufru a 1 μ l NaClO nebo FeSO₄. Takto připravený vzorek se nechal inkubovat po dobu 30 minut při 60°C. Následně

se do každého vzorku přidal 1 μl bromfenolové modři pro lepší kontrolu průběhu elektroforézy, pak byl vzorek nanesen do gelu a probíhala elektroforéza po dobu 1 až 2 hodin při konstatním napětí 25, 50 a 100 mA.

Po ukončení elektroforézy byl gel se vzorkem vyjmut a obarven v CBB 250 pro kontrolu separace a následoval proces přenosu gelu na biomembránu, který trval 1 hodinu při konstatním napětí 100 mA. Stejně jako po ukončení elektroforézy následovalo kontrolní obarvení, ale v ponceau červení. Následně byla biomembrána kultivována 3 h nebo přes noc v roztoku PBS-T obsahující mléko (2,5 g na 50 ml), tento proces se nazývá blocking.

Po kultivaci biomembrány v PBS-T s mlékem následovala kultivace po dobu 1 h v roztoku primární protilátky proti DMPO. Následně byla biomembrána 30 minut promývána v PBS-T bez mléka a byla přenesena do roztoku PBS-T obsahující mléko a sekundární protilátku proti DMPO (3 μl v 30 ml PBS-T obsahující mléko) a kultivována další 1 h. Po závěrečné kultivaci se sekundární protilátkou následovalo poslední promývání po dobu 30 minut v PBS-T.

Výsledná biomembrána byla přenesena do vizualizačního přístroje pro chemiluminiscenci. Pro změření chemiluminiscence bylo potřeba biomembránu pokapat roztokem obsahující (200 μl luminolu a 200 μl H_2O_2) a mohlo dojít k změření chemiluminiscence biomembrány.

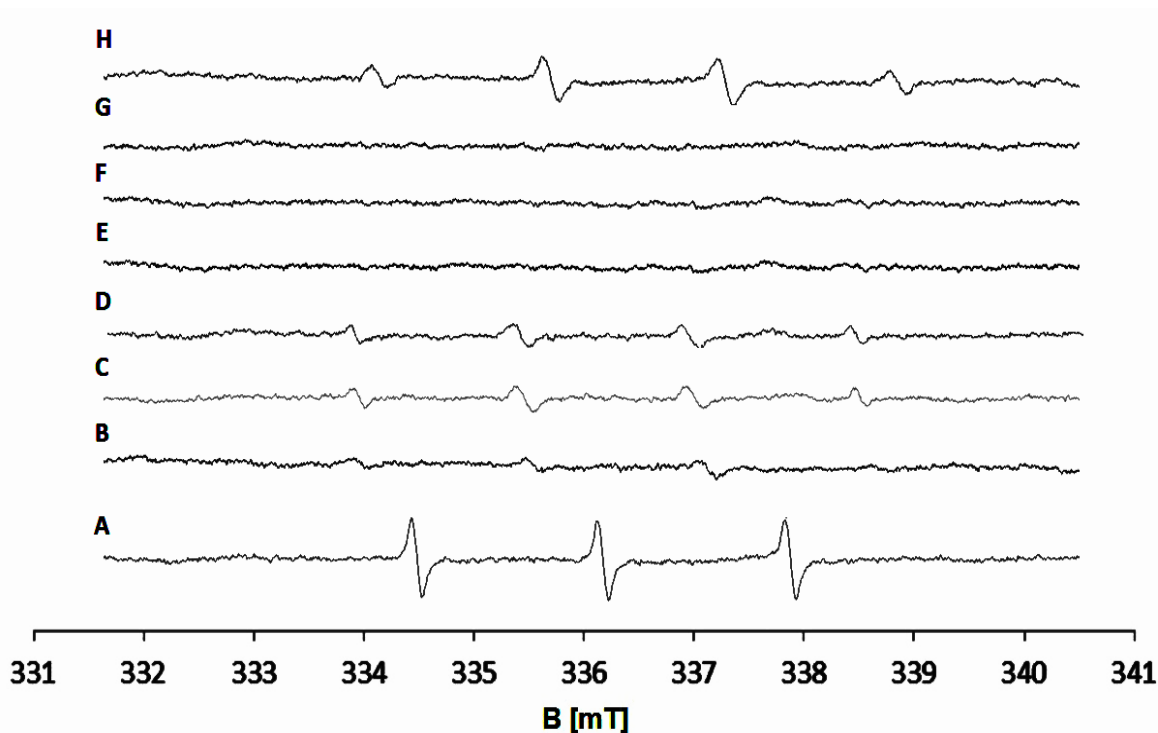
3. Výsledky

První část experimentu diplomové práce je zaměřena na detekci $^1\text{O}_2$ a HO^\bullet pomocí EPR spektrometrie a vycytávačů spinů TEMPD a DMPO. Další část experimentu je zaměřena na detekci ROOH pomocí FOX testu a poslední část experimentu je imuno spin-trapping organických radikálů s vycytávačem spinů DMPO.

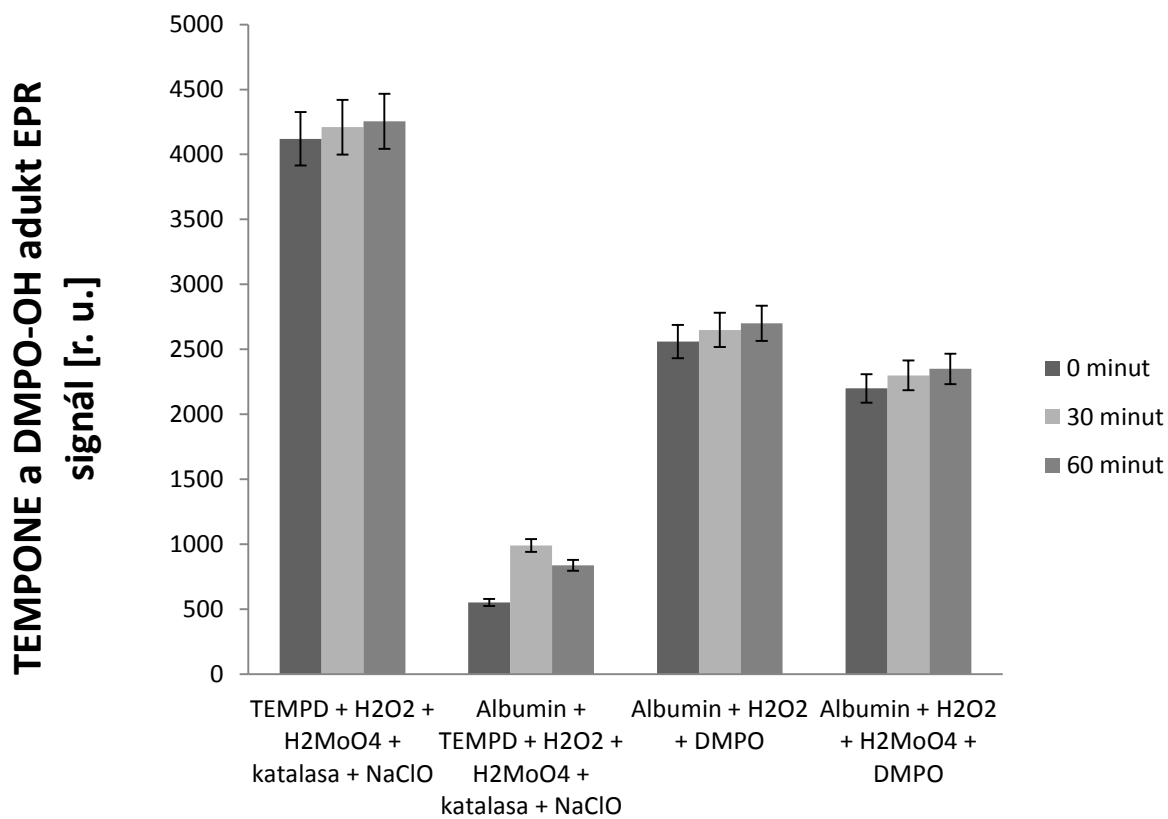
3.1 Detekce singletního kyslíku a hydroxylového radikálu

Byla detekována tvorba $^1\text{O}_2$ a HO^\bullet pomocí vycytávačů spinů TEMPD a DMPO v EPR spektrometru. Pro experiment byl použit chemický systém obsahující albumin, H_2O_2 , H_2MoO_4 , katalasu, NaClO a FeSO_4 . V tomto měření byl měřen signál TEMPONE EPR aduktu vznikající reakcí vycytávače spinů TEMPD s $^1\text{O}_2$ a DMPO-OH aduktu vznikající reakcí DMPO s HO^\bullet . Singletní kyslík vznikl rozkladem z H_2O_2 a z albuminových ROO^\bullet , zredukovaných z ROOH pomocí NaClO . Hydroxylový radikál vznikl rozpadem H_2O_2 .

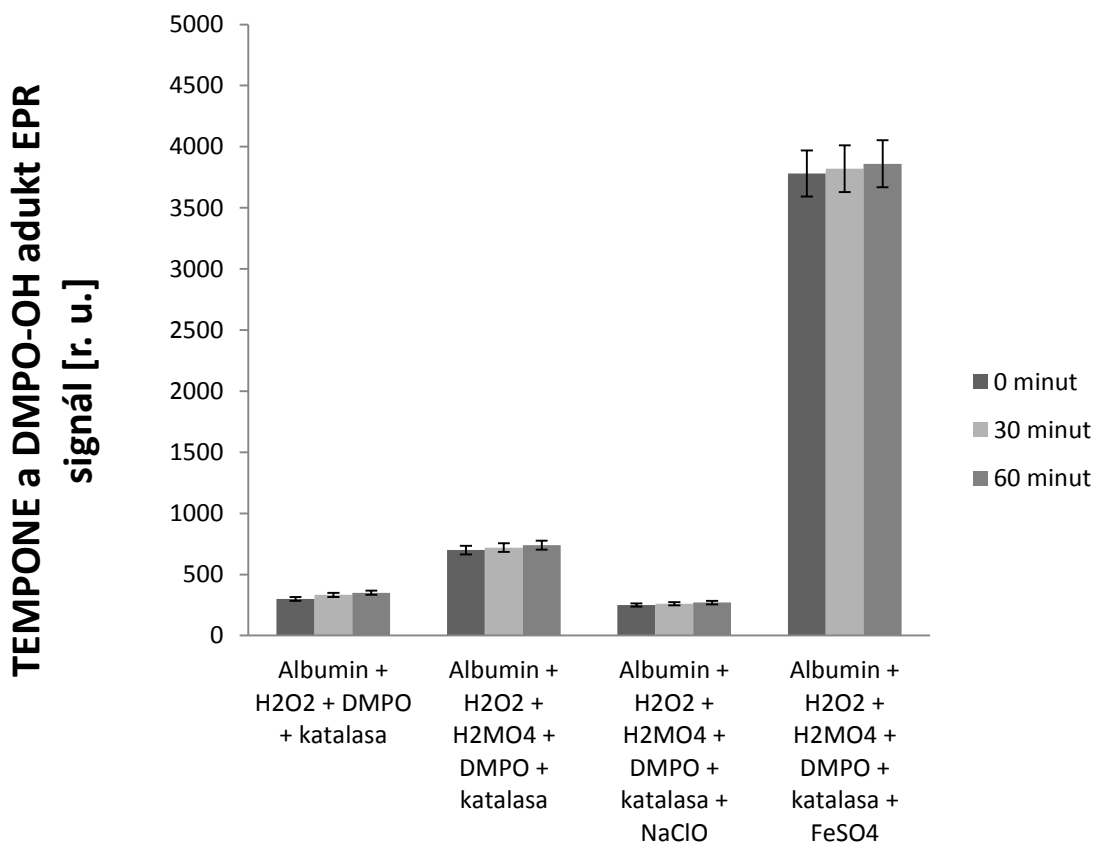
Graf 1 ukazuje EPR signál TEMPONE a DMPO-OH aduktu. Pro kvantifikaci a porovnání TEMPONE a DMPO-OH EPR spekter byla vynesena výška středního píku do sloupcového grafu (Graf 2 a 3). EPR signál TEMPONE vzorku bez albuminu byl velmi silný a porovnatelný se signálem DMPO-OH aduktu, ale signál TEMPONE aduktu vzorku s albuminem byl v porovnání se signálem DMPO-OH aduktu 3x menší.



Graf č. 1: Spektra TEMPONE a DMPO-OH aduktu pomocí EPR spektrometrie. Vzorek **A** je signál TEMPONE vzniklý reakcí TEMPD s H_2O_2 , H_2MoO_4 , katalasou a NaClO. Vzorek **B** je signál TEMPONE vzniklý reakcí TEMPD s albuminem, H_2O_2 , H_2MoO_4 , katalasou a NaClO. Vzorek **C** je signál DMPO-OH aduktu vzniklý reakcí DMPO s albuminem a H_2O_2 . Vzorek **D** je signál DMPO-OH aduktu vzniklý reakcí DMPO s albuminem, H_2O_2 a H_2MO_4 . Vzorek **E** je signál DMPO-OH aduktu vzniklý reakcí DMPO s albuminem a H_2O_2 po přidání katalasy. Vzorek **F** je signál DMPO-OH aduktu vzniklý reakcí DMPO s albuminem, H_2O_2 a H_2MoO_4 , po přidání katalasy. Vzorky **G** a **H** jsou signály DMPO-OH aduktu vzniklé reakcí DMPO s albuminem, H_2O_2 , H_2MoO_4 , katalasy a NaClO/ $FeSO_4$. Jako reprezentativní vzorek byly vybrána spektra TEMPONE a DMPO-OH aduktu vzorku s 30minutovou inkubací.



Graf č. 2: Porovnání hodnot signálu TEMPONE a DMPO-OH aduktu (vzorky A až D). Každé měření bylo 3x zopakováno a průměrné hodnoty byly opatřeny příslušnou směrodatnou odchylkou.



Graf č. 3: Porovnání hodnot signálu TEMPONE a DMPO-OH aduktu (vzorky E až H). Každé měření bylo 3x zopakováno a průměrné hodnoty byly opatřeny příslušnou směrodatnou odchylkou.

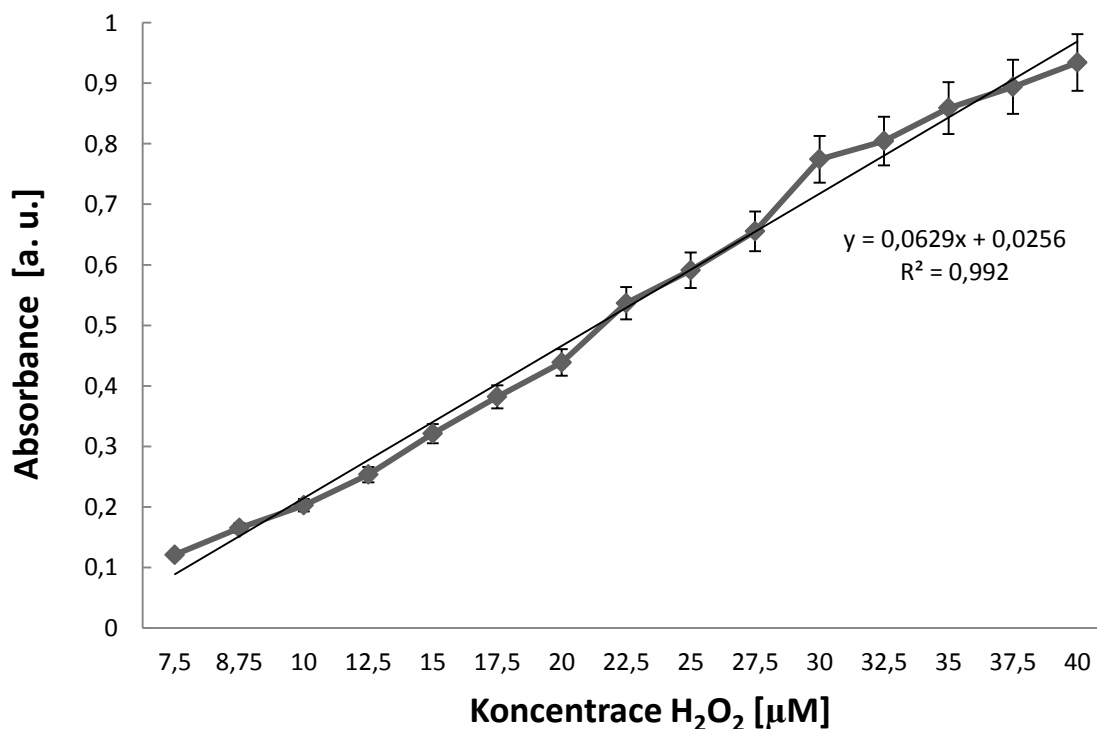
Hodnoty jednotlivých EPR signálů (TEMPONE a DMPO-OH aduktu) byly podobné. Při reakci H₂O₂ s H₂MoO₄, katalasou a NaClO byl naměřen velmi vysoký signál TEMPONE. Po přidání albuminu do reakce s H₂O₂ s H₂MoO₄, katalasou, TEMPONE a NaClO byl naměřen nižší signál TEMPONE než bez albuminu. Při druhé reakci, kdy reagoval albumin s H₂O₂ se tvořil HO• pravděpodobně reakcí H₂O₂ se zbytky přechodných kovů (zejména Fe²⁺) přítomných ve H₂O a následně interagoval s DMPO za tvorby DMPO-OH aduktu. Při reakci albuminu s H₂O₂ a H₂MoO₄ si lze všimnout nižšího signálu DMPO-OH aduktu, který je pravděpodobně důsledkem tvorby ¹O₂ v reakci. Důkazem, že docházelo k tvorbě HO• je pátá a šestá reakce, při kterých byl naměřen velmi malý EPR signál DMPO-OH aduktu v důsledku reakce katalasy s H₂O₂, který rozkládala a tím i eliminovala tvorbu HO• v reakci. Při reakci albuminu s H₂O₂, H₂MoO₄, katalasou a NaClO nebyl detekován skoro žádný signál DMPO-OH aduktu, ale v případě použití FeSO₄ byl naměřen velmi vysoký signál DMPO-OH aduktu. Pravděpodobně docházelo k interakci

mezi H_2O_2 a FeSO_4 a ke vzniku velkého množství HO^\bullet , který následně reagoval s DMPO za vzniku DMPO-OH aduktu.

3.2 Detekce albuminových hydroperoxidů pomocí FOX testu

Singletní kyslík, který se podařilo detekovat v předchozí kapitole, způsoboval oxidativní poškození albuminu, při kterém vznikaly albuminové ROOH. Tyto ROOH se pak detekovaly pomocí FOX testu. Při metodě FOX dochází k redukci ROOH pomocí Fe^{2+} a vzniku komplexů železitých iontů (Fe^{3+}) s XO. Vzniklý komplex XO/ Fe^{3+} je posléze měřen pomocí dvoupaprskového spektrometru při 560 nm.

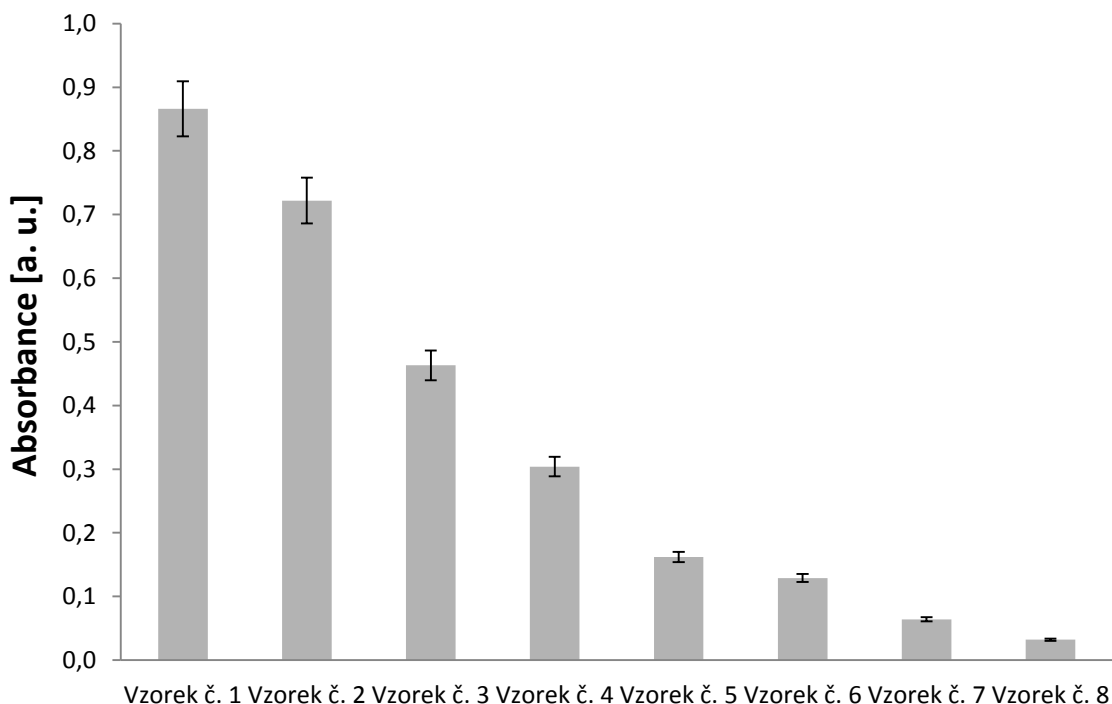
Nejprve byla připravena kalibrační křivka vzrůstající koncentrace H_2O_2 (Graf 4). Koncentrace H_2O_2 se pohybovaly od 7,5 μM po 40 μM . Jako reference (blank) byla použita H_2O a reagenty pro FOX test.



Graf č. 4: Kalibrační křivka pro koncentrace H_2O_2 a v grafu jsou uvedeny průměry ze tří měření s příslušnými směrodatnými odchylkami.

Následně byly připraveny albuminové ROOH (Graf 5), u kterých se měřila jejich hodnota absorpance pomocí FOX testu a posléze byla absorpance albuminových ROOH

přepočtena na koncentrace H_2O_2 pomocí regresní rovnice kalibrační křivky (Tabulka 1). Cílem bylo vytvořit klesající graf absorbance (1-0,1 A.U.) Jednotlivé vzorky byly vždy připraveny stejně (**2.3 příprava proteinových hydroperoxidů**), jen se lišily ve výsledné koncentraci albuminu.



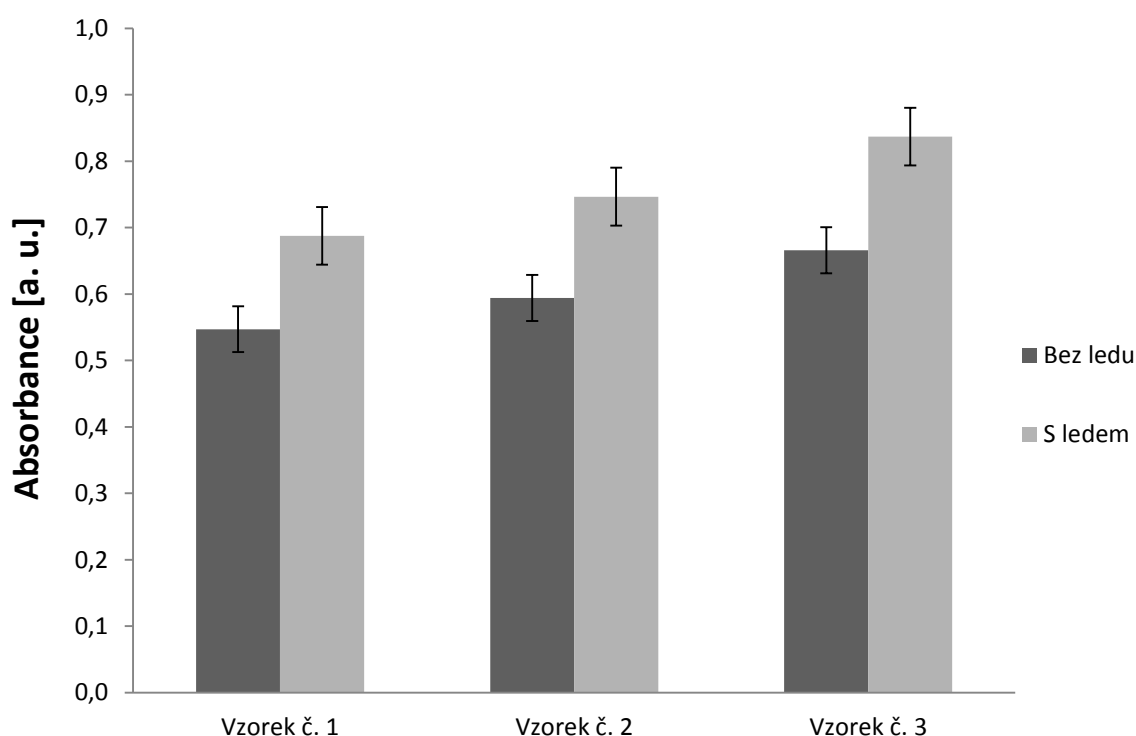
Graf č. 5: Výsledný graf průměrných hodnot absorbance albuminových ROOH vzniklých při FOX experimentu. Hodnota absorbance pro každý vzorek (č. 1–8) byla změřena 3x při 560 nm, posléze zprůměrována a opatřena příslušnou směrodatnou odchylkou.

Koncentrace H_2O_2 [μM]	Absorbance H_2O_2 [r. u.]	Absorbance alb. ROOH [r. u.]	Koncentrace alb. ROOH [mg/ml]	Teor. kon. H_2O_2 [μM]
37,5	0,89	0,886	16,6	37,33
30	0,77	0,722	12,5	28,13
20	0,44	0,463	10	21,05
15	0,32	0,304	8,3	14,25
8,75	0,17	0,162	7,14	8,34
7,5	0,12	0,129	6,25	8,06
5	0,08	0,064	5,55	4
2,5	0,04	0,032	5	2

Tabulka č. 1: Porovnání jednotlivých koncentrací a absorbancí H_2O_2 s koncentracemi a absorbancemi albuminových ROOH. Porovnání hodnot bylo umožněno díky regresní rovnici přímky, která byla vytvořena na

začátku experimentu. Poslední sloupec hodnot odpovídá teoretické dopočítané hodnotě koncentrace H_2O_2 , která odpovídá koncentraci albuminových ROOH. Poslední dvě hodnoty u koncentrace a absorpance H_2O_2 jsou teoretické hodnoty, které byly dopočítány a přidány pro účel porovnání a dopočtu teoretické koncentrace H_2O_2 , která odpovídá jednotlivým naměřeným absorpancím dané koncentrace albuminových ROOH.

V další části experimentu s 1O_2 a albuminými ROOH byl měřen vliv teploty na hodnotu absorpance. Pro tento experiment byly použity vždy 2 stejné vzorky o stejné koncentraci albuminu a postup jejich přípravy byl stejný, jako v kapitole **2.3 příprava proteinových hydroperoxidů**. Vzorky se lišily jen v typu inkubace (bez ledu a s ledem) (Graf 6).



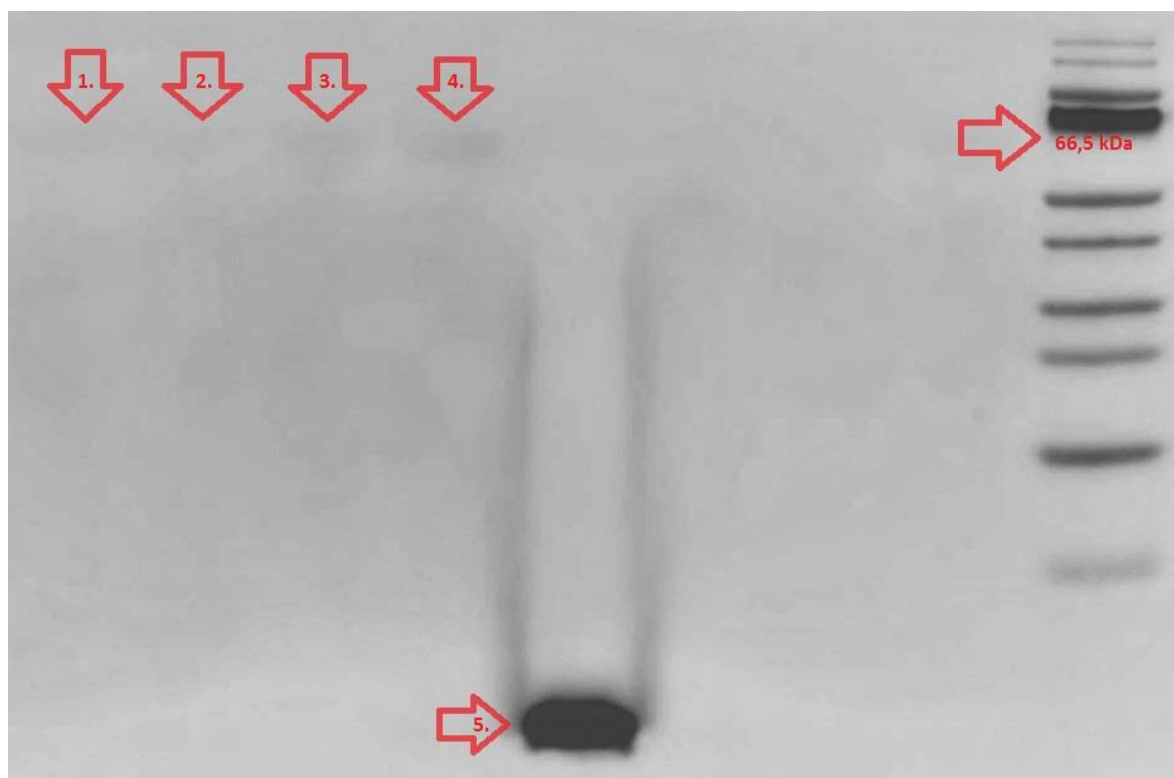
Graf č. 6: Průměrná hodnota absorpance vzorku v ledu a při pokojové teplotě. Každé měření bylo opakováno 3x při 560 nm a průměrné hodnoty absorpance albuminových ROOH byly opatřeny příslušnou směrodatnou odchylkou.

Po zjištění faktu, že hodnoty absorpance, které reprezentují množství vytvořených albuminových ROOH, byly vyšší na ledu, se rozhodlo implementovat tuto skutečnost do všech předchozích (detekce singletního kyslíku a hydroxylové radikálů) a následujících měření (imuno spin-trapping).

3.3 Imuno spin-trapping organických radikálů s vychytávačem spinů DMPO

Princip metody je, že pomocí DMPO se zachytí organické radikály, které společně s DMPO vytvářejí nitronové adukty. Vytvořené nitronové adukty jsou rozeznávány anti-DMPO protilátkou. Protilátka proti DMPO rozeznává jen DMPO, který může být navázán na různé molekuly, a proto je nutná další separace, v případě tohoto měření byla použita separační metoda Western-blot.

Pro vznik organických radikálů byl použit jako v předchozím experimentu za použití FOX testu a EPR spektrometru albumin, který reagoval s H_2O_2 a H_2MoO_4 za vzniku $^1\text{O}_2$ a ten oxidoval albumin pro vznik albuminových ROOH. Vzniklé albuminové ROOH mohly být následně oxidovány pomocí NaClO nebo redukovány FeSO_4 za vzniku organických radikálů (ROO^\bullet a RO^\bullet). Jednotlivé radikály reagovaly s DMPO a vytvářely nitronové adukty. Tyto adukty byly detekovány pomocí protilátky anti-DMPO a zobrazeny v imunoblotu (Obrázek 12).



Obrázek č. 12: *Imunoblot anti-DMPO protilátky imuno spin-trappingu. První vzorek (1.) obsahoval albumin smíchaný s vycytávačem spinů DMPO. Další vzorek (2.) byl připraven z albuminu obohaceného o H_2O_2 , H_2MO_4 a vycytávač spinů DMPO. Následující vzorek (3.) byl připraven z albuminu obohaceného o H_2O_2 , H_2MO_4 , katalasu a vycytávač spinů DMPO. Poslední dva vzorky (4. a 5.) byly připraveny z albuminu obohaceného o H_2O_2 , H_2MO_4 , katalasu, $NaClO$ nebo $FeSO_4$ a vycytávač spinů DMPO.*

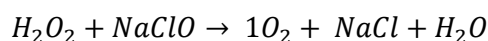
U vzorků 1 až 4 nedošlo k žádnému rozštěpení albuminu a vzniku organických radikálů, které by mohly s DMPO vytvořit nironové adukty detekovatelné anti-DMPO protilátkou. U posledního vzorku albuminu došlo k rozštěpení albuminových ROOH na albuminové RO^\bullet , které vytvořili s DMPO nitronové adukty a ty byly detekovány pomocí anti-DMPO protilátky.

Dosažené výsledky imuno spin-trappingu rozšiřují výsledky z předchozí kapitoly a pomohly detekovat albuminové RO^\bullet vznikající z albuminových ROOH, které se pomocí EPR spin-trappingu nepodařilo detekovat.

4. Diskuze

V reakci H_2O_2 a H_2MoO_4 s albuminem vznikají albuminové ROOH, u kterých oxidací pomocí NaClO vzniká 1O_2 přes Russellův mechanismus z ROO^\bullet (Miyamoto a kol., 2007). Singletní kyslík vzniká rozpadem z ROOOOR meziprojektu vzniklého ze dvou ROO^\bullet přenosem α -vodíku za současného přenosu energie. Dále může vznikat 1O_2 i při reakci HClO s ROOH. Při nepřítomnosti albuminu vzniká 1O_2 reakcí H_2O_2 a NaClO (reakce 13) (Greer, 2006).

reakce č. 13



Hydroxylový radikál vzniká interakcí H_2O_2 s ionty přechodných kovů (zejména Fe^{2+}) Fentonovou reakcí (reakce 14) (Merz a Waters, 1947).

reakce č. 14



Záměrem diplomové práce bylo detekovat 1O_2 pomocí vychytávače spinů TEMPD a radikál HO^\bullet za pomocí vychytávače spinů DMPO. Byly detekovány vysoké signály TEMPONE a DMPO-OH aduktu pomocí EPR.

Přidání katalasy mělo za následek úplné potlačení signálu DMPO-OH aduktu, z čehož vyplývá, že v předchozím měření byl detekován HO^\bullet vzniklý Fentovou reakcí H_2O_2 se zbytky iontů přechodných kovů (Fe^{2+}) (reakce 14). Přidání NaClO nemělo žádný vliv na signál DMPO-OH aduktu, ale přidání $FeSO_4$ mělo. Tato skutečnost potvrdila interakci mezi zbylým H_2O_2 , který se katalase nepodařilo rozložit a Fe^{2+} z $FeSO_4$. Jejich interakce vytvářela Fentonův systém, které generuje HO^\bullet radikál (reakce 14). Hydroxylový radikál interagoval s vychytávačem spinů DMPO za tvorby DMPO-OH aduktu.

Singletní kyslík, který se podařilo detekovat v předchozím měření pomocí TEMPD, způsoboval oxidativní poškození albuminu, které vedlo k vytváření albuminových ROOH. Albuminové ROOH byly detekovány pomocí FOX testu, při které dochází k redukci ROOH

pomocí Fe^{2+} a vzniku Fe^{3+} komplexů s XO. Komplexy Fe^{3+}/XO byly detekovány při 560 nm. Albuminové ROOH nebyly nejstabilnější při pokojové teplotě a tato domněnka byla potvrzena měřením, kdy vzorky uchovávané při pokojové teplotě měly až o 25 % nižší absorpenci při 560 nm než vzorky uchovávané na ledu.

Poslední měření pomocí metody imuno spin-trapping potvrdilo rozpad ROOH na RO^{\bullet} radikály pomocí iontů přechodného kovu (Fe^{2+}) (reakce 15).

reakce č. 15



Detekce proběhla pomocí anti-DMPO protilátky, která rozeznává DMPO nitronové adukty, vzniklé interakcí DMPO s organickými radikály. Jiné organické radikály, které mohly vznikat z albuminových ROOH (např. ROO^{\bullet} a R^{\bullet}), nebyly pomocí EPR spektrometrie ani pomocí metody imuno spin-trapping detekovány.

Na základě těchto výsledků lze vyvodit závěr, že vzniká mnohem více 1O_2 reakcí H_2O_2 s NaClO než přes Russellův mechanismus. Hydroxylový radikál vzniká při interakci H_2O_2 s ionty přechodného kovu (Fe^{2+}) a může být následně eliminován rozkladem H_2O_2 katalasou. Při interakci ROOH s ionty přechodného kovu (Fe^{2+}) vznikají RO^{\bullet} radikály detekovatelné pomocí metody imuno spin-trapping.

5. Závěr

Výzkum týkající se ROS se v současné době zabývá jejich důkladnější charakterizací, účinků na lidský, rostlinný, ale i bakteriální organismus, dále pak jejich rolí v buněčné signalizaci, boji proti infekci, stárnutí a apoptóze buněk. Nové technologie jako je imuno spin-trapping pomáhají v současných výzkumech detekovat ROS a tím i objevovat další nové funkce ROS, o kterých se v minulosti nevědělo.

Cílem diplomové práce bylo vytvořit a následně detekovat organické radikály vznikající rozpadem ROOH v albuminu pomocí EPR spektrometrie, FOX testu a imuno spin-trappingu. Pro tento účel byly použity oxidační činidla H_2O_2 , H_2MoO_4 , NaClO a redukční činidlo FeSO_4 v kombinaci s vycytávači spinů TEMPD a DMPO.

Výsledky lze shrnout do několika dílčích závěrů.

Při použití H_2O_2 s H_2MoO_4 , NaClO a vycytávače spinů TEMPD byl detekován vysoký signál TEMPONE a při přidání albuminu do stejné reakce byl tento signál mnohem menší.

Při použití albuminu s H_2O_2 a vycytávače spinů DMPO byl detekován vysoký signál DMPO-OH aduktu. Při přidání H_2MoO_4 do reakce bylo dosaženo také velmi vysokého signálu DMPO-OH aduktu, ale signál byl nižší, protože docházelo k tvorbě $^1\text{O}_2$, který signál DMPO-OH aduktu snížil. Katalasa eliminovala signál DMPO-OH aduktu ve vysoké míře v obou případech. Přidání NaClO nevedlo k jinému výsledku, ale přidání FeSO_4 vedlo k detekci vysokého signálu DMPO-OH aduktu.

Měření pomocí FOX test ověřilo tvorbu ROOH reakcí albuminu s H_2O_2 a H_2MoO_4 .

Metoda imuno spin-trapping detekovala RO^\bullet radikály vzniklé rozpadem ROOH pomocí FeSO_4 .

6. Seznam použitých zkratek

AA	Asorbát peroxidasa
Cu^{2+}	Měďnatý kationt
DHA	Dehydroaskorbát
DMPO	5,5-dimethyl-1-pyrrolin
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EPR	Eletronová paramagnetická rezonance
Fe^{2+}	Železnatý iont
FeSO_4	Síran železnatý
GPx	Glutathion peroxidasa
GSH	Redukovaný glutathion
GSSG	Oxidovaný glutathion
H^+	Vodíkový kationt
HClO	Kyselina chlorná
HO^\bullet	Hydroxylový radikál
H_2O	Voda
H_2O_2	Peroxid vodíku
H_2MoO_4	Kyselina molybdenová
MNP	2-methyl-2-nitrosopropan
NaClO	Sodná sůl kyseliny chlorné
PBN	α -phenyl-N-tert-butylnitron
POBN	α -(4-pyridyl N-oxid)-N-tert-butylnitron
O	Atom kyslíku
O_2	Molekula kyslíku
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Superoxidový aniontový radikál
$^1\text{O}_2$	Singletní kyslík
ONOO^-	Peroxytrát
R^\bullet	Lipidový nebo proteinový alkylový radikál
RO^\bullet	Lipidový nebo proteinový alkoxylový radikál
ROO^\bullet	Lipidový nebo proteinový peroxylový radikál
ROOOOR	Tetroxid
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SOD	Superoxid dismutasa
TMPO	3,3,5,5-tetramethyl-1-pyrrolin
TEMPD	2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidin

7. Seznam použité literatury

Adamic, K., Howard, J. A., and Ingold, K. U. Absolute rate constants for hydrocarbon autoxidation. XIV. Reactions of peroxy radicals at low temperatures. *Can. J. Chem.* 47, 3803–3808; 1969.

Alscher, R. G., Erturk, N., and Heath, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 53, 1331–1341; 2002.

Ames, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 221, 1256–1264; 1983.

Ansenberger-Fricano, K., Ganini, D., Mao, M., Chatterjee, S., Dallas, S., Mason, R. P., Stadler, K., Santos, J. H., and Bonini, M. G., The peroxidase activity of mitochondrial super-oxide dismutase. *Free Radical Biol. Med.* 54, 116–124; 2013.

Anzai, K., Aikawa, T., Furukawa, Y., Mastsushima, Y., Urano, S., and Ozawa T. ESR measurement of rapid penetration of DMPO and DEPMPO spin traps through lipid bilayer membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 415, 251–256; 2003.

Ayala, A., Munoz, M. F., and Arguelles, S. Lipid peroxidation: production, metabolism and signaling mechanism of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014, 360438–360438; 2014

Bartlet, P. D., and Guaraldi, G. Di-tert-butyl trioxide and di-tert-butyl tertoxide. *J. Am. Chem. Soc.* 1967, 4799–4801; 1967.

Baynes, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40, 405–412; 1991.

Bell, E. R., Dickey, F., Raley, J. H., Rust, F. F., and Vaughan, W. E. Reactions of free radicals associated with low temperature oxidation of paraffins. *Ind. Eng. Chem. Res.* 41, 2597; 1951.

Bennett, J. E., Brown, D. M., and Mile, B. Studies by electron spin resonance of the reactions of alkylperoxy radicals. Part 2. Equilibrium between alkylperoxy radicals and tetroxide molecules. *Trans. Faraday Soc.* 66, 397–405; 1970.

Bennett, J. E. Kinetic electron paramagnetic resonance study of the reactions of t-butylperoxyl radicals in aqueous solution. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 86, 3247–3252; 1990.

Berdnikov, V. M., Bazhin, N.M., Federov, V. K., and Polyakov, O. V. Isomerization of the ethoxyl radical to the α -hydroxyethyl radical in aqueous solution. *Kinet. Katal.* 13, 839-846; 1972.

Berliner, J. A., and Heinecke, J. W. *Free Radical Biol. Med.* 20, 707–727; 1996.

Berliner, L. J., Khramstov, V., Fujii, H., and Clanton, T. L. Unique *in vivo* applications of spin traps. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 489–499; 2001.

Bhattacharjee, S., Deterding, L. J., Jiang, J., Bonini, M. G., Tomer, K. B., Ramirez, D. C., and Mason, R. P., Electron transfer between a tyrosyl radical and a cysteine residue in hemoproteins: spin trapping analysis. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 13493–13501; 2007.

Bjelakovic, G., Nikolova, D., Glud, L. L., Simonetti, R. G., and Glud, C. Systematic review: primary and secondary prevention of gastrointestinal cancers with antioxidant supplements. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 28, 689–703; 2008.

Bonini, M. G., Siraki, A. G., Bhattacharjee, S., and Mason, R. P., Glutathione-induced radical formation on lactoperoxidase does not correlate with the enzymes peroxidase activity. *Free Radical Biol. Med.* 42, 958–992; 2007.

Britigan, B. E., Rosen, G. M., Chai, Y., and Cohen, M. S. Neutrophil degranulation inhibits potential hydroxyl-radical formation. Relative impact of myeloperoxidase and lactoferrin release on hydroxyl-radical production by iron-supplemented netrophils assessed by spin-trapping techniques. *J. Biol. Chem.* 261, 4426–4431; 1986.

Buonocore, G., Perrone, S., and Tataranno, M. L. Oxygen toxicity: chemismy and biology of reactive oxygen species. *Semin. Fetal. Neonatal. Med.* 15, 186-190; 2010.

Chen, Y. R., Chen, C. L., Liu, X., Li, H., Zweier, J. L., and Mason, R. P. Involvement of protein radical, protein aggregation, and effects on NO metabolism in the hypochlorite-mediated oxidation of mitochondrial cytochrome c. *Free Radical Biol. Med.* 37, 1591–1603; 2004.

Clement. J. –L., Gilbert, B. C., Rockenbauer, A., and Tordo, P. Radical damage to proteins studied by EPR spin-trapping techniques. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1463–1470; 2001.

Dai, D. F., Santana, L. F., Vermulst, M., Tomazela, D. M., Emond, M. J., MacCoss, M. J., Gollahon, K., Martin, G. M., Loeb, L. A., Ladiques, W. C., and Rabinovitch, P. S. Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging. *Circulation* 119, 2789–2797, 2009.

Davies. M. J. Detection of peroxy and alkoxy radicals produced by reaction of hydroperoxides with rat liver microsomal fractions. *Biochem J.* 257, 603–606; 1989.

Davies, M. J. *Arch. Biochem. Biophys.* 336, 163–172; 1996.

Davies, M. J., Fu, S., and Dean, R. T. *Biochem. J.* 305, 643–649; 1995.

Davies, M. J., Timmins, G. S., Clark, R. J. H., and Hester, R. E. EPR spectroscopy of biologically relevant free radicals in cellular, *ex vivo*, and *in vivo* systems. Biomedical Applications of Spectroscopy, *John Wiley and Sons Ltd.*, 217–266; 1996.

Davies, M. J., and Hawkins, C. L. EPR spin trapping of protein radicals. *Free Radical Biol. Med.* 36, 1072–1086; 2004.

De Groot, J. J. M. C., Veldink, G. A., Vliegthart, J. F. G., Boldingh, J., Wever, R., and van Gelder, B. F. *Biochim. Biophys. Acta* 377, 71–79; 1975.

De La Mare, H. E., and Vaughan, W. E. *J. Chem. Educ.* 34, 64; 1957.

Dean. R. T., Hunt, J. V., Grant, A. J., Yamamoto, Y., and Niki, E. *Free Radical Biol. Med.* 11, 161–168; 1991.

Dean, R. T., Gebicki, J., Giese, S., Grant, A. J., and Simpson, J. A. *Mutat. Res.* 275, 38–393; 1992.

Deterding, L. J., Ramirez, D. C., Dubin, J. R., Mason, R. P., and Tomer, K. B., Identification of free radicals on hemoglobin from its self-peroxidation using mass spectrometry and immuno-spin trapping: observation of a histidiny radical. *J. Biol. Chem.* 279, 11600–11607; 2004.

Dix, T. A., and Marnett, L. J. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 6744, 6746; 1985.

Esterbauer, H. *Am. J. Clin. Nutr.* 57, 779S–786S; 1993.

Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., and Jurgens, G. *Free Radical Biol. Med.* 13, 341–390; 1992.

Finch, C. E. *The Biology of Human Longevity: Inflammation, Nutrition, and Aging in the Evolution of Lifespans*, Academic Press; 2007.

Finkelstein, M. B., Auringer, M. P., Halper, L. A., Linn, T. C., Singh, M., and Srere, P. A. *Eur. J. Biochem.* 99, 209–216; 1980.

Frankel, E. N., Neff, W. E., Bressler, T. R. *Lipids* 14, 961–967; 1979.

Fridovich, I. Superoxide radical and SODs. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 97–112; 1995

Gardner, H. W. *Free Radical Biol. Med.* 7, 65–86; 1989.

Gay, C., and Gebicki, J. M. Perchloric acid enhances sensitivity and reproducibility of the ferric-xylenol orange peroxide assay. *Anal. Biochem.* 304, 42–46; 2002.

Gay, C., and Gebicki, J. M. Measurement of protein and lipid hydroperoxides in biological systems by the ferric-xylenol orange method. *Anal. Biochem.* 315, 29–35; 2003.

Gay, C., Collins, J., and Gebicki, J. M. Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. *Anal. Biochem.* 273, 149–155; 1999.

Gay, C., Collins, J., and Gebicki, J. M. Determination of iron in solutions with the ferric-xylene orange method. *Anal. Biochem.* 273, 143–148; 1999.

Gieseg, S. P. Simpson, J. A., Charlton, T. S., Duncan, M. W., and Dean, R. T. *Biochemistry* 32, 4780–4786; 1993.

Gilbert, B. C., Marshall, P. D. R., Norman, R. O. C., Pineda, N., and Williams, P. S. Electron spin resonance studies. Part 61. The generation and reactions of the t-butoxyl radical in aqueous solution. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1392–1400; 1981.

Girotti, A. W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* 39, 1529–1542; 1998.

Gomez-Mejiba, S. E., Zhai, Z., Akram, H., Deterding, L. J., Hensley, K., Smith, N., Towner, R. A., Tomer, K. B., Mason, R. P., and Ramirez, D. C., Immuno-spin trapping of protein and DNA radicals: „tagging“ free radicals to locate and understand the redox process. *Free. Radical Biol. Med.* 46, 853–865; 2009.

Grant, A. J., Jessup, W., and Dean, R. T. *Biochim. Biophys. Acta.* 1134, 203–209; 1992.

Gray, P, and Williams, A. *The Thermochemistry and Reactivity of Alkoxy Radicals*; 1959.

Greer, A. Christopher Foote's discovery of the role of singlet oxygen [$^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$] in photosensitized oxidation reactions. *Acc. Chem. Res.* 39, 797–804; 2006.

Griffin, B. W., and Ramirez, D. *Bioorg. Chem.* 10, 177–188; 1981.

Guo, Q., Qian, S. Y., and Mason, R.P. Separation and identification of DMPO adducts of oxygen-centered radicals formed from organic hydroperoxides by HPLC-ESR, ESI-MS and MS/MS. *J. Am. Soc. Mass. Spectrum* 14, 862–871; 2003.

Guo, Q., Detweiler, C. D., and Mason, R. P. Protein radical formation during lactoperoxidase-mediated oxidation of the suicide substrate glutathione: immunochemical detection of a lactoperoxidase radical-derived 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide nitron adduct. *J. Biol. Chem.* 279, 13272–13283; 2004.

Gutteridge, J. M., and Halliwell, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899, 136–147; 2000.

Halliwell, B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning), *Free Radical Res.* 31, 261–272; 1999.

Halliwell, B. The antioxidant paradox, *Lancet* 355, 1179–1180; 2000.

Halliwell, B. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 276S–286S; 2005.

Halliwell, B. Oxidative stress and neurodegeneration; where are we now? *J. Neurochem.* 97, 1634–1658; 2006.

Halliwell, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Physiol. Plant.* 141, 312–322; 2006.

Halliwell, B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends Immunol.* 30, 201–208; 2006.

Halliwell, B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem. J.* 401, 1–11; 2007.

Halliwell, B. The wanderings of a free radical. *Free Radical Biol. Med.* 46, 531–542; 2009.

Halliwell, B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 125–130; 2011.

Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. Oxford, Clarendon Press; 1989.

Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. Free radical in biology and medicine. New York: Oxford University Press; 2007.

Halliwell, B., and Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Clin. Pharmacol* 142, 231–255; 2004.

Harman, D. About origin and evolution of free radical theory of aging: a brief personal history, 1954–2009, *Biogerontology* 10, 783; 2009.

Hawkins, J., Grant, C., Noble, W. S., and Bailey, T. L. Assessing phylogenetic motif models for predicting factor binding sites. *Bioinformatics* 25, 339–347; 2009

Howard, J. A. Absolute rate constants for reactions of oxyl radicals. *Adv. Free Radical Chem.* 4, 49–173; 1972.

Howard, J. A. Free Radicals vol 2., 3–63, *Wiley-Interscience*, New York; 1973.

Howard, J. A., and Tait, J. C. *Can. J. Chem.* 56, 176–178; 1978.

Hrycay, E. G., and O'Brien, P. J. *Arch. Biochem. Biophys.* 147, 14–27; 1971.

Hultqvist, M., Olsson, L. M., Gelderman, K. A., and Holmdahl. R. The protective role of ROS in autoimmunedisease. *Trends Immunol.* 30, 201–208; 2009.

Chamulittratt, W., Takahashi, N., and Mason, R. P. Peroxyl, Alkoxy, and Carbon-centered radical formation from organic hydroperoxides by chloroperoxidase. *J. Biol. Chem.* 264, 7889–7899; 1989.

Imlay, J. A. Cellular defences against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 755–776; 2008.

Iwamura, M., and Inamoto, N. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 40, 703; 1967.

Jacob, R. A., Aiello, G. M., Stephensen, C. B., Blumberg, J. B., Milbury, P. E., Wallock, L. M., and Ames, B. M. Moderate antioxidant supplementation has no effect on biomarkers of oxidant damage in healthy men with low fruit and vegetable intakes. *J. Nutr.* 133, 740–743; 2003

Jang, Y. C., Lustgarten, M. S., Liu, Y., Muller, F. L., Bhattacharya, A., Lianq, H., Salmon, A. B., Brooks, S. V., Larkin, L., Hayworth, C. R., Richardson, A., and Van Remmen, H. Increased superoxide *in vivo* accelerates age-associated muscle atrophy through mitochondrial dysfunction and neuromuscular junction degeneration. *FASEB J.* 24, 1376–1390; 2010

Janzen, E. G., Spin Trapping, *Acc. Chem. Res.* 4, 31–40; 1971.

Janzen, E. G., Nutter, D. E., Jr., Davis, E. R., Blackburn, B. J., Poyer, J. L., and McCay, P. B. *Can. J. Chem.* 56, 2237–2242; 1978.

Janzen, E. G., and Haire, D. I. Two decades of spin trapping. *Adv. Free Radical Chem.* 1, 253–295; 1990.

Jessup, W., Dean, R. T., and Gebicki, J. M. *Methods Enzymol.* 233, 289–303; 1994.

Kalyanaraman, B., Motley, C., and Mason R. P. *J. Biol. Chem.* 258, 3855–3858; 1983.

Karnojitzky, V. Les peroxides organiques, *Hermann*, Paris; 1958.

Kochi, J. K., Oxidation-reduction reactions of free radicals and metal complexes, in: Kochi, J. K. (Ed.), *Free Radicals vol. 1, John Wiley and Sons, New York*, 591–683; 1973.

Kroeller-Schoen, S., Steven, S., Kossmann, S., Scholz, A., Daub, S., Oelze, M., Xia, N., Hausding, M., Mikhed, Y., Zinssius, E., Mader, M., Stamm, P., Treiber, N., Scharffetter-Kochanek, K., Li, H., Schulz, E., Wenzel, P., Muenzel, T., and Daiber, A. Molecular Mechanisms of the Crosstalk Between Mitochondria and NADPH Oxidase Through Reactive Oxygen Species-Studies in White Blood Cells and in Animal Models. *Antioxid. Redox Signaling* 20, 247–266; 2014.

Kyaw, M., Yoshizumi, M., Tsuchiya, K., Izawa, Y., Kanematsu, Y., and Tamaki, T. Atheroprotective effects of antioxidants through inhibition of mitogen-activated protein kinases, *Acta Pharmacol Sin*, 25, 977–985; 2004.

Lagercrantz, C. Spin trapping of some short-lived radicals by the nitroxide method. *J. Phys. Chem.* 75, 3466–3475; 1971.

Lambeth, J. D. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free Radical Biol. Med.* 43, 332–347, 2007.

Lardinois, O. M., Detweiler, C. D., Tomer, K. B., Mason, R. P., and Deterding, L. J., Identifying the site of spin trapping in proteins by a combination of liquid chromatography, ELISA, and off-line tandem mass spectrometry. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 893–906; 2008.

Leffler, J. E. *Chem. Rev.* 45, 385; 1949.

Loke, W. M., Hodgson, J. M., Proudfoot, J. M., McKinley, A. J., Puddey, I. B., and Croft, K. D. Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men. *Am. J. Clin. Nutr.* 88, 1018–1025; 2008.

Merz, J. H., and Waters, W. A. Electron-transfer reactions. The mechanism of oxidation of alcohols with Fenton's reagent. *Faraday Soc.* 2, 179–188; 1947.

Markesbery, W. R. *Free Radical Biol. Med.* 23, 134–147; 1997.

Mason, R. P., Using anti-5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (anti-DMPO) to detect protein radicals in time and space with immuno-spin trapping. *Free Radical Biol. Med.* 36, 1214–1223; 2004.

McCord, J. M., and Fridovich, I. Superoxid dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 25. 6049-55; 1969.

Miyamoto, S., Ronsein, G. E., Prado, F. M., Uemi, M, Correa, T. C., Toma, I. N., Bertolucci, A., Oliveira, M. C. B., Motta, F. D., Medeiros, M. H. G., and Di Mascio, P. Biological hydroperoxides and singlet oxygen generation. *Life* 59, 322–331, 2007.

Moller, P., and Loft, S. Oxidative DNA damage in human white blood cells in dietary antioxidant intervention studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 303–310; 2002.

Morgan, P. E., Pattison, D. I., Hawkins, C. L., and Davies, M. J. Separation, detection, and quantification of hydroperoxides formed at side-chain and backbone sites on amino acids, peptides, and proteins. *Free Radical Biol. Med.* 45, 1279–1289; 2008.

Morgenstern, D. E. Absence of respiratory burst in X-linked chronic granulomatous disease mice leads to abnormalities in both host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus*. *J. Exp. Med.* 185, 207–218, 1997.

Neta, P., Huie, R. E., and Ross, A. B. Rate constants for reactions of peroxy radicals in fluid solutions. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 19, 413–513; 1990.

Niki, E., Yokoi, S., Tsuchiya, J., and Kamiya, Y. *J. Am. Chem. Soc.* 105, 1498–1503; 1983.

Ohto, N., Niki, E., and Kamiya, Y. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1770–1774; 1977.

Otamiri, T., and Sjodahl, R. *Cancer* 64, 422–425; 1989.

Pacifici, R. E., and Davies, K. J. A. *Methods Enzymol.* 186, 485–502; 1990.

Palomero, J., and Jackson, M. R. Redox regulation in skeletal muscle during contractile activity and aging. *J. Anim. Sci.* 88, 1307–1313; 2010

Perkins, M. J. Spin Trapping, *Adv. Phys. Org. Chem.* 17, 1–64; 1980.

Pfab, J. *Tetrahedron Lett.* 843–846; 1978.

Pokorný, J. Antioxidanty ve výživě moderního člověka. *Chemické listy*. č. 7. 99, 454; 2005.

Porter, N. A. Free Radicals in Biology vol. 4., 261–294, *Academic Press*, New York; 1980.

Pospíšil, P., Prasad, A., Rác, M., and Rastogi, A. Mechanistic aspects on the formation of electronically excited species by metabolic oxidative process – role of reactive oxygen species.; 2013.

Pou, S., Cohen, M. S., Britigan, B. E., and Rosen, G. M. *J. Biol. Chem.* 264, 12299–12302; 1989.

Rahimtula, A. D., and O'Brien, P. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 70, 893–899; 1976.

Ramirez, D. C., and Mason, R. P., Immuno-spin trapping: detection of protein-centered radicals. *Current Protocols in Toxicology* (eds, Costa, L. G., Maines, M. D., Reed, D. J., Sassa, S. & Sipes, I. G.) 17.7.1–17.7.16, *John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA*; 2005.

Ramirez, D. C., Chen, Y. R., Corbett, J., and Mason, R. P., Detection of hemoglobin-tyrosyl-radical derived nitron adducts by immuno-spin trapping. A first application to *in vivo* toxicology. *Free Radical Biol. Med.* 33, 434; 2002.

Ramirez, D. C., Chen, Y. R., and Mason, R. P., Immunochemical detection of hemoglobin-derived radicals formed by reaction with hydrogen peroxide: involvement of a protein-tyrosyl radical. *Free Radical Biol. Med.* 34, 830–839; 2003.

Ramirez, D. C., Gomez-Mejiba, S. E., and Mason, R. P., Mechanism of hydrogen peroxide-induced, Cu, Zn-superoxide dismutase-centered radical formation as explored by immuno-spin trapping: the role of copper- and carbonate radical anion-mediated oxidations. *Free Radical Biol. Med.* 38, 201–214; 2005.

Ramirez, D. C., Gomez-Mejiba, S. E., and Mason, R. P., Immuno-spin trapping analyses of DNA radicals. *Nat. Protoc.* 2, 512–522, 2007.

Ramirez, D. C., Gomez-Mejiba, S. E., Corbett, J. T., Deterding, L. J., Tomer, K. B., and Mason, R. P., Cu, Zn-superoxide dismutase-driven free radical modifications: copper- and carbonate radical anion-initiated protein radical chemistry. *Biochem. J.* 417, 314–353; 2009.

Ramos, C. L., Pou, S., Britigan, B. E., Cohen, M. S., and Rosen, G. M. Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes. *J. Biol. Chem.* 267, 8307–8312; 1992.

Ranguelova, K., Bonini, M. G., and Mason, R. P., (Bi) sulfite oxidation by copper, zinc-superoxide dismutase: sulfite-derived, radical-initiated protein radical formation. *Environ. Health Perspect.* 118, 970–975; 2010.

Ravanat, J. L.; Di Mascio, P.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G., and Cadet, J. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. *J. Biol. Chem.* 275, 40601–40604; 2000.

Recknagel, R. O., Glende, E. A., Jr., and Hruszkewycz, A. M. Free Radicals in Biology vol. 3., 97–132, *Academic Press*, New York, 1977.

Ristow, M., Zarse, K., Oberbach, A., Klötting, N., Birringer, M., Kiehntopf, M., Stumvoll, M., Kahn, C. R., and Blüher, M. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 8665–8670; 2009.

Rhee, S. G. Cell signaling: H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science* 312, 1882–1883; 2006.

Rosen, G. M., and Rauckman, E. J. *Mol. Pharmacol* 17, 233–238; 1980.

Rosen, G. M., Beselman, A., Tsai, P., Pou, S., Mailer, C., Ichikawa, K., Robinson, B. H., Nielsen, R., Halpern, H. J., and MacKerell Jr., A. D. Influence of conformation on the EPR spectrum of 5,5-dimethyl-1-hydroperoxy-1-pyrrolidinyloxy: A spin trapped adduct of superoxide. *J. Org. Chem.* 69, 1321–1330; 2004.

Rowley, D., Gutteridge, J. M. C., Blake, D., Farr, M., Halliwell, B. *Clin. Sci.* 66, 691–695; 1984.

Rytter, E., Johansson, C., Vessby, B., Sjödin, A., Möller, L., Akesson, B., and Basu, S. Biomarkers of oxidative stress in overweight men are not influenced by a combination of antioxidants. *Free Radical Res.* 44, 522–528; 2010.

Shi, X., Zhanq, Y., Zhenq, J., and Pan, J. Reactive oxygen species in cancer stem cells. *Antioxid. Redox. Signaling* 16, 1215–1228; 2012.

Sies, H. Oxidative Stress. Oxidants and Antioxidants. New York, *Academic Press*; 1991.

Simpson, J. A., Narita, S., Gieseg, S., Gebicki, S., Gebicki, J. M., and Dean, R. T. Long-lived reactive species on free-radical damaged proteins. *Biochem. J.* 282, 621–624; 1992.

Simpson, J. A., Gieseg, S. P., and Dean, R. T. Free radical and enzymatic mechanisms for the generation of protein bound reducing moieties, *Biochim. Biophys. Acta* 1156, 190–196; 1993

Siraki, A. G., Bonini, M. G., Jiang, J., Ehrenshaft, M., and Mason, R. P., Aminoglutethimide-induced protein free radical formation on myeloperoxidase: a potential mechanism of agranulocytosis. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1038–1045; 2007.

Siraki, A. G., Deterding, L. J., Bonini, M. G., Jiang, J., Ehrenshaft, M., Tomer, K. B., and Mason, R. P., Procainamide, but not N-acetylprocainamide, induced protein free radical formation on myeloperoxidase: a potential mechanism of agranulocytosis. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 1143–1153; 2008.

Slater, T. F. *Biochem. J.* 222, 1–15; 1984.

Spiteller, G. *Chem. Phys. Lipids* 95, 105–162; 1998.

Štípek, S. a kol. Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci; Praha: *Grada Publishing, Avicenum*, 314, 08–7169–704–4; 2000

Terao, J., Matsushita, S. J. Products formed by photosensitized oxidation of unsaturated fatty acid esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 54, 234–238; 1977.

Tulah, A. S., and Birch-Machin, M. A. Stressed out mitochondria: The role of mitochondria in ageing and cancer focussing on strategies and opportunities in human skin. *Mitochondrion* 13, 444–453; 2013.

Ursini, F., and Bindoli, A. The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. *Chem. Phys. Lipids* 44, 255–276; 1987.

Valko, M., Izakovic, M., and Mazur, M. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Cell Biochem.* 266, 37–56; 2004.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., and Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 39, 44–84; 2007.

Villamena, F. A., and Zweier, J. I. Detection of reactive oxygen and nitrogen species by EPR spin trapping. *Antioxid. Redox. Signaling* 6, 619–629; 2004.

Vliegenthart, J. F. G., and Veldink, G. A. Free Radicals in Biology vol. 4.,295–319, *Academic Press*, New York; 1982.

Vojta, L., Carić, D., Cesar, V., Dunić, J. A., Lepeduš, H., Kveder, M., and Fulgosi, H. TROL-FNR interaction reveals alternative pathways of electron partitioning in photosynthesis. *Sci. Reports* 5; 2015.

von Sonntag, C. The Chemical Basis of Radiation Biology, London, *Taylor and Francis*; 1987.

von Sonntag, C., and Schuchmann, J. –P. Peroxyl radicals in aqueous solution, in: Z. B. Alfassi (Ed.). Peroxyl Radicals, *John Wiley and Sons*, Chichester, 173–234; 1997.

Walling, C. Free Radicals in Solution, *J. Wiley and Sons, Inc.*, New York; 1957.

Waters, W. A. The Chemistry of Free Radicals, *Oxford University Press, London*; 1952.

Witting, L. A. Free Radicals in Biology vol. 4.,295–319, *Academic Press*, New York; 1980.

Wolff, S. P. Ferrous ion oxidation in presence of ferric iron indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods. Enzymol.* 233, 182–189; 1994.

Xu, H., Perez-Cuevas, R., Xiong, X., Reyes, H., Roy, C., Julien, P., Smith, G., von Dadelszen, P., Leduc, L., Audibert, F., Moutquin, J. M., Piedboeuf, B., Shatenstein, B., Parra-Cabrera, S., Choquette, P., Winson, S., Wood, S., Benjamin, A., Walker, M., Helewa, M., Dubé, J., Tawaqi, G., Seaward, G., Ohlsson, A., Maqee, L. A., Olatunbosun, F., Gratton, R., Shear, R., Demianczuk, N., Collet, J. P., Wei, S., Fraser, W. D. An international trial of antioxidants in the prevention of preeclampsia (INTAPP). *Am. J. Obstet. Gynecol.* 202, 239.e1–e10; 2010.

Yamada, T., Niki, E., Yokoi, S., Tsuchiya, J., Yamamoto, Y., and Kamiya, Y. *Chem. Phys. Lipids* 36, 189–196; 1984.