

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

KATEDRA BIOFYZIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Stanovení sekundárních produktů lipidové peroxidace v kožních  
buňkách**



Vypracoval(a): Bc. Vendula Paculová

Studijní obor: Biofyzika

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



Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Stanovení sekundárních produktů lipidové peroxidace v kožních buňkách“ vypracovala samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury.

V Olomouci dne .....

.....

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování doc. RNDr. Pavlu Pospíšilovi, Ph.D. za jeho cenné rady a trpělivost při vedení mé diplomové práce. Rovněž bych chtěla poděkovat Mgr. Radku Ostruzkovi za pomoc v experimentální části a Mgr. Dominice Valáškové za pomoc při statistickém zpracování dat.

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora:	Vendula Paculová
Název práce:	Stanovení sekundárních produktů lipidové peroxidace v kožních buňkách
Typ práce:	diplomová
Pracoviště:	katedra biofyziky
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Pavel Pospíšil, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2022

### **Abstrakt:**

Cílem této práce bylo stanovení sekundárních produktů lipidové peroxidace v kožních buňkách. Byla sledována lipidová peroxidace vyvolaná vlivem reaktivních forem kyslíku, která se podílí hlavně na lipidové peroxidaci polynenasycených mastných kyselin. K iniciaci lipidové peroxidace byl použit azoiniciátor AAPH. Analýza izolovaných produktů z kožních buněk byla provedena pomocí HPLC-PDA s využitím derivatizačního činidla DNPH. Byly detekovány dva sekundární produkty lipidové peroxidace a to MDA-DNPH a hexanal-DNPH adukt u kterých byl zaznamenán nárůst po použití AAPH při 15, 30, 45 a 60 min. Následně byl sledován vliv dvou antioxidantů a to kyseliny askorbové a alfa tokoferolu na tvorbu MDA-DNPH a hexanal-DNPH aduktu. Oba antioxidanty zvýšili tvorbu MDA-DNPH aduktu. Nicméně u hexanal-DNPH aduktu došlo k poklesu jeho tvorby. Domníváme se, že antioxidanty se v tomto případě chovají jako prooxidanty a pokles hexanal-DNPH aduktu je způsoben ovlivněním tvorby hydroperoxidů z kyseliny linolové, které jsou jeho prekurzorem.

Klíčová slova:	lipidová peroxidace, kůže, MDA, hexanal, AAPH, HPLC, reaktivní formy kyslíku
Počet stran:	42
Počet příloh:	0
Jazyk:	český

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname: Vendula Paculová

Title of thesis: Determination of secondary products of lipid peroxidation in skin cells

Type of thesis: Diploma

Department: Department of biophysics

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

The year of defence: 2022

### **Abstract:**

The aim of this thesis was to determine secondary products of lipid peroxidation in skin cells. Lipid peroxidation mediated by reactive oxygen species was studied as they are mainly involved in lipid peroxidation of polyunsaturated fatty acids. The azoinitiator AAPH was used to initiate lipid peroxidation. Analysis of isolated skin cell lipid peroxidation products was performed by HPLC-PDA using DNPH derivatizing reagent. Two secondary lipid peroxidation products were detected, MDA-DNPH and hexanal-DNPH adduct, which showed an increase after AAPH treatment for 15, 30, 45 and 60 min. Subsequently, the effect of two antioxidants, ascorbic acid and alpha tocopherol, on the formation of MDA-DNPH and hexanal-DNPH was studied. Both antioxidants increased the formation of MDA-DNPH adduct. However, the hexanal-DNPH adduct decreased. We assumed that antioxidants act as prooxidants in this case and the decrease of hexanal-DNPH adduct was due to the effect of the formation of hydroperoxides from linoleic acid, which are its precursors.

Key words: lipid peroxidation, skin, MDA, hexanal, AAPH, HPLC, reactive oxygen species

Number of pages: 42

Number of attachments: 0

Language: czech

## Seznam zkratek

AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochlorid
ROS	reaktivní formy kyslíku
MDA	malondialdehyd
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
DNPH	2,4-dinitrofenylhydrazin
$O_2^{\bullet-}$	superoxidový aniontový radikál
$HO^{\bullet}$	hydroxylový radikál
$RO^{\bullet}$	alkoxylový radikál
$ROO^{\bullet}$	peroxylový radikál
$H_2O_2$	peroxid vodíku
HClO	kyselina chlorná
$O_3$	ozon
$^1O_2$	singletní kyslík
$O_2$	molekulární kyslík
$HO_2^{\bullet}$	Hydroperoxylový radikál
SOD	superoxid dismutasa
SOO	superoxid oxidasa
SOR	superoxid reduktasa
$Fe^{2+}$	železnatý kationt
$Fe^{3+}$	železitý kationt
In	iniciátor
ROOOOR	tetraoxid
ROOH	hydroperoxid

$\alpha$ -TOH	alfa tokoferol
$\alpha$ -TO $\cdot$	alfa tokoferolový radikál
$\alpha$ -TQ	alfa tokoferol chinon
ROH	hydroxy mastné kyseliny
ATP	adenosintrifosfát
FADH <sub>2</sub>	flavinadenindinukleotid
PDI	protein disulfid izomerasa
AA	kyselina askorbová
AscH <sub>2</sub>	askorbát
Asc $\cdot^-$	askorbát radikál
NaOH	hydroxid sodný
HClO <sub>4</sub>	kyselina chloristá
Ero1	oxidoreduktin 1 endoplazmatického retikula



# Obsah

1. Úvod .....	1
2. Přehled problematiky.....	2
2.1 Reaktivní formy kyslíku .....	2
2.1.1 Vlastnosti vybraných anorganických ROS .....	3
2.1.1.1 Superoxidový aniontový radikál.....	3
2.1.1.2 Peroxid vodíku.....	3
2.1.1.3 Hydroxylový radikál.....	4
2.1.2 Vlastnosti vybraných organických ROS .....	5
2.1.2.1 Uhlíkový radikál.....	5
2.1.2.2 Peroxylový radikál .....	5
2.1.2.3 Alkoxylový radikál .....	5
2.2 Lipidová peroxidace .....	5
2.2.1 Primární produkty lipidové peroxidace.....	7
2.2.2 Sekundární produkty lipidové peroxidace .....	7
2.3 Tvorba reaktivních forem kyslíku v kůži.....	8
2.3.1 Mitochondriální produkce ROS.....	8
2.3.2 Peroxisomální produkce ROS .....	9
2.3.3 Produkce ROS v endoplazmatickém retikulu .....	9
2.3.4 Produkce ROS v membránách a cytosolu .....	9
2.3.5 Tvorba ROS pomocí azoiniciátoru AAPH .....	10
2.4 Produkty lipidové peroxidace v kůži .....	10
2.4.1 Lipidy v kožních buňkách.....	11
2.4.2 Lipidové peroxidace cholesterolu .....	12
2.4.3 Lipidová peroxidace nenasycených mastných kyselin .....	13
2.4.4 Lipidová peroxidace skvalenu .....	16
2.5 Antioxidanty .....	17
2.5.1 Kyselina askorbová.....	17
2.5.2 Alfa-tokoferol .....	18
3. Cíl práce.....	19
4. Materiál a metody.....	20
4.1 Použité chemikálie .....	20
4.2 Izolace sekundárních produktů lipidové peroxidace z kůže.....	20
4.3 Ošetření vzorků AAPH a antioxidanty .....	21
4.4 HPLC analýza karbonylových sloučenin .....	22
4.5 Analýza standardů absorpčním spektrometrem.....	22

4.6 Statistické zpracování dat.....	22
5. Výsledky.....	23
5.1 Tvorba karbonylových sloučenin po aplikaci azoiniciátoru na kožní buňky.....	23
5.2 Vliv vybraných antioxidantů na tvorbu malondialdehydu a hexanalů.....	30
6. Diskuze.....	33
7. Závěr.....	36
8. Seznam literatury .....	38

# 1. Úvod

Kůže je největším orgánem těla a zastává několik důležitých funkcí. Tvoří především ochrannou bariéru před účinkem vnějších chemických a fyzikálních vlivů. Mezi tyto vnější vlivy se řadí i reaktivní formy kyslíku, které zvyšují oxidativní stres a mohou degradovat biomolekuly mezi které se řadí i lipidy. Lipidová peroxidace je proces oxidace lipidů, který vytváří široké množství produktů. Lipidová peroxidace může probíhat třemi mechanismy a to enzymaticky, neenzymaticky a neenzymaticky za pomoci reaktivních forem kyslíku. Tato diplomová práce je zaměřena na lipidovou peroxidaci pomocí reaktivních forem kyslíku. Nejvíce zastoupenými lipidy v kůži jsou cholesterol, skvalen a volné mastné kyseliny. Lipidové peroxidaci vyvolané reaktivními formami kyslíku podléhají hlavně polynenasycené mastné kyseliny. Nejvíce zastoupenými polynenasycenými mastnými kyselinami v kůži jsou kyselina linolová a arachidonová.

Produkty lipidové peroxidace můžeme rozdělit na primární a sekundární. Mezi primární produkty lipidové peroxidace polynenasycených mastných kyselin patří hydroperoxydy. Z těchto hydroperoxidů pak dalšími reakcemi mohou vznikat sekundární produkty lipidové peroxidace. Nejvíce studovanými sekundárními produkty lipidové peroxidace jsou malondialdehyd, 4-hydroxynonenal, akrolein nebo hexanal. Malondialdehyd a 4-hydroxynonenal jsou považovány za spolehlivé biomarkery lipidové peroxidace a byly u nich pozorovány mutagenní a toxické účinky.

Antioxidanty mají schopnost omezovat oxidaci biomolekul a chrání před reaktivními formami kyslíku a oxidativním poškozením. Antioxidanty můžeme rozdělit do dvou skupin, a to na endogenní, kam patří enzymy jako superoxid dismutasa nebo katalasa, a na exogenní kam můžeme zařadit např. kyselinu askorbovou nebo alfa tokoferol. Nicméně některé antioxidanty za určitých podmínek mohou mít prooxidační vlastnosti a tím podporovat oxidaci biomolekul.

## 2. Přehled problematiky

### 2.1 Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou reaktivní molekuly skládající se z jednoho, dvou nebo tří atomů kyslíku. V biologických systémech vznikají jako sekundární produkty metabolismu a v nízkých koncentracích se podílejí na buněčné signalizaci a homeostázi (Dröge 2002). Nicméně nekontrolovaný nárůst tvorby ROS vede k oxidačnímu stresu, během kterého může docházet k poškození proteinů, lipidů, polysacharidů a nukleových kyselin (Wiseman, Halliwell 1996, Stadtman, Levine 2000).

Reaktivní formy kyslíku mohou být rozděleny do dvou skupin, a to na radikálové a neradikálové (Kohen, Nyska 2002). Radikálové ROS obsahují alespoň jeden nepárový elektron na atomu kyslíku, díky čemuž jsou vysoce reaktivní. Mezi radikálové ROS se řadí superoxidový aniontový radikál ( $O_2^{\bullet-}$ ), hydroxylový radikál ( $HO^{\bullet}$ ), peroxylový radikál ( $ROO^{\bullet}$ ) a alkoxylový radikál ( $RO^{\bullet}$ ). Neradikálové ROS na rozdíl od radikálových neobsahují na své molekule nepárový elektron, nicméně některé z nich mohou působit jako oxidační činidla. Patří mezi ně peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ), kyselina chlorná ( $HClO$ ), ozon ( $O_3$ ) a singletní kyslík ( $^1O_2$ ).

Další možností rozdělení ROS je na anorganické a organické. Mezi anorganické ROS řadíme např.  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  a  $HO^{\bullet}$ . Organické ROS jsou ekvivalenty těchto anorganických, ale nepárový elektron se nachází na organické sloučenině. Mohou být kyslíkové, kam se řadí  $RO^{\bullet}$  a  $ROO^{\bullet}$ , a uhlíkové kam patří uhlíkový (alkylový) radikál ( $R^{\bullet}$ ).

Hlavními zdroji endogenních ROS jsou mitochondrie, plazmatická membrána, endoplazmatické retikulum a peroxysomy (Moldovan, Moldovan 2004). Zdrojem exogenních ROS může být například ionizující záření, UV záření, tabákový kouř nebo vystavení toxinům, herbicidům a insekticidům.

## 2.1.1 Vlastnosti vybraných anorganických ROS

### 2.1.1.1 Superoxidový aniontový radikál

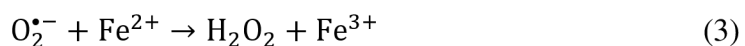
Superoxidový aniontový radikál je jedním z nejrozšířenějších ROS vznikající jak neenzymatickými, tak i enzymatickými procesy. Superoxidový aniontový radikál obsahuje jeden nepárový elektron a neenzymatickou tvorbou vzniká jednoelektronovou redukcí molekulárního kyslíku ( $O_2$ ) (1) (Halliwell 2007).



Díky své elektronové konfiguraci se  $O_2^{\bullet-}$  může chovat jako redukční činidlo (2), redukuje například železné komplexy jako je cytochrom-c,



ale i jako oxidační činidlo (3), kdy přijímá elektrony a může oxidovat molekuly jako je kyselina askorbová nebo tokoferol (Phaniendra *et al.* 2015).



Enzymy, které mohou vytvářet  $O_2^{\bullet-}$  zahrnují xantin oxidasu, lipooxygenasu, cyklooxygenasu nebo NADPH oxidasu (Bielski, Cabelli 1995). Při nižším pH přijmutím protonu přechází  $O_2^{\bullet-}$  do formy hydroperoxylového radikálu ( $HO_2^{\bullet}$ ). Z celkového množství  $O_2^{\bullet-}$  v cytosolu se nachází okolo 0,3 % v protonované formě. Hydroperoxylový radikál narozdíl od  $O_2^{\bullet-}$  může snadněji procházet přes fosfolipidovou dvojvrstvu v důsledku nepřítomnosti záporného náboje na molekule. Hydroperoxylový radikál je silnější oxidant než  $O_2^{\bullet-}$  a může spustit řetězovou oxidaci polynenasycených mastných kyselin, která vede k poškození funkce membrány (Bielski *et al.* 1983).

### 2.1.1.2 Peroxid vodíku

Peroxid vodíku oproti  $O_2^{\bullet-}$  a  $HO^{\bullet}$  neobsahuje ani na jednom ze svých dvou atomů kyslíku nepárový elektron, kvůli čemuž je řazen mezi neradikálové ROS. Peroxid vodíku se chová jako oxidant nebo reduktant v závislosti na pH prostředí. Za běžných podmínek podléhá pomalé dekompozici na  $H_2O$

a  $O_2$ , která může být urychlena zvýšením teploty, koncentrace a pH. Peroxid vodíku se v živočišných buňkách tvoří především jako produkt biochemických procesů a je

potenciálně toxický kvůli tvorbě  $\text{HO}^\bullet$ . Peroxid vodíku může vznikat dismutací  $\text{O}_2^{\bullet-}$  a to neenzymatickou (spontánní) a enzymatickou (superoxid dismutasa) (4). Neenzymatická dismutace probíhá především při nízkém pH, kdy  $\text{O}_2^{\bullet-}$  přechází do formy  $\text{HO}_2^\bullet$ , kvůli vyšší koncentraci  $\text{H}^+$ . Hydroperoxylový radikál také nemá oproti  $\text{O}_2^{\bullet-}$  záporný náboj, tudíž nedochází k jejich odpuzování.



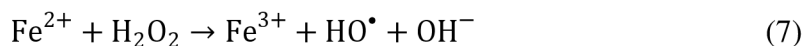
Právě při fyziologické pH je dismutace katalyzovaná superoxid dismutasou (SOD), kdy superoxid oxidasa (SOO) katalyzuje oxidaci  $\text{O}_2^{\bullet-}$  na  $\text{O}_2$  (5) a superoxid reduktasa (SOR) katalyzuje redukci  $\text{O}_2^{\bullet-}$  na  $\text{H}_2\text{O}_2$  (6).



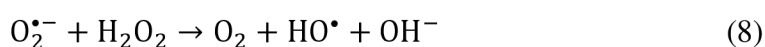
### 2.1.1.3 Hydroxylový radikál

Hydroxylový radikál je nejvíce reaktivní molekula z ROS a může být produkován z  $\text{H}_2\text{O}_2$  během buněčného metabolismu. Buňka vyprodukuje okolo padesáti molekul  $\text{HO}^\bullet$  každou sekundu a za celý den je to až 4 miliony molekul  $\text{HO}^\bullet$ , které mohou následně oxidovat biomolekuly (Lane 2002). Kvůli své reaktivitě  $\text{HO}^\bullet$  oxidativně poškozuje biomolekuly v dosahu několika nanometrů od svého místa vzniku a také se podílí na vzniku mnoha neurodegenerativních (Venero *et al.* 2003), kardiovaskulárních (Lipinski, Pretorius 2012) nebo rakovinných onemocnění (Dizdaroglu, Jaruga 2012).

Předpokládá se, že  $\text{HO}^\bullet$  vzniká v biologických systémech Fentonovu (7) a Haber-Weissovou (8) reakcí. Nicméně mnoho dalších přechodných kovů jako je měď, kobalt nebo nikl se mohou podílet na tvorbě  $\text{HO}^\bullet$  v živých buňkách. Během Fentonovy reakce dochází k produkci  $\text{HO}^\bullet$  reakcí železnatého kationtu ( $\text{Fe}^{2+}$ ) s  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



Haber-Weissovou reakcí vzniká  $\text{Fe}^{2+}$  reakcí  $\text{O}_2^{\bullet-}$  s železitým kationtem ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Dalším krokem je Fentonova reakce (7).



## 2.1.2 Vlastnosti vybraných organických ROS

### 2.1.2.1 Uhlíkový radikál

Uhlíkový radikál je molekula obsahující nepárový elektron na atomu uhlíku. Běžně vzniká oxidací biomolekul během metabolismu, ale mnohem častěji je tvořen během patologických procesů a zvýšeném oxidativním stresu. Může vznikat reakcí biomolekuly např. nenasycené mastné kyseliny s  $\text{HO}^\bullet$  (9).



### 2.1.2.2 Peroxylový radikál

Peroxylový radikál vzniká reakcí  $\text{O}_2$  s  $\text{R}^\bullet$  nebo také dekompozicí hydroperoxidů (ROOH). Je mnohem stabilnější  $\text{R}^\bullet$  nebo  $\text{RO}^\bullet$  a iniciuje peroxidace mastných kyselin. Anorganickým analogem k  $\text{ROO}^\bullet$  je  $\text{HO}_2^\bullet$ .

### 2.1.2.3 Alkoxylový radikál

Alkoxylový radikál je organickým analogem k  $\text{HO}^\bullet$  a působí stejnými mechanismy. Nicméně oproti  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{RO}^\bullet$  působí i intramolekulární cyklizací. Alkoxylový radikál může iniciovat propagaci lipidové peroxidace vytržením H z lipidu anebo  $\beta$ -stříhem vytvořit aldehydy a  $\text{R}^\bullet$  (Girotti 1998). Alkoxylový radikál vzniká dekompozicí ROOH.

## 2.2 Lipidová peroxidace

K lipidové peroxidaci může docházet třemi mechanismy, a to oxidací za pomoci volných radikálů, neenzymatickou oxidací nezávislou na volných radikálech a enzymatickou oxidací (Niki *et al.* 2005).

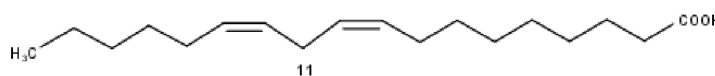
Lipidová peroxidace vyvolaná volnými radikály je řetězový mechanismus, kdy iniciátor ve formě volného radikálu oxiduje molekulu lipidu. Tato reakce se skládá z iniciace, propagace a terminace (Porter *et al.* 1995). Hlavním krokem během iniciace je tvorba  $\text{R}^\bullet$ , která může být provedena odštěpením atomu vodíku z RH pomocí iniciátoru ve formě volného radikálu (10).



Propagace obvykle začíná adicí molekulárního kyslíku na  $\text{R}^\bullet$  (11) a následně dochází k odtržení atomů vodíku z  $\text{RH}$  pomocí  $\text{ROO}^\bullet$  za vzniku  $\text{ROOH}$  a dalšího  $\text{R}^\bullet$  (12).

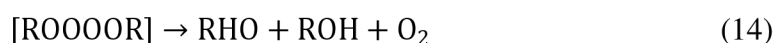


Pokud radikál interaguje s neradikálovou molekulou vždy se vytvoří další radikál, který pokračuje v řetězové reakci. Nicméně míra propagace závisí na síle vazby mezi C a H, které jsou nejslabší mezi dvěma dvojnými vazbami např. C11 u kyseliny linolové (Obrázek 1) (Pryor, Porter 1990). Tato vazba má nižší disociační energii (75-80 kcal/mol) než vazba C-H vedle jedné dvojně vazby ( $\approx 88$  kcal/mol) a než C-H vazba alkylu ( $\approx 101$  kcal/mol) (Wagner *et al.* 1994). Právě H nacházející se C mezi dvěma dvojnými vazbami bývá přednostně odstraněn za pomoci  $\text{ROO}^\bullet$ . Lipidová peroxidace může být obecně popsána jako proces během něhož oxidanty jako volné radikály reagují s lipidy obsahující dvojnou vazbu na atomu uhlíku, obzvláště polynenasycené mastné kyseliny.



Obrázek 1 Kyselina linolová.

Během terminace dojde k interakci dvou molekul  $\text{ROO}^\bullet$  za vzniku tetraoxidu (13). Z nestabilního tetraoxidu poté vzniká aldehyd, alkohol a  $\text{O}_2$  (14). K tomuhle kroku dochází pouze tehdy, jeli koncentrace radikálů dostatečná natolik aby zde byla vysoká pravděpodobnost kolize dvou radikálů. K terminaci může také dojít působením antioxidantů. Jeden z nejúčinnějších antioxidantů inhibující lipidovou peroxidace během terminace je alfa tokoferol ( $\alpha$ -TOH) (Yin, Porter 2005).



Je dobře známo, že vysoká hladina ROS může způsobit přímé poškození molekul lipidů. Čtyři hlavní ROS, které se nejvíce podílí na lipidové peroxidaci jsou  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{HO}_2^\bullet$  (Ayala *et al.* 2014),  $\text{ROO}^\bullet$  (Gaschler, Stockwell 2017) a  $\text{RO}^\bullet$ . Glykolipidy, fosfolipidy a cholesterol nejčastěji podléhají oxidativnímu poškození.



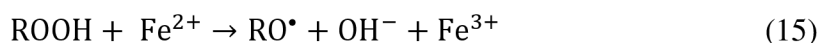
### 2.2.1 Primární produkty lipidové peroxidace

Během lipidové peroxidace dochází k produkci široké škály produktů. Hydroperoxy, produkované během propagace, jsou hlavními primárními produkty lipidové peroxidace. Hydroperoxidová skupina se může navázat na mnoho lipidových struktur např. volné mastné kyseliny, triacylglyceroly, fosfolipidy nebo steroly.

Hydroperoxy jsou reaktivní a chemicky nestabilní, *in vivo* se rozkládají jednoelektronovou nebo dvouelektronovou redukcí, která může zastavit peroxidativní poškození. Enzymy zodpovědné za dvouelektronovou redukcí hydroperoxidů jsou peroxidasy (Brigelius-Flohé, Maiorino 2013) a selenoprotein P, který využívá glutathion nebo thioredoxin jako donor elektronů (Steinbrenner, Sies 2009). Během jednoelektronové redukce dochází ke vzniku RO• za pomoci Fe<sup>2+</sup> nebo ROO• za pomoci Fe<sup>3+</sup> nebo jiného přechodného kovu.

### 2.2.2 Sekundární produkty lipidové peroxidace

Oxidací ROOH vznikají sekundární produkty lipidové peroxidace. Mezi tyto sekundární produkty lipidové peroxidace patří hydroxy mastné kyseliny (ROH) a karbonylové sloučeniny. Hydroxy mastné kyseliny vznikají převážně v přítomnosti Fe<sup>2+</sup>, kdy analogicky k Fentonově reakci (7) vzniká RO•, OH<sup>-</sup> a Fe<sup>3+</sup> (15) (Mlakar, Spitteller 1996).



Alkoxylový radikál následně vytrhne H jiné mastné kyselině za vzniku příslušného hydroxy mastné kyseliny (16).



Nejvíce studované sekundárními produkty jsou karbonylové sloučeniny, a to hlavně alkanaly (propanal, hexanal), alkenaly (akrolein), dialkanaly (malondialdehyd) a hydroxyalkenaly (4-hydroxynonenal). Malondialdehyd je považován za nejvíce mutagenní produkt lipidové peroxidace, zatímco 4-hydroxynonenal je nejvíce toxický (Esterbauer *et al.* 1990). Malondialdehyd se po mnoho let využívá jako spolehlivý biomarker lipidové peroxidace omega-3 a omega-6 mastných kyselin. Malondialdehyd je konečný produkt dekompozice větších polynenasycených mastných kyselin (např. arachidonová, eikosapentaneová, dokosahexaenová) (Yin *et al.* 2011).

4-hydroxyalkenaly jsou považovány za „druhé posly volných radikálů“, protože jsou produkovány v poměrně velkém množství a jsou to velmi reaktivní aldehydy (Esterbauer *et al.* 1991). Vysoká toxicita 4-hydroxynonenalu je způsobena velmi rychlou reakcí s thiolovou a amino skupinou (Schaur 2003).

Aldehydy vznikají převážně z RO•, který podléhá β-stříhu za vzniku alkanalu nebo alkenalu a R'. Avšak některé aldehydy mohou vznikat i jinými způsoby např. při vzniku dialkanalů hraje velkou roli cyklizace. Hydroxyalkenaly mohou vznikat několika mechanismy, hlavně tedy štěpením dihydroperoxidů nebo cyklizací a β-stříhem RO•.

## 2.3 Tvorba reaktivních forem kyslíku v kůži

K tvorbě ROS v kůži může docházet jak enzymatickou, tak i neenzymatickou cestou. Mezi enzymy, které produkují ROS patří enzymy elektron transportního řetězce v mitochondriích, NADPH oxidasy, xantin oxidoreduktasy, několik peroxisomálních oxidas, enzymy ze skupiny cytochrom P450, cyklooxygenasy a lipoxygenasy. Hlavním neenzymatickým zdrojem ROS v kůži je především UV záření a různá xenobiotika (Rinnerthaler *et al.* 2015).

### 2.3.1 Mitochondriální produkce ROS

Na vnitřní membráně mitochondrií se nachází elektronový transportní řetězec skládající se ze čtyř enzymatických komplexů a ATP syntasy. K produkci ROS dochází na komplexu I, II a III nejvíce však na komplexu I a III. Během elektronového transportního řetězce jsou elektrony přeneseny z NADH na komplex I a z FADH<sub>2</sub> na komplex II, tyto elektrony jsou dále přeneseny přes komplex III až na komplex IV, kde redukují molekulární kyslík na vodu (Voet, Voet 2010). Avšak během tohoto procesu může dojít k úniku elektronu na molekulární kyslík, kdy jedoelektronovou redukcí vzniká O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Muller *et al.* 2007). Odhaduje se, že 1-2 % vdechovaného kyslíku vede k produkci O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Turrens 2003). Mitochondrie v kůži hrají významnou roli především produkcí ROS k buněčné signalizaci a jsou přímo spojeny s udržováním epidermální homeostáze (Hamanaka *et al.* 2013).

### 2.3.2 Peroxisomální produkce ROS

Peroxisomy obsahují širokou škálu enzymů, především oxidoreduktasy, které produkují  $\text{H}_2\text{O}_2$  jako sekundární produkt. Mezi tyto enzymy patří hlavně acyl-CoA oxidasa, D-aminokyselinová oxidasa, D-aspartát oxidasa a L- $\alpha$ -hydroxykyselinová oxidasa, které se účastní procesů jako  $\beta$ -oxidace mastných kyselin, katabolismus a anabolismus D-aminokyselin, glyoxylátový a dikarboxylátový metabolismus (Fransen *et al.* 2012). Nicméně peroxisomy mohou produkovat také  $\text{O}_2^{\bullet-}$  a to pomocí enzymu xantinoxidasy. Tento enzym katalyzuje dvě reakce, a to hydroxylaci hypoxantinu na xantin a hydroxylaci xantinu na kyselinu močovou (Harrison 2002). Xantinoxidasa je spojena se zvýšením  $\text{O}_2^{\bullet-}$  v epidermálních keratinocytech a endoteliálních buňkách (Deliconstantinos *et al.* 1996).

### 2.3.3 Produkce ROS v endoplazmatickém retikulu

V endoplazmatickém retikulu se na produkci ROS podílí zejména enzymy ze skupiny cytochrom P450 v kombinaci s protein disulfid izomerasou (PDI) a oxidoreduktinem 1 endoplazmatického retikula (Ero1). Protein PDI vytváří disulfidové můstky v receptorových proteinech. Během tohoto procesu je PDI redukováno a obnoveno do původního stavu pomocí Ero1. Redukovaný Ero1 poté přenesse elektron přes kofaktor FAD na  $\text{O}_2$  za tvorby  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Při neúplném přenosu může dojít k tvorbě  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Bhandary *et al.* 2012).

Cytochrom P450 hraje významnou roli při detoxifikaci od xenobiotik nebo lipofilních sloučenin. Cytochrom P450 katalyzuje oxidaci produktu čímž dojde ke zvýšení rozpustnosti ve vodě. V tomto procesu jsou elektrony z NADPH přeneseny na cytochrom P450 pomocí cytochrom P450 reductasy což vede k hydroxylaci xenobiotik. Nicméně během přenosu elektronů může docházet k tvorbě ROS, obzvláště  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Bae *et al.* 2011).

### 2.3.4 Produkce ROS v membránách a cytosolu

Na produkci ROS se v membránách podílí především NADPH oxidasa. Neutrofily a makrofágy vykazují zvýšenou aktivitu NADPH oxidasy během zvýšeného oxidativního stresu v kůži (Papparella *et al.* 2005). NADPH redukuje FAD na  $\text{FADH}_2$ , které následně redukuje hemové železo ze  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$ . Toto  $\text{Fe}^{2+}$  redukuje  $\text{O}_2$  na  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .

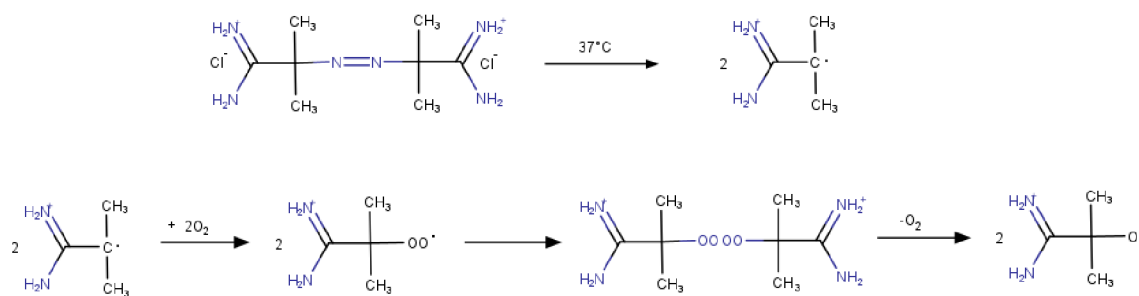
Oproti výše zmíněným zdrojům  $O_2^{\bullet-}$  je v membránách produkován primárně jako signální molekula nebo za účelem obrany proti mikroorganismům (Rinnerthaler *et al.* 2012).

V cytosolu se ROS vytváří jako sekundární produkt metabolismu kyseliny arachidonové. Enzymy cyklooxygenasa a lipoxygenasa využívají kyselinu arachidonovou jako substrát k syntéze prostagladinu H<sub>2</sub> a leukotrienů. Oba tyto enzymy v přítomnosti NADH nebo NADPH mohou produkovat  $O_2^{\bullet-}$  (Kukreja *et al.* 1986).

Dalším způsobem vzniku ROS v cytosolu ale i ve všech organelách je reakce  $O_2$  s ionty železa. Dochází k tvorbě  $HO^{\bullet}$  Haber-Weissovou a Fentonovou reakcí, jejichž průběh byl již zmíněn dříve.

### 2.3.5 Tvorba ROS pomocí azoiniciátoru AAPH

Hydrofilní azoiniciátor 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochlorid (AAPH) se dlouhá léta využívá ke studiu lipidové peroxidace a její inhibice. Azosloučeniny a právě i AAPH jsou schopny produkovat ROS během své dekompozice při 37°C (Peyrat-Maillard *et al.* 2003). Nejprve dochází ke vzniku  $R^{\bullet}$ , který následně interaguje s  $O_2$  za vzniku  $ROO^{\bullet}$ . Peroxylový radikál poté spouští lipidovou peroxidaci. Nicméně za nepřítomnosti  $O_2$  je tvorba  $ROO^{\bullet}$  inhibována, což následně vede k produkci  $R^{\bullet}$ . Může také dojít k tvorbě  $RO^{\bullet}$  kombinací dvou  $ROO^{\bullet}$  za vzniku tetraoxidu, který se rozštěpí na dva  $RO^{\bullet}$  a  $O_2$  (Wahl *et al.* 1998).



Obrázek 2 Termální rozklad AAPH a následná tvorba  $ROO^{\bullet}$  a  $RO^{\bullet}$ . Schéma podle Werber *et al.* (2011).

## 2.4 Produkty lipidové peroxidace v kůži

Tato kapitola bude věnována tvorbě produktů lipidové peroxidace v kůži radikálovými formami ROS. Přestože cholesterol je oxidován převážně  $^1O_2$  a  $O_3$  nebude tento mechanismus zmíněn.

### 2.4.1 Lipidy v kožních buňkách

Lipidy můžeme rozdělit do dvou skupin, a to na nepolární a polární. Nepolární lipidy jako jsou triglyceridy se nachází hlavně v adiposní tkáni a slouží jako zásobárna energie u savců (Frühbeck *et al.* 2001). Polární lipidy, hlavně tedy fosfolipidy, se podílí na struktuře buněčných membrán (Vance E, Vance J.E. 2002).

Kůže je největším orgánem lidského těla a je tvořena třemi vrstvami: pokožka (*epidermis*), škára (*dermis*) a podkožní vazivo. Lipidy nacházející se na povrchu kůže jsou směsí epidermálních lipidů a lipidů uvolňujících se z mazových žláz (Pappas 2009). Kožní maz (*sebum*) tvoří nepolární lipidy, hlavně triacylglyceroly, vosky a skvalen, zatímco epidermální lipidy jsou tvořeny stejným množstvím volných mastných kyselin, cholesterolu a ceramidů (Huang *et al.* 2009).

**Tabulka 1:** Procentuální zastoupení lipidů v *epidermis* a *sebum* (Niki 2015).

	Volné mastné kyseliny	Ceramid	Cholesterol	Triacylglycerol	Vosky	Skvalen	Estery cholesterolu
<b>Epidermis</b>	30-35 %	30-35 %	30-35 %	-	-	-	-
<b>Sebum</b>	10 %	-	<5 %	50 %	25 %	12 %	<5 %

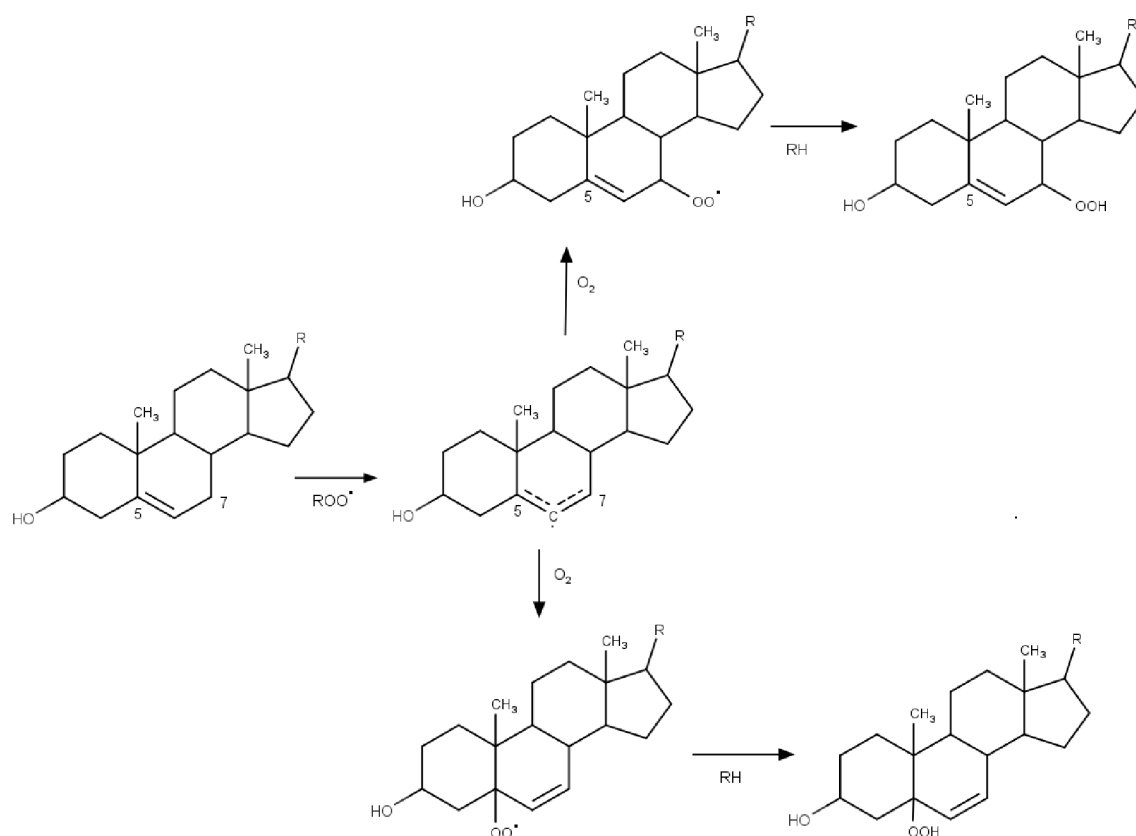
**Tabulka 2:** Procentuální zastoupení mastných kyselin v *epidermis* a *sebum* (Niki 2015).

Kyselina	Myristová (C14:0)	Myristolejová (C14:1)	Palmitová (C16:0)	Palmitolejová (C16:1)	Stearová (C18:0)
<b>Epidermis</b>	1,11 %	-	14,01 %	2,34 %	11,06 %
<b>Sebum</b>	12,66 %	5,58 %	22,48 %	21,8 %	3,46 %
Kyselina	Olejová (C18:1)	Linolová (C18:2)	Arachidonová (C20:4)	Eikosapentaneová (C20:5)	Dokosaheptaenová (C22:6)
<b>Epidermis</b>	15,12 %	21,52 %	6,22 %	-	-
<b>Sebum</b>	15,18 %	1,44 %	0,27 %	0,22 %	0,3 %

Nejvíce zastoupenou nenasycenou mastnou kyselinou v *epidermis* je kyselina linolová, zatímco v *sebum* je to kyselina palmitolejová.

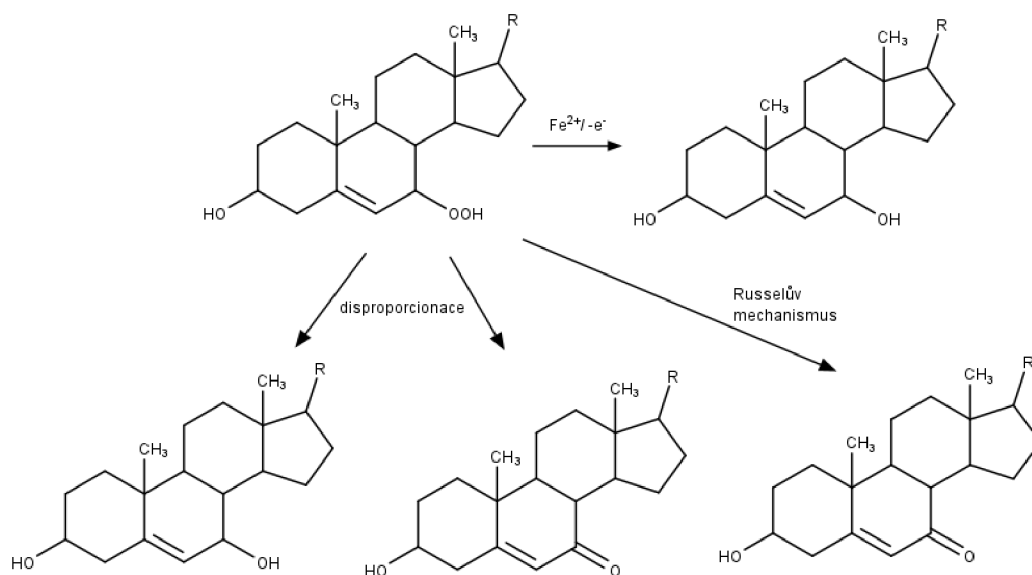
## 2.4.2 Lipidové peroxidace cholesterolu

Cholesterol je významným substrátem pro  $^1\text{O}_2$  a ozon  $\text{O}_3$ . Produkty oxidace cholesterolu se nazývají oxysteroly (Niki 2009). Oxidace cholesterolu volnými radikály může být zahájena buď přenosem atomu vodíku z allylového místa na cholesterolu nebo adicí  $\text{ROO}^\bullet$  na dvojnou vazbu. K odtržení atomu vodíku z cholesterolu  $\text{ROO}^\bullet$  dochází z uhlíku C-6 (Sevilla *et al.* 1986). Tímto odtržením dojde ke vzniku  $\text{R}^\bullet$  a následnou interakcí s  $\text{O}_2$  ke vzniku  $\text{ROO}^\bullet$  na uhlíku C-7 nebo C-5 (Obrázek 3) (Pratt *et al.* 2003).



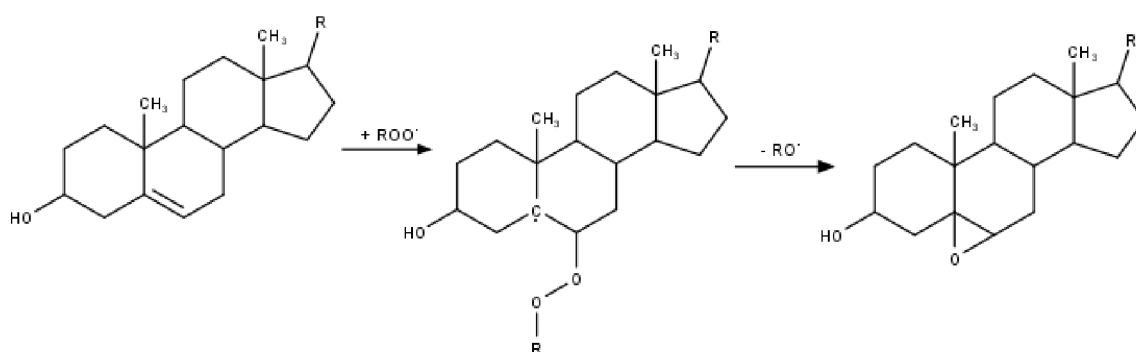
Obrázek 3 Tvorba primárních produktů lipidové peroxidace cholesterolu. Schéma podle Yin *et al.* (2011)

Při interakci s donorem vodíku vznikají  $\text{ROOH}$  cholesterolu a jejich následnou redukcí redukčními činidly jako jsou peroxidázy nebo  $\text{Fe}^{2+}$  dojde ke vzniku hydroxycholesterolu. Disproporcionací  $\text{ROOH}$  dojde taktéž k tvorbě ketocholesterolu. Ketocholesterol je produktem dehydratace  $\text{ROOH}$  tzv. Russellovým mechanismem během něhož dochází k terminaci radikálového řetězce reakcí dvou  $\text{ROO}^\bullet$  a následným rozkladem vzniklého tetraoxidu (Howard, Ingold 1968) (Obrázek 4).



Obrázek 4 Tvorba sekundárních produktů lipidové peroxidace cholesterolu. Schéma podle Yin et al. (2011).

Nicméně k odtržení H může docházet i z uhlíku C-4. Produkty vznikají stejným mechanismem oxidace jako tomu bylo u uhlíku C-7. K další tvorbě produktů vede adice ROO<sup>•</sup> na dvojnou vazbu kruhu B cholesterolu (Obrázek 5).



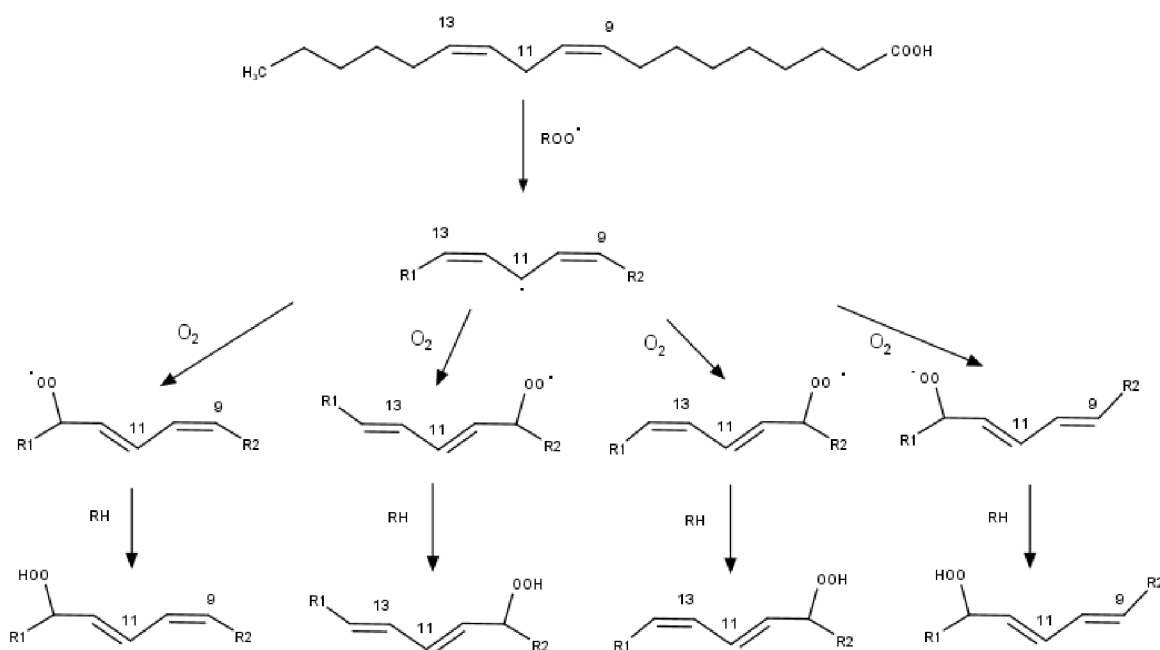
Obrázek 5 Schéma tvorby epoxidu cholesterolu. Schéma podle Yin et al. (2011).

Dochází k tvorbě cholesterol epoxidů, které jsou dvěma hlavními produkty oxidace cholesterolu volnými radikály (Brown *et al.* 1996). Epoxidy mohou podléhat dalším transformacím pomocí cholesterol epoxid hydrolasy (Watabe, Sawahata 1979).

#### 2.4.3 Lipidová peroxidace nenasycených mastných kyselin

Nenasycené mastné kyseliny jsou díky methylenové skupině nacházející se mezi dvěma sousedními dvojnými vazbami substráty pro enzymatickou oxidaci a oxidaci volnými radikály.

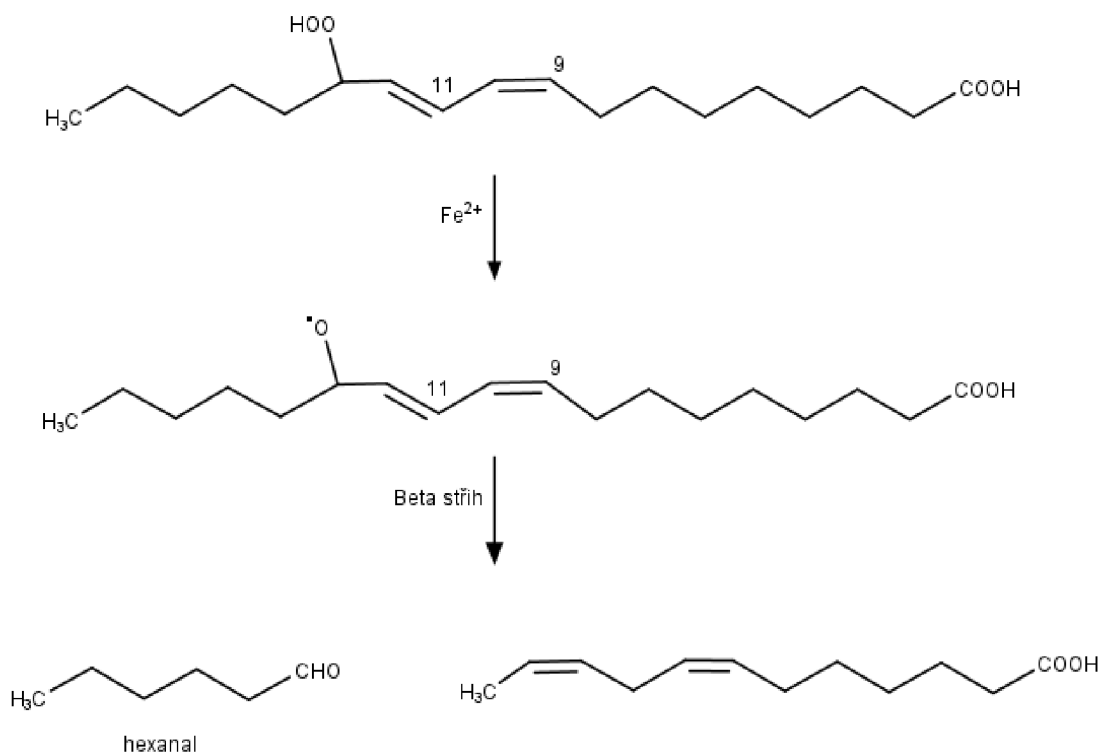
Nejvíce studovanou nenasycenou mastnou kyselinou je kyselina linolová, jelikož je se jedná o jednu z nejčastěji se vyskytujících nenasycených mastných kyselin *in vivo*. Oxidací kyseliny linolové můžeme získat čtyři hydroperoxydy (Yamamoto *et al.* 1982) (Obrázek 6). Dojde k vytržení H z C11 uhlíku  $\text{ROO}^\bullet$ , vzniká tak nepárový elektron na C11, kdy adicí  $\text{O}_2$  na C13 nebo C9 dojde k přeskupení nepárového elektronu. Následnou reakcí s RH vznikají dva izomery C13 hydroperoxidu a dva izomery C9 hydroperoxidu. V malém množství vzniká i pátý hydroperoxid (11-Z,Z) nicméně tento produkt je nestabilní a dochází k jeho rychlé přeměně na stabilnější produkt (Brash 2000).



Obrázek 6 Primární produkty kyseliny linolové. Tvorba čtyř izomerů hydroperoxidu pomocí  $\text{ROO}^\bullet$ . Schéma podle Niki (2009).

Další oxidací těchto produktů poté může vznikat široká škála aldehydů v závislosti na izomeru hydroperoxidu ze kterého vznikají. Mezi nejčastější aldehydy patří hexanal (Obrázek 7), heptanal, (E)-2-heptenal, (E)-2-oktenal, (E,E)-2,4-decadienal (Nielsen *et al.* 2004), (E)-nonenal, pentanal, (E)-hexenal, (E,E)-2,4-nonadienal a 4-hydroxynonenal (Han, Csallany 2009).

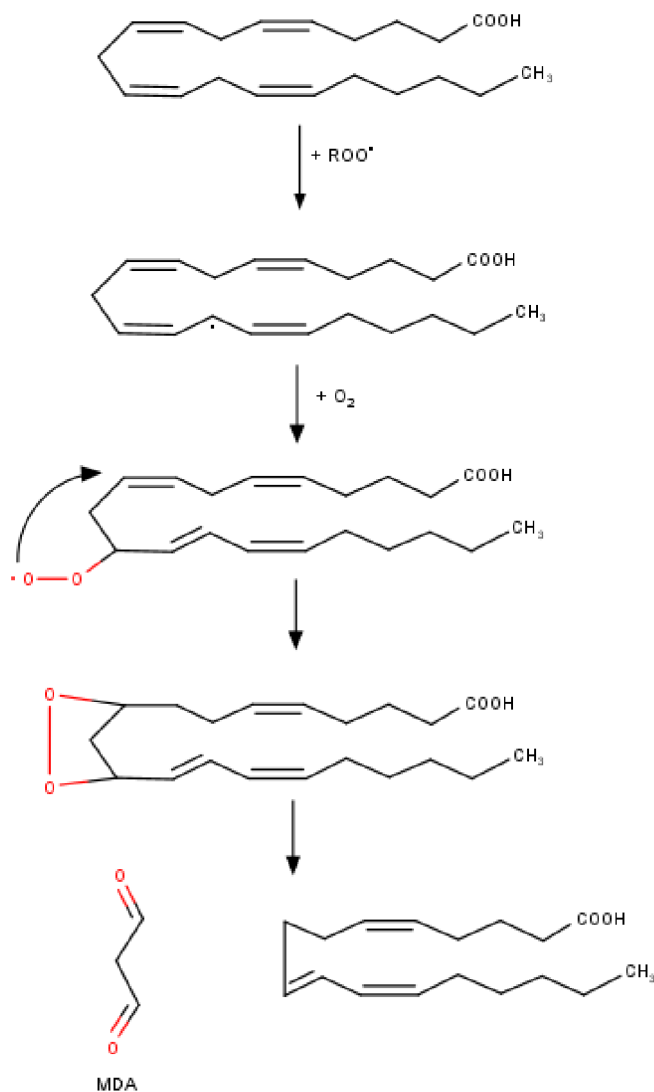




Obrázek 7 Tvorba hexanalů lipidovou peroxidací kyseliny linolové. Schéma podle Shahidi, Pegg (1994).

Oxidací kyseliny arachidonové  $\text{ROO}^{\bullet}$  vznikají také nejprve hydroperoxy (Yin *et al.* 2011). Více nenasycené mastné kyseliny jako arachidonová (20:4), eikosapentaenová (20:5) nebo dokosahexanová (22:6) jsou oxidovány podobným mechanismem jako kyselina linolová, avšak dochází zde také intramolekulární cyklizaci. Tyto cyklické peroxidy (isoprostany) vznikají při oxidaci kyseliny arachidonové. Nejvíce studovanými isoprostany jsou  $\text{F}_2$ -isoprostany. Oxidací kyseliny arachidonové může být vytvořeno až 64 různých izomerů  $\text{F}_2$ -isoprostanů. Oxidací kyseliny eikosapentaenové a dokosahexanové vznikají  $\text{F}_3$ -isoprostany a  $\text{F}_4$ -neuroprostany.

Jedním z hlavních produktů lipidové peroxidace kyseliny arachidonové je MDA. Malondialdehyd může vznikat jak enzymatickými procesy, tak ale i neenzymaticky pomocí ROS. Během oxidace pomocí ROS nejprve vznikají hydroperoxy. Peroxylový radikál na kyselině arachidonové cyklizací vytvoří endoperoxid, který se odštěpí a vytvoří tak MDA (Obrázek 8) (Ayala *et al.* 2014).



Obrázek 8 Schéma tvorby MDA lipidovou peroxidací kyseliny arachidonové. Schéma podle (Esterbauer et al. 1991).

#### 2.4.4 Lipidová peroxidace skvalenu

Skvalen tvoří 12-13 % celkového množství lipidů v kůži (Niki 2015) a je relativně stabilní vůči  $\text{ROO}^\bullet$ , jelikož obsahuje šest dvojných vazeb, ale bez reaktivní methylenové skupiny. Nicméně skvalen je dobře oxidován singletním kyslíkem a ozonem. Reakcí se singletním kyslíkem vzniká 12 hydroperoxidů.

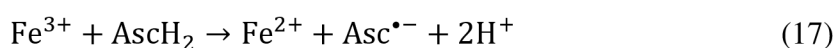
## 2.5 Antioxidanty

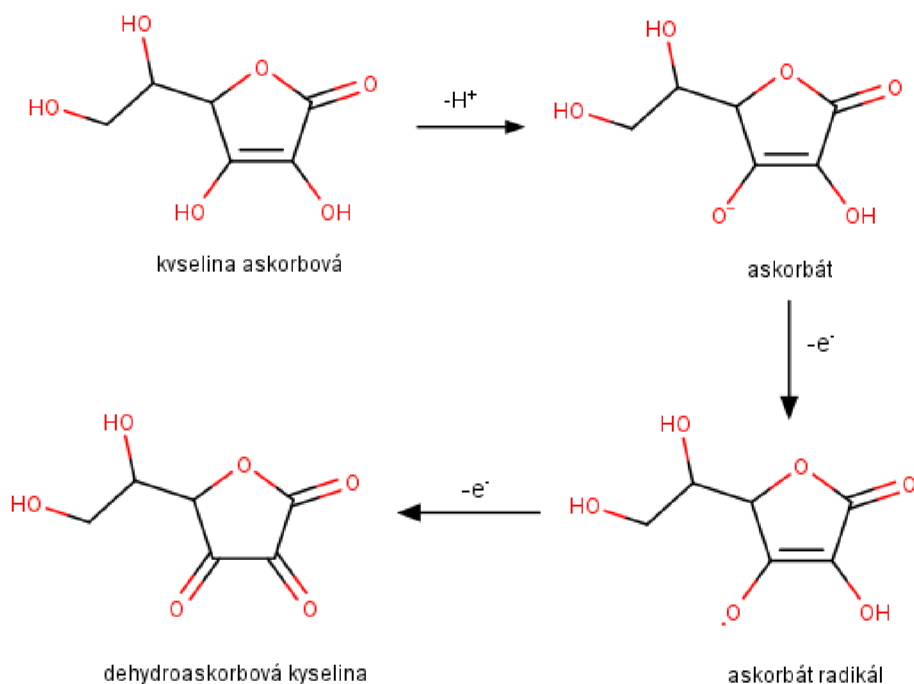
Antioxidanty jsou látky, které jsou schopny omezovat či dokonce inhibovat oxidaci substrátu (Halliwell 2007). Hrají klíčovou roli při ochraně organismu před ROS a oxidativním poškozením. Mnohé studie prokázaly schopnost antioxidantů snižovat negativní efekt ROS na organismus, a to především v obraně kůže před oxidativním stresem způsobeným UV zářením (Stojiljkovic *et al.* 2014). Antioxidanty mohou působit několika mechanismy, odstraněním kovových iontů a klíčových ROS jako jsou  $O_2^{\bullet-}$ ,  $HO^{\bullet}$ ,  $RO^{\bullet}$  nebo  $ROO^{\bullet}$ , přerušением radikálové řetězové reakce a zhášením  $^1O_2$  (Gutteridge 1995).

Antioxidanty je možné rozdělit do dvou skupin, a to na enzymatické a neenzymatické (Nimse, Pal 2015). Enzymatické antioxidanty zahrnují enzymy jako jsou SOD, katalasa nebo glutathion peroxidasa a působí hlavně mechanismem, kdy radikálové ROS převádějí na  $H_2O_2$  a poté až na  $H_2O$ . Mezi nejvýznamnější neenzymatické antioxidanty patří vitamíny (vitamín C a E), karotenoidy a fenoly. Neenzymatické antioxidanty je ještě možné rozdělit na lipofilní a hydrofilní. Hydrofilní antioxidanty se nachází hlavně v cytosolu, zatímco lipofilní především v buněčných membránách.

### 2.5.1 Kyselina askorbová

Kyselina askorbová (AA), jejíž L-enantiomer je vitamín C, je ve vodě rozpustný antioxidant. Kyselina askorbová působí antioxidantně proti  $O_2^{\bullet-}$ ,  $HO^{\bullet}$  a  $RO^{\bullet}$  vytvořením dehydroaskorbové kyseliny (Obrázek 9) (Du *et al.* 2012). Při výzkumu působení antioxidantů v krevní plazmě se ukázala být kyselina askorbová jako nejúčinnější následovaná bilirubinem, kyselinou močovou, koenzymem Q10 a vitamínem E (Beyer 1994). Ovšem problém nastává v přítomnosti přechodných kovů, kdy se AA chová jako prooxidant. Askorbát ( $AscH_2$ ) může redukovat trojmocný kov na dvojmocný a zároveň se sám oxiduje na askorbát radikál ( $Asc^{\bullet-}$ ) (17). Kovový iont může být znovu oxidován a následně redukován v redoxním cyklu produkujícím ROS. Právě v přítomnosti  $O_2$  dochází k tvorbě  $O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$  (Du *et al.* 2012). Poté následuje již dříve popsaná Fentonova reakce (7).





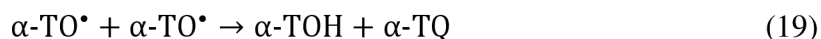
Obrázek 9 Schéma tvorby dehydroaskorbové kyseliny. Schéma podle Macan et al. (2019).

### 2.5.2 Alfa-tokoferol

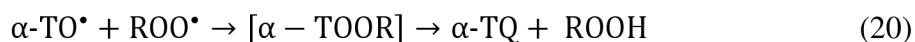
Alfa-tokoferol ( $\alpha$ -TOH) je v tucích rozpustný antioxidant a je jednou z osmi forem vitamínu E. Všechny obsahují chromanový kruh s hydroxylovou skupinou, díky které může redukovat ROS. Alfa-tokoferol hraje významnou roli během lipidové peroxidace. Lipidové peroxylové radikály interagují s  $\alpha$ -TOH mnohem rychleji než s jinými antioxidanty, čímž chrání nenasycené mastné kyseliny před oxidací (Choe, Min 2006). Alfa-tokoferol redukuje  $ROO^\bullet$  za vzniku  $ROOH$  a tokoferoxylového radikálu ( $\alpha$ -TO $^\bullet$ ), který je mnohem stabilnější než  $ROO^\bullet$  (18).



Nicméně  $\alpha$ -TO $^\bullet$  může interagovat s další molekulou  $\alpha$ -TO $^\bullet$  za vzniku  $\alpha$ -TOH a tokoferyl chinonu ( $\alpha$ -TQ) (19).



Při větší míře oxidace  $\alpha$ -TO $^\bullet$  může reagovat s  $ROO^\bullet$  za vzniku komplexů ( $\alpha$ -TOOR), které následnou hydrolyzou vytváří  $ROOH$  (20), což jsou primární produkty lipidové peroxidace.



### 3. Cíl práce

Cílem této práce je stanovení sekundárních produktů lipidové peroxidace pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie při působení azoiniciátoru na lipidy nacházející se v prasečí kůži a následné studium vlivu antioxidantů.

## 4. Materiál a metody

### 4.1 Použité chemikálie

2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochlorid (Sigma-Aldrich, USA), hydroxid sodný (Lach-Ner, Česká republika), kyselina chloristá (Sigma-Aldrich, USA), 2,4-dinitrofenylhydrazin (Sigma-Aldrich, USA), 1,1,3,3-tetraethoxypropan (Sigma-Aldrich, USA), kyselina sírová (Lach-Ner, Česká republika), hexanal (Sigma-Aldrich, USA), kyselina askorbová (Sigma-Aldrich, USA),  $\alpha$ -tokoferol (Sigma-Aldrich, USA).

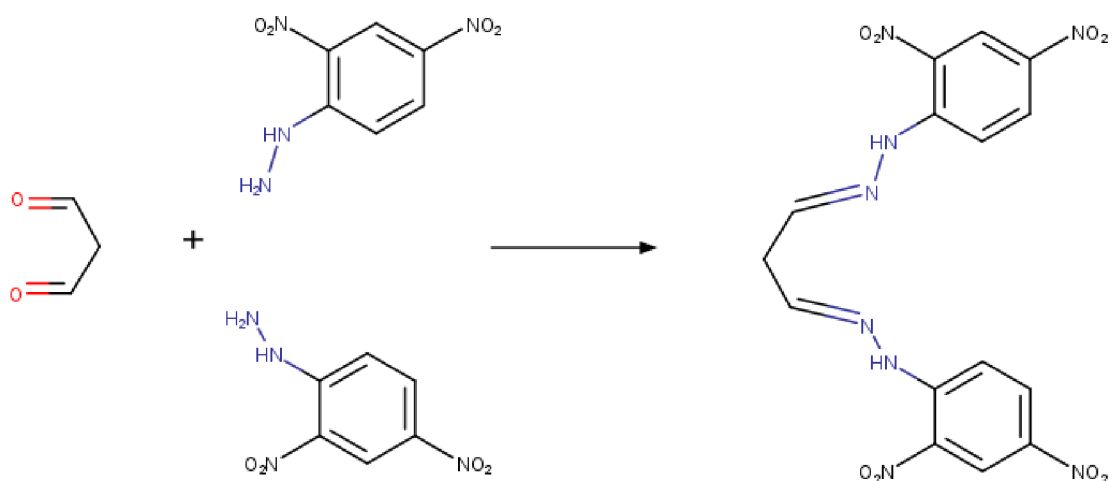
### 4.2 Izolace sekundárních produktů lipidové peroxidace z kůže

Sekundární produkty lipidové peroxidace byly izolovány z kůže prasečích uší, které byly po odebrání zmrazeny a uchovány. Skalpelem byly vyříznuty čtverce z vnitřní strany ucha každý o hmotnosti 1 g. Před homogenizací bylo potřeba nejprve vzorky nakrájet pomocí skalpelu na menší kousky. Vzorek se přenesl do malé kádinky a přidalo se 500  $\mu$ l vody. Následně byly vzorky homogenizovány pomocí tyčového homogenizátoru (IKA ultra-turrax T25, Staufen, Německo) a to vždy v intervalech 30 s homogenizace a 30 s pauza, aby nedocházelo k zahřívání vzorku. Tento proces byl opakován 3x. Poté se vzorky přenesly do jedné kádinky a byly znovu homogenizovány. Vzorek byl rozdělen do mikroskopických vial po 1,5 g a následně bylo aplikováno vybrané ošetření. Po skončení ošetření byly vzorky centrifugovány na 5000 g po dobu 10 min při 4 °C. Po centrifugaci bylo odebráno 500  $\mu$ l supernatantu do nových mikroskopických vial.

Následně byla provedena alkalická hydrolýza. Aldehydy, a především MDA se při nižším pH váží na proteiny. Právě pomocí alkalické hydrolýzy dojde k přerušení vazby C-N mezi aldehydy a aminokyselinami. Vazba C-N je tvořena hlavně aminokyselinou lysinem, který má aminoskupinu na postranním řetězci. V bazické prostředí poté dojde k adici  $\text{OH}^-$  na C a tím se přerušuje vazba C-N. K 500  $\mu$ l supernatantu bylo přidáno 100  $\mu$ l 6M hydroxidu sodného (NaOH), vzorky byly protřepány a následně inkubovány při 60 °C po dobu 30 min. Zvýšená teplota katalyzuje reakci.

Uvolněné proteiny byly následně odstraněny precipitací během, které dochází ke srážení proteinů vlivem snížení pH. Při snížení pH pod izoelektrický bod proteinů dojde k rozrušení hydrofilní části a následkem toho hydrofobní část precipituje. Ke vzorkům bylo přidáno 300  $\mu\text{l}$  35% kyseliny chloristé ( $\text{HClO}_4$ ), vzorky byly protřepány a centrifugovány na 25 000 g po dobu 10 min při 4  $^\circ\text{C}$ .

Do nových mikrozkušavek bylo odebráno 125  $\mu\text{l}$  supernatantu a přidán 1  $\mu\text{l}$  50 mM derivatizačního činidla 2,4-dinitrofenylhydrazinu (DNPH) rozpuštěného v 50% (v/v) kyselině sírové k provedení derivatizace vzorku (Obrázek 10), která probíhá v kyselém prostředí. Vzorek byl inkubován ve tmě při pokojové teplotě po dobu 30 min a následně změřen na HPLC.



Obrázek 10 Schéma derivatizace MDA derivatizačním činidlem DNPH.

### 4.3 Ošetření vzorků AAPH a antioxidanty

Nejprve byla sledována časová závislost tvorby karbonylových sloučenin. K 1,5 g homogenátu z kožních buněk byl přidán azoiniciátor AAPH (10 mM), vzorky byly protřepány a následně inkubovány při 37  $^\circ\text{C}$  po 15, 30, 45 a 60 min.

Pro sledování vlivu antioxidantů na tvorbu karbonylových sloučenin byl k homogenátu přidán azoiniciátor AAPH (10 mM) a zároveň antioxidant (1mM) kyselina askorbová nebo  $\alpha$ -tokoferol. Vzorky byly následně protřepány a inkubovány při 37  $^\circ\text{C}$  po dobu 60 min.

#### 4.4 HPLC analýza karbonylových sloučenin

Měření karbonylových sloučenin bylo realizováno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s použitím chromatografu Alliance e 2695 HPLC System (Waters Corporation, Milford MA, USA). Karbonylové sloučeniny byly separovány izokratickou elucí kolonou Jupiter C18 (150 x 3 mm, velikost částic 3  $\mu\text{m}$ ) s celkovým časem analýzy 20 min. Mobilní fáze složená z 50 % acetonitrilu a 50 % vody protékala kolonou rychlostí 0,5 ml/min termostatovanou na 35 °C. Pro detekci byl použit UV/VIS detektor s diodovým polem (Photodiode Array, PDA) se spektrálním rozsahem 200-600 nm a optickým rozlišením 1,2 nm. Vyhodnocování jednotlivých složek bylo provedeno při vlnové délce 310 (MDA-DNPH adukt) a 360 nm (hexanal-DNPH adukt).

#### 4.5 Analýza standardů absorpčním spektrometrem

Absorpční spektra byla měřena na absorpčním spektrofotometru Specord 250 PLUS-223G1032 (Analytik Jena, Jena, Německo) se spektrálním rozsahem 190-1100 nm, rychlostí 2 nm/s, s krokem 1 nm v rozsahu 200-400 nm. Vzorky byly měřeny v křemenné kyvetě s optickou dráhou 1 mm. Jako reference pro TEP byla použita 1 % (v/v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , pro hexanal byl použit 96 % (v/v) ethanol.

#### 4.6 Statistické zpracování dat

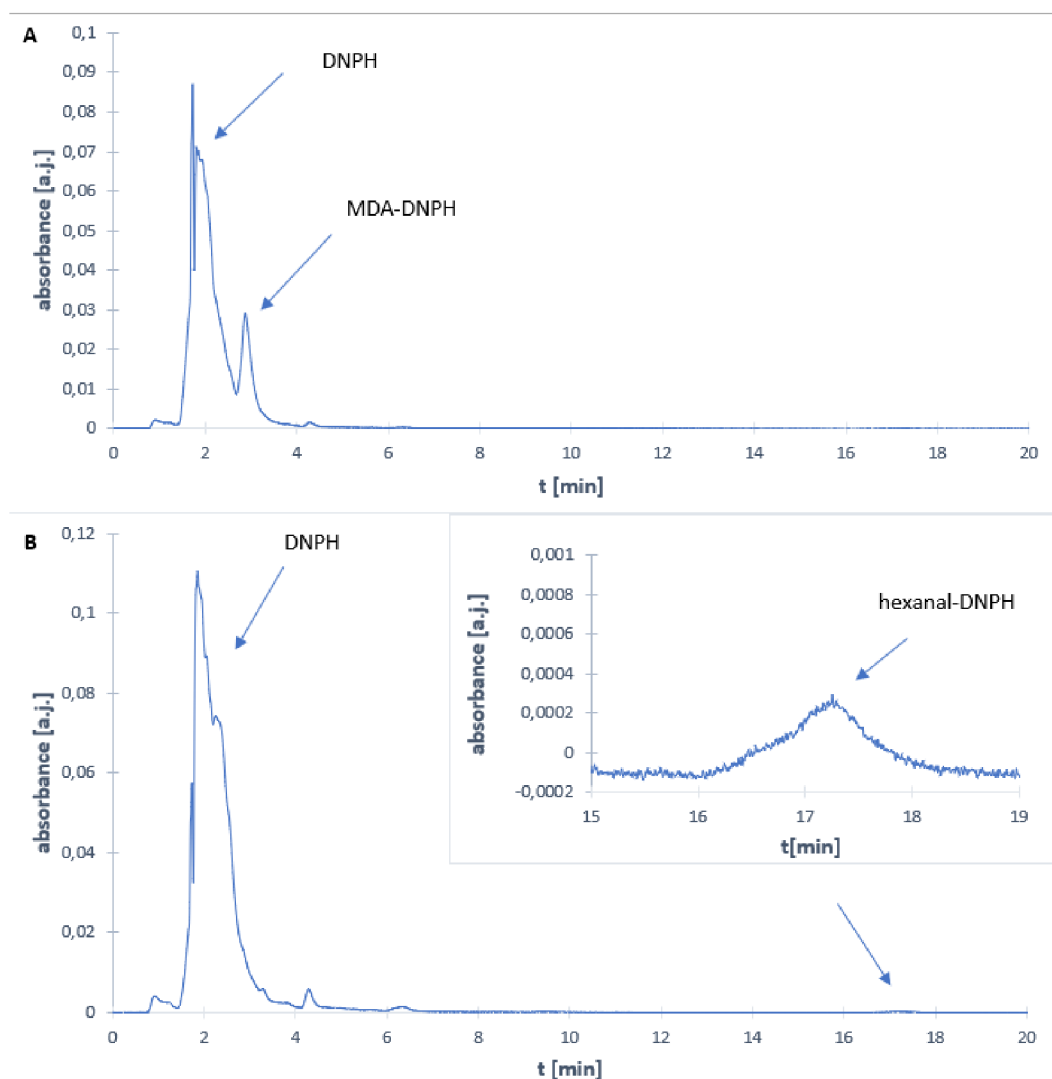
Statistická analýza dat byla provedena pomocí programů Wolfram Mathematica a MS Excel. Ve Wolfram Mathematice byl proveden test normality dat pomocí Shapiro-Wilkova testu. Následně byl proveden test rovnosti rozptylů pomocí F-testu v MS Excelu. Poté byly data analyzovány pomocí Kruskal-Wallisova test s post hoc Nemenyiho testem.



## 5. Výsledky

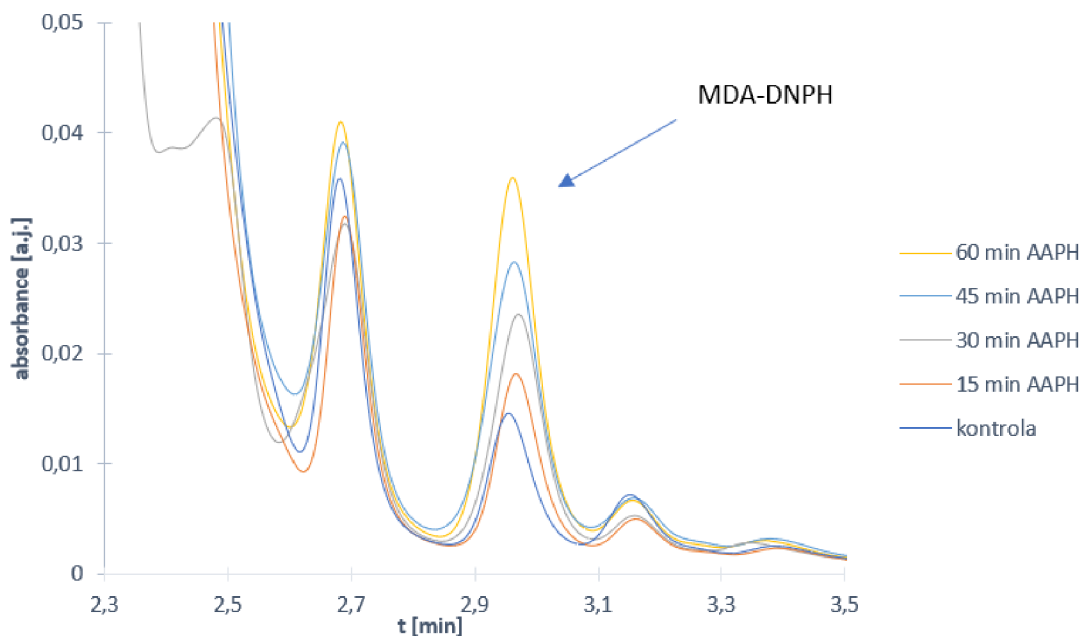
### 5.1 Tvorba karbonylových sloučenin po aplikaci azoiniciátoru na kožní buňky

Hlavním cílem práce bylo stanovení sekundárních produktů lipidové peroxidace v kožních buňkách. Pomocí HPLC/PDA byly ve vzorcích extraktu kožních buněk identifikovány dva DNPH adukty a to MDA-DNPH a hexanal-DNPH. Na celém chromatogramu (Obrázek 11) je možné vidět umístění jednotlivých DNPH aduktů a samotného DNPH. Hodnoty plochy pod píkem jsou pro MDA-DNPH adukt 40x větší než pro hexanal-DNPH adukt u kontrolního vzorku.



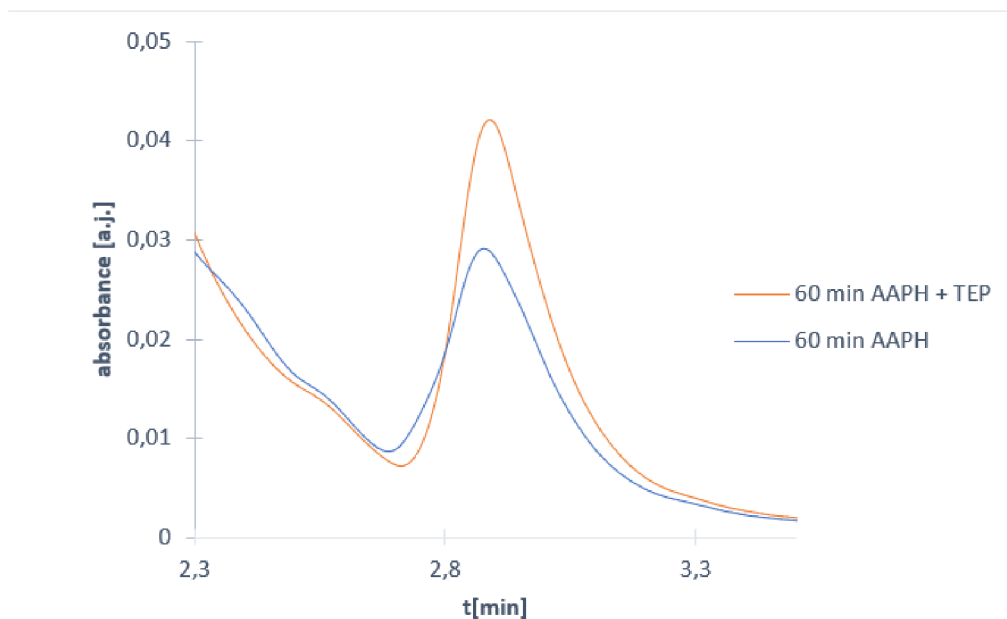
Obrázek 11 **Chromatogram derivatizovaných karbonylových sloučenin pomocí DNPH v kožních buňkách.** (A) Chromatogram při vlnové délce  $\lambda = 310$  nm zobrazující MDA-DNPH adukt (retenční čas  $t = 2,93$  min), (B) Chromatogram při  $\lambda = 360$  nm s výřezem zobrazující hexanal-DNPH adukt (retenční čas  $t = 17,25$  min). Nástřik vzorku byl 50  $\mu$ l. Absorbance je vyjádřena v absorpčních jednotkách [a.j.].

Nejprve byla měřena časová závislost vlivu AAPH (10mM) na kůži v časech 0, 15, 30, 45 a 60 min. Prvním ze sledovaných produktů byl malondialdehyd, který vykazoval nárůst po celou sledovanou dobu (Obrázek 12).



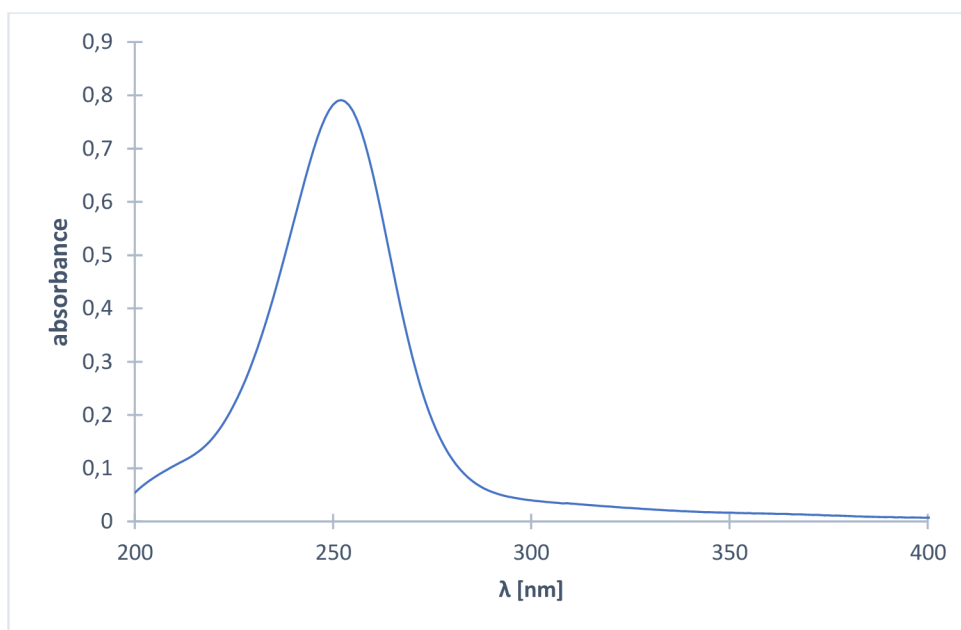
Obrázek 12 **Chromatogram časové závislosti tvorby MDA-DNPH při působení azoiniciátoru AAPH na extrakt z kožních buněk.** Extrakt z kožních buněk byl inkubován po určitou dobu s AAPH (10mM) při 37°C. Separace byla provedena na reverzní fázi kolonou C18 (150 x 3 mm, 3µm) za použití mobilní fáze acetonitril/voda v poměru 50:50 při toku 0,5 ml/min. Chromatogram je zobrazen při  $\lambda = 310$  nm. Nástřik vzorku byl 50 µl.

Z chromatogramu (Obrázek 12) je patrné, že i bez působení AAPH je stabilní hodnota MDA-DNPH aduktu v kontrolním vzorku. Pro ověření, zda se jedná o MDA-DNPH adukt byl použit vnitřní standart 1,1,3,3,-tetraethoxypropan (TEP) (Obrázek 13).



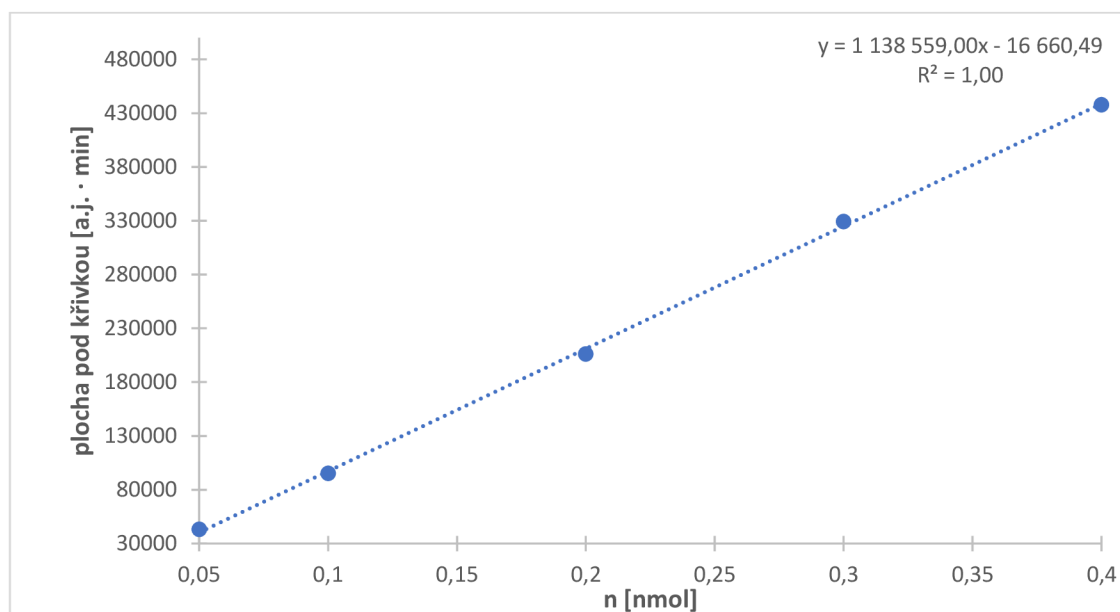
Obrázek 13 **Ověření MDA-DNPH aduktu vnitřním standardem.** Ke vzorku inkubovaném 60 min s AAPH (10mM) byl přidán 1,1,3,3,-tetraethoxypropan (TEP) jako standart MDA. Po derivatizaci byla provedena separace na reverzní fázi kolonou C18 (150 x 3 mm, 3 $\mu$ m) za použití mobilní fáze acetonitril/voda v poměru 50:50 při toku 0,5 ml/min. Chromatogram je zobrazen při  $\lambda = 310$  nm. Nástřik vzorku byl 50  $\mu$ l.

Množství MDA ve vzorku při 60 min vlivem AAPH narostlo o 100 % oproti kontrolnímu vzorku. Integrací těchto křivek byla stanovena plocha pod píkem MDA-DNPH aduktu, která byla přepočítána pomocí kalibrační křivky standartu TEP na látkové množství (Obrázek 15). K vytvoření kalibrační křivky byla nejprve určena koncentrace zásobního roztoku standartu MDA z absorpčního spektra (Obrázek 14) pomocí Lambert-Beerova zákona (molární absorpční koeficient MDA  $\epsilon_{244} = 13700 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

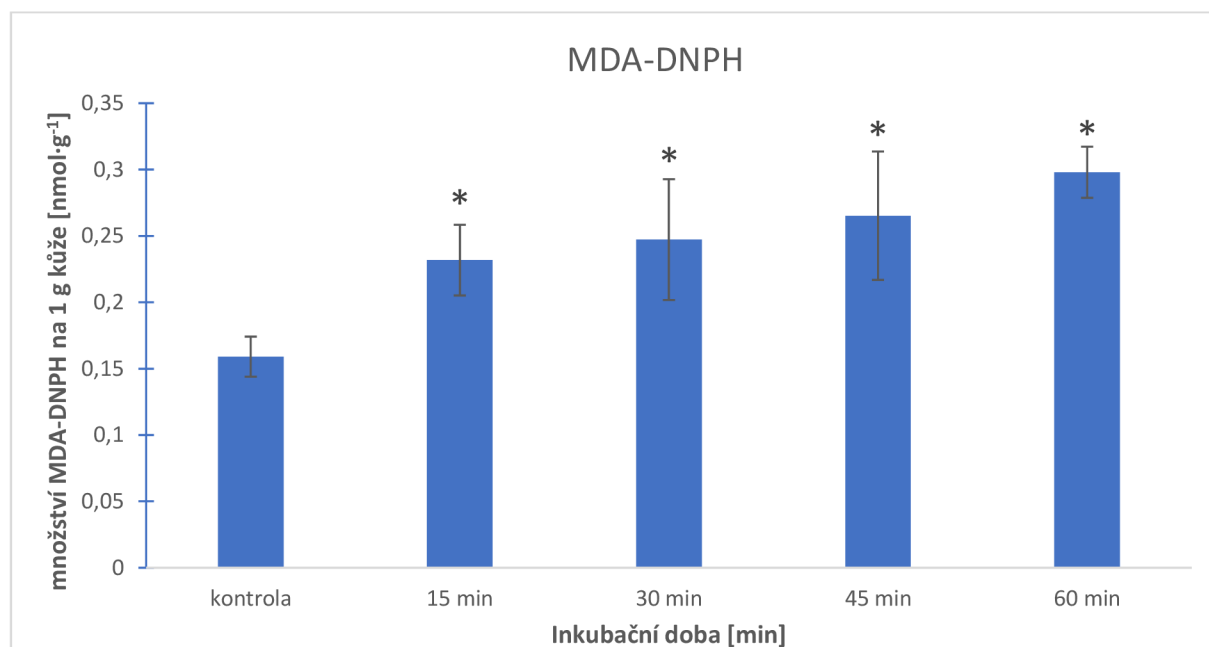


Obrázek 14 Absorpční spektrum MDA.

Absorpční maximum nederivatizovaného TEP ( $\lambda = 250$  nm) se derivatizací posouvá na  $\lambda = 310$  nm. Hodnoty byly společně se směrodatnými odchylkami vyneseny ve sloupcovém grafu (Obrázek 16). Statisticky významné rozdíly oproti kontrolnímu vzorku bez AAPH byly pozorovány u všech ošetřených vzorků.



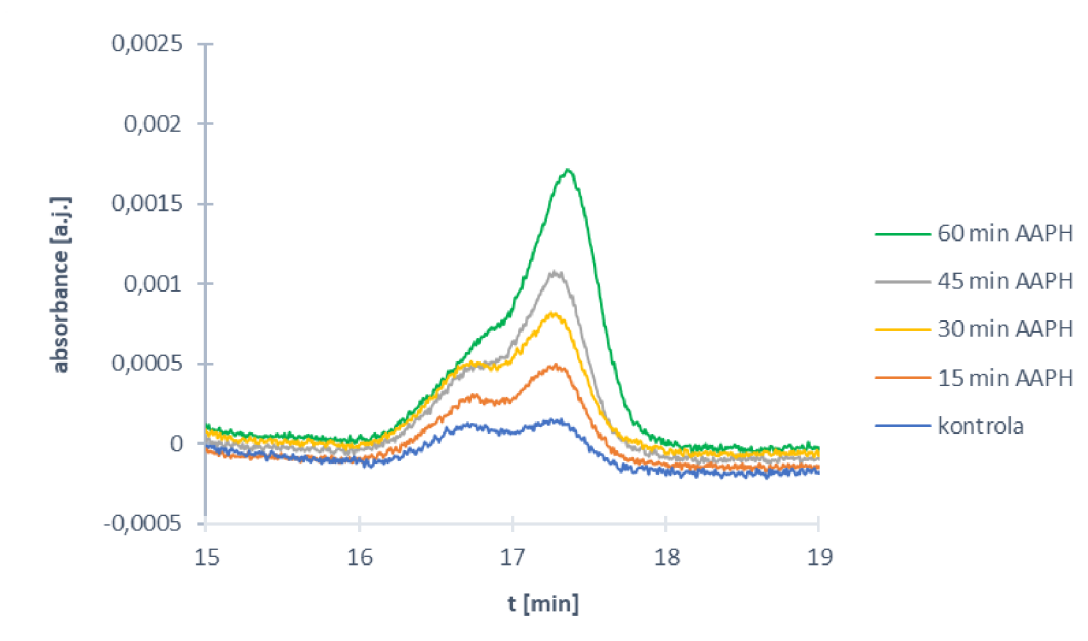
Obrázek 15 Kalibrační křivka MDA. Data byly proloženy přímkou s rovnicí zobrazenou v grafu.



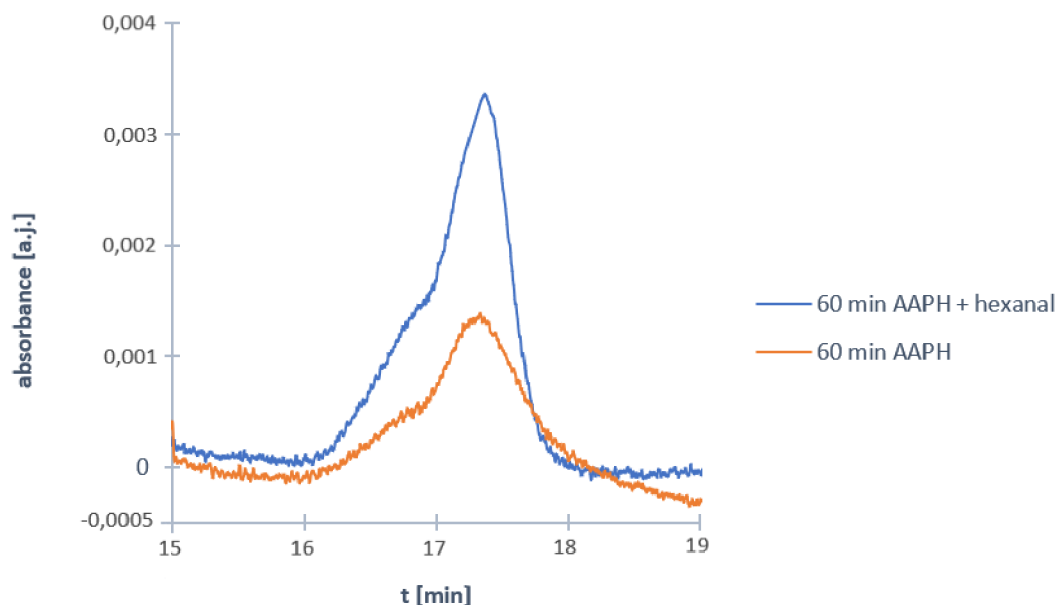
Obrázek 16 Sloupcový graf časové závislosti tvorby MDA-DNPH při působení AAPH (10mM) na extrakt z kožních buněk. Zobrazené hodnoty jsou průměry ( $n=6, \pm SD$ ) a vyjadřují množství MDA-DNPH na 1 g kůže. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolou a ošetřenými vzorky byly stanoveny pomocí neparametrického Kruskal Wallisova testu s post hoc Nemenyiho testem na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkou (\*).

Druhým sledovaným produktem lipidové peroxidace byl hexanal. I zde vlivem AAPH došlo k nárůstu množství hexanal-DNPH aduktů oproti kontrole (Obrázek 17).

Opět je vidět, stabilní hodnota hexanal-DNPH aduktu i v kontrolním vzorku. V 60 minutě bylo množství hexanal-DNPH aduktu dokonce téměř 5 x větší než u kontroly. Pík hexanal-DNPH byl ověřen pomocí vnitřního standartu hexanalu (Obrázek 18).

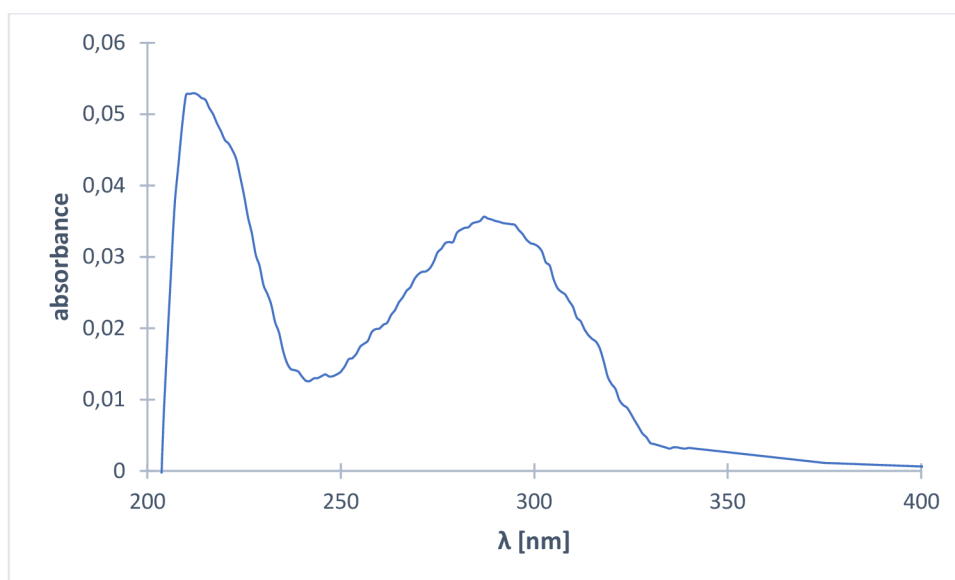


Obrázek 17 **Chromatogram časové závislosti tvorby hexanal-DNPH aduktu při působení azoiniciátoru AAPH na extrakt z kožních buněk.** Extrakt z kožních buněk byl inkubován po určitou dobu s AAPH (10mM) při 37°C. Separace byla provedena na reverzní fázi kolonou C18 (150 x 3 mm, 3 $\mu$ m) za použití mobilní fáze acetonitril/voda v poměru 50:50 při toku 0,5 ml/min. Chromatogram je zobrazen při  $\lambda = 360$  nm. Nástřik vzorku byl 50  $\mu$ l.



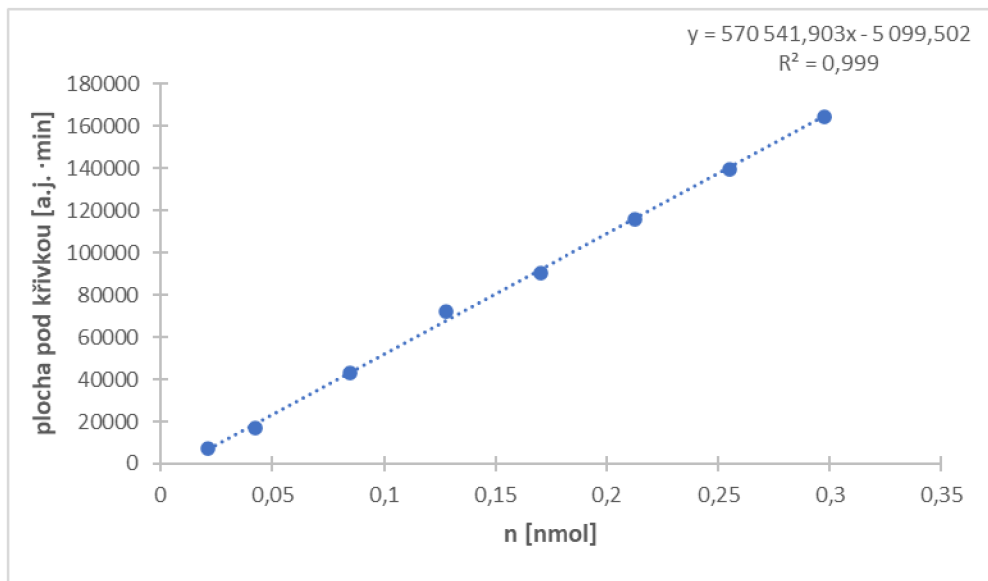
Obrázek 18 **Ověření hexanal-DNPH aduktu vnitřním standardem.** Ke vzorku inkubovanému 60 min s AAPH (10mM) byl přidán standart hexanalu. Po derivatizaci byla provedena separace na reverzní fázi kolonou C18 (150 x 3 mm, 3 $\mu$ m) za použití mobilní fáze acetonitril/voda v poměru 50:50 při toku 0,5 ml/min. Chromatogram je zobrazen při  $\lambda = 360$  nm. Nástřik vzorku byl 50  $\mu$ l.

Plochy pod píkem byly pomocí kalibrační křivky standartu hexanalů přepočítány na látkové množství (Obrázek 20). K vytvoření kalibrační křivky byla nejprve určena koncentrace zásobního roztoku standartu hexanalů z absorpčního spektra (Obrázek 19).

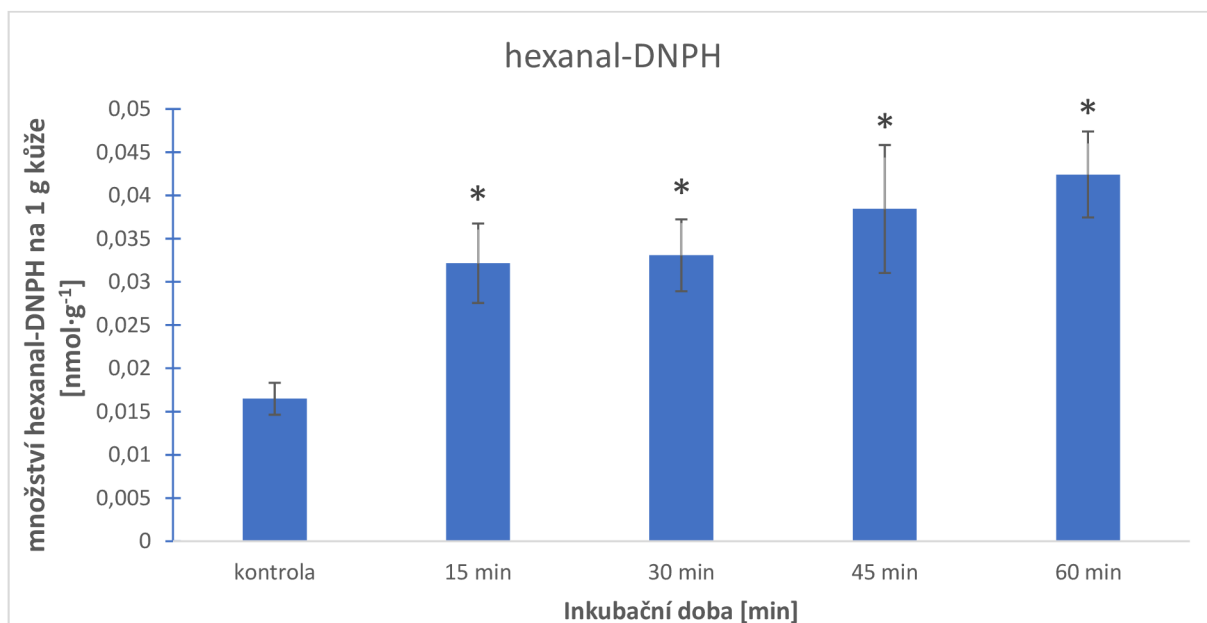


Obrázek 19 Absorpční spektrum hexanalů.

Absorpční spektrum hexanalů ukazuje dva píky, kdy koncentrace byla vyhodnocována z prvního píku, druhý pík tvoří nejspíše oligomery hexanalů. Následně pomocí Lambert-Beerova zákona (molární absorpční koeficient hexanalů  $\epsilon_{223} = 13750 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) byla dopočítána koncentrace roztoku. Hodnoty a směrodatné odchylky byly vyneseny ve sloupcovém grafu (Obrázek 21). Ze sloupcového grafu je možné vidět, že u hexanal-DNPH aduktu nejprve dochází k výraznějšímu nárůstu u 15 min oproti kontrole, u 30 min není zaznamenán výraznější nárůst oproti 15 min. K dalšímu nárůstu poté dochází u 45 min a 60 min. Statisticky významné rozdíly byly pozorovány mezi kontrolním vzorkem a všemi vzorky ošetřenými AAPH.



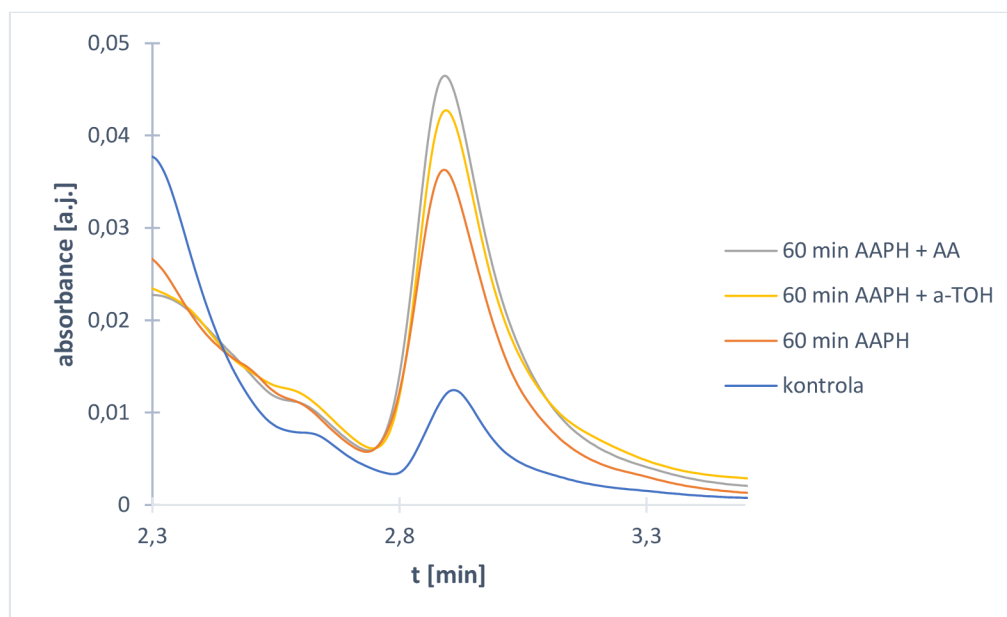
Obrázek 20 Kalibrační křivka standartu hexanal. Data byly proloženy přímkou s rovnicí zobrazenou v grafu.



Obrázek 21 **Sloupcový graf časové závislosti tvorby hexanal-DNPH při působení AAPH (10mM) na extrakt z kožních buněk.** Zobrazené hodnoty jsou průměry ( $n=6$ ,  $\pm$  SD) a vyjadřují množství hexanal-DNPH na 1 g kůže. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolou a ošetřenými vzorky byly stanoveny pomocí neparametrického Kruskal Wallisova testu s post hoc Nemenyiho testem na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkou (\*).

## 5.2 Vliv vybraných antioxidantů na tvorbu malondialdehydu a hexanalů

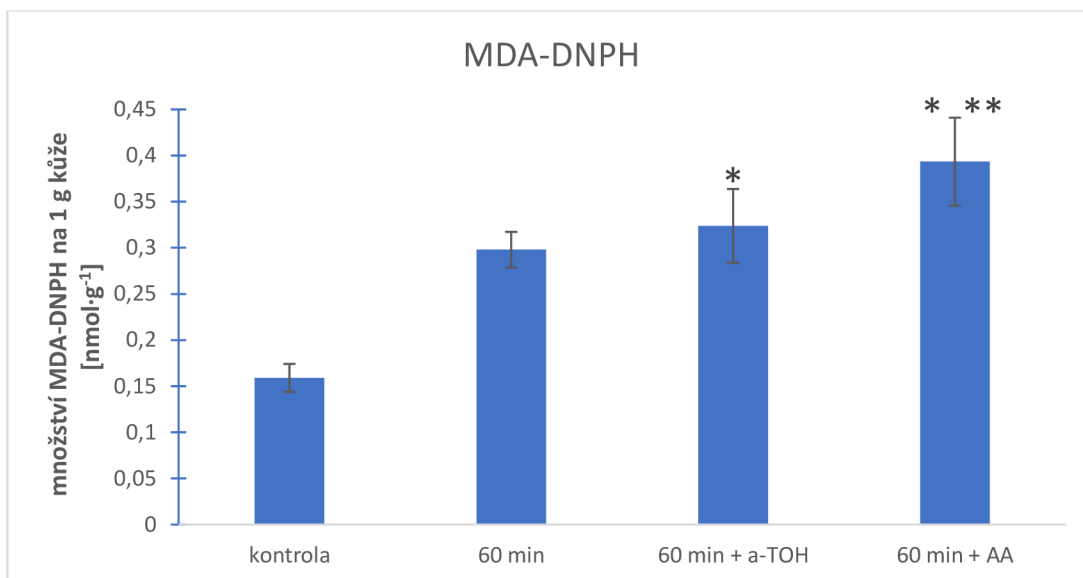
Byly vybrány dva antioxidanty, lipofilní  $\alpha$ -tokoferol ( $\alpha$ -TOH) a hydrofilní kyselina askorbová (AA), u kterých byl sledován vliv na tvorbu MDA a hexanalů v kůži. U obou antioxidantů dochází k nárůstu MDA-DNPH aduktu oproti kontrole i vzorku inkubovanému 60 minut s AAPH (Obrázek 22).



Obrázek 22 Chromatogram zobrazující vliv dvou antioxidantů na MDA-DNPH adukt v extraktu z kožních buněk. Extrakt z kožních buněk byl inkubován po 60 min s AAPH (10mM) a zároveň s antioxidantem  $\alpha$ -TOH (1mM) nebo AA (1mM) při 37°C. Separace byla provedena na reverzní fázi kolonou C18 (150 x 3 mm, 3 $\mu$ m) za použití mobilní fáze acetonitril/voda v poměru 50:50 při toku 0,5 ml/min. Chromatogram je zobrazen při  $\lambda = 310$  nm. Nástřik vzorku byl 50  $\mu$ l.

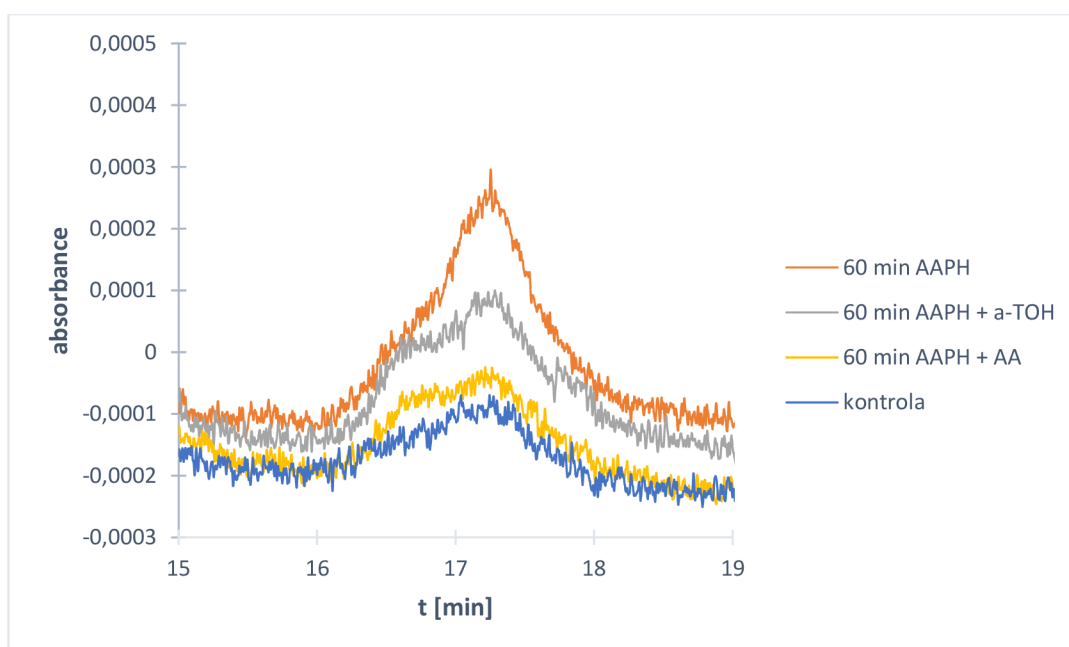
K nejvyššímu nárůstu dochází u AA, oproti kontrole došlo k nárůstu MDA-DNPH o téměř 60 %. Při porovnání vzorku bez antioxidantu (60 min AAPH) se vzorky s antioxidanty byl zaznamenán nárůst o více než 10 % u  $\alpha$ -TOH a 40 % u AA. Plochy pod pikem a směrodatné odchylky byly přepočítány a vyneseny ve sloupcovém grafu (Obrázek 23).





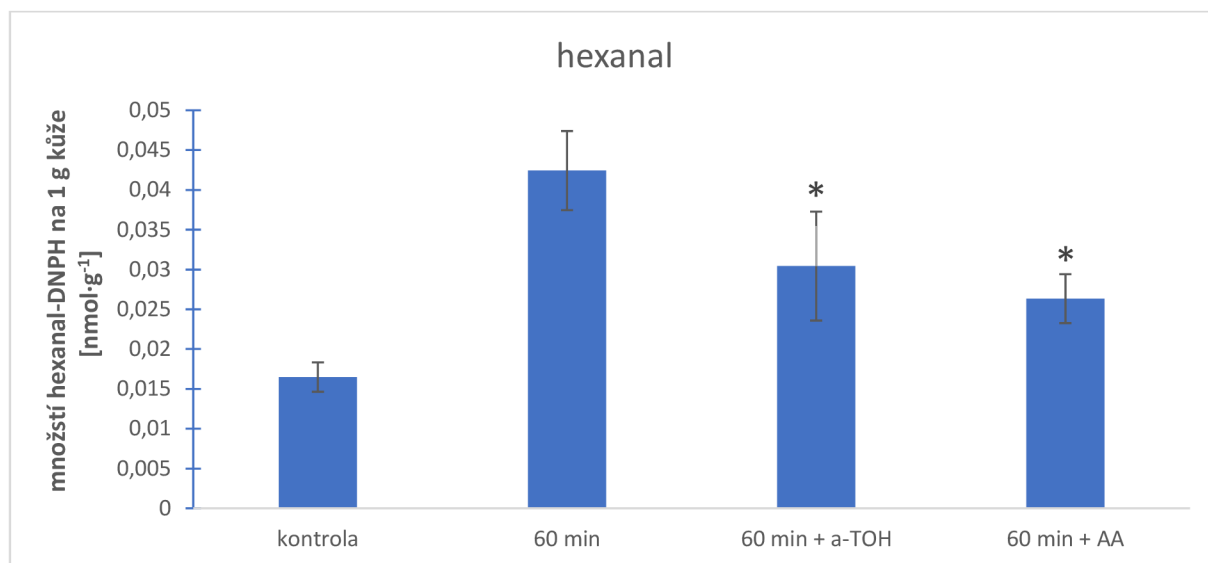
Obrázek 23 Sloupcový graf vlivu působení antioxidantů a-TOH (1mM) a AA (1mM) na tvorbu MDA-DNPH při působení AAPH (10mM) na extrakt z kožních buněk. Zobrazené hodnoty jsou průměry ( $n=6$ ,  $\pm$  SD) a vyjadřují množství MDA-DNPH na 1 g kůže. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolním vzorkem, vzorkem ošetřeným AAPH bez antioxidantu a vzorky ošetřenými antioxidanty byly stanoveny pomocí neparametrického Kruskal Wallisova testu s post hoc Nemenyiho testem na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Statisticky významné rozdíly mezi kontrolním vzorkem a vzorky ošetřenými AAPH i antioxidanty jsou označeny hvězdičkou (\*), statisticky významné rozdíly mezi vzorkem ošetřeným jen AAPH a vzorky ošetřenými AAPH i antioxidanty jsou označeny dvěma hvězdičkami (\*\*).

Dále byl pozorován vliv antioxidantů na hexanal-DNPH adukt. U obou antioxidantů dochází k poklesu hexanal-DNPH aduktu oproti vzorku s AAPH (Obrázek 24).



Obrázek 24 Chromatogram zobrazující vliv dvou antioxidantů na hexanal-DNPH adukt v extraktu z kožních buněk. Extrakt z kožních buněk byl inkubován po 60 min s AAPH (10mM) a zároveň s antioxidantem a-TOH (1mM) nebo AA (1mM) při 37°C. Separace byla provedena na reverzní fázi kolonou C18 (150 x 3 mm, 3 $\mu$ m) za použití mobilní fáze acetonitril/voda v poměru 50:50 při toku 0,5 ml/min. Chromatogram je zobrazen při  $\lambda = 360$  nm. Nástřik vzorku byl 50  $\mu$ l.

Při použití  $\alpha$ -TOH byl zaznamenán pokles o 60 %, u AA dokonce až o 100 % oproti vzorku s AAPH. Plochy pod píkem a směrodatné odchylky jednotlivých vzorků jsou porovnány ve sloupcovém grafu (Obrázek 25).



Obrázek 25 Sloupcový graf vlivu působení antioxidantů  $\alpha$ -TOH (1mM) a AA (1mM) na tvorbu hexanal-DNPH při působení AAPH (10mM) na extrakt z kožních buněk. Zobrazené hodnoty jsou průměry ( $n=6, \pm SD$ ) a vyjadřují množství hexanal-DNPH na 1 g kůže. Statisticky významné rozdíly mezi vzorkem ošetřeným AAPH bez antioxidantu a vzorky ošetřenými antioxidanty byly stanoveny pomocí neparametrického Kruskal Wallisova testu s post hoc Nemenyiho testem na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkou (\*).

## 6. Diskuze

Lipidová peroxidace je předmětem studií již od 50. let 20. století, sekundární produkty jako jsou reaktivní karbonyly pak od 80. let 20. století. Tato práce byla nejprve zaměřena na detekci sekundárních produktů lipidové peroxidace v kožních buňkách při použití azoiniciátoru. Pomocí HPLC-PDA analýzy byly detekovány dva produkty lipidové peroxidace a to MDA-DNPH adukt a hexanal-DNPH adukt v extraktu z kožních buněk. Tyto produkty vykazovaly nárůst po celou sledovanou dobu. Tvorba MDA způsobená lipidovou peroxidací iniciovanou AAPH byla již dříve studována na mnohých živočišných modelech např. na krysích játrech (Palozza *et al.* 1995, Zhang, Omaye 2001), krysím séru (Depboylu *et al.* 2007), kuřecích erytrocytech (Zhang *et al.* 2014), prasečí sítnici (Nakanishi-Ueda *et al.* 2006) nebo lidské plazmě (Lotito, Fraga 1998). Tvorba hexanalů pomocí AAPH není tak hojně studována jako MDA. Nárůst hexanalů za použití AAPH byl zaznamenán např. v hovězích játrech (Lynch *et al.* 2001) nebo lidské krvi (Chu, Liu 2004).

Lipidová peroxidace v kožních buňkách byla hlavně studována ve spojení s UV zářením (Yamazaki *et al.* 1999, Grundmann *et al.* 2004, Kuhn *et al.* 2006, Barcelos *et al.* 2014). Rynkowska *et al.* (2021) sledovali nárůst MDA způsobený Fentonovou reakcí v prasečích kožních buňkách.

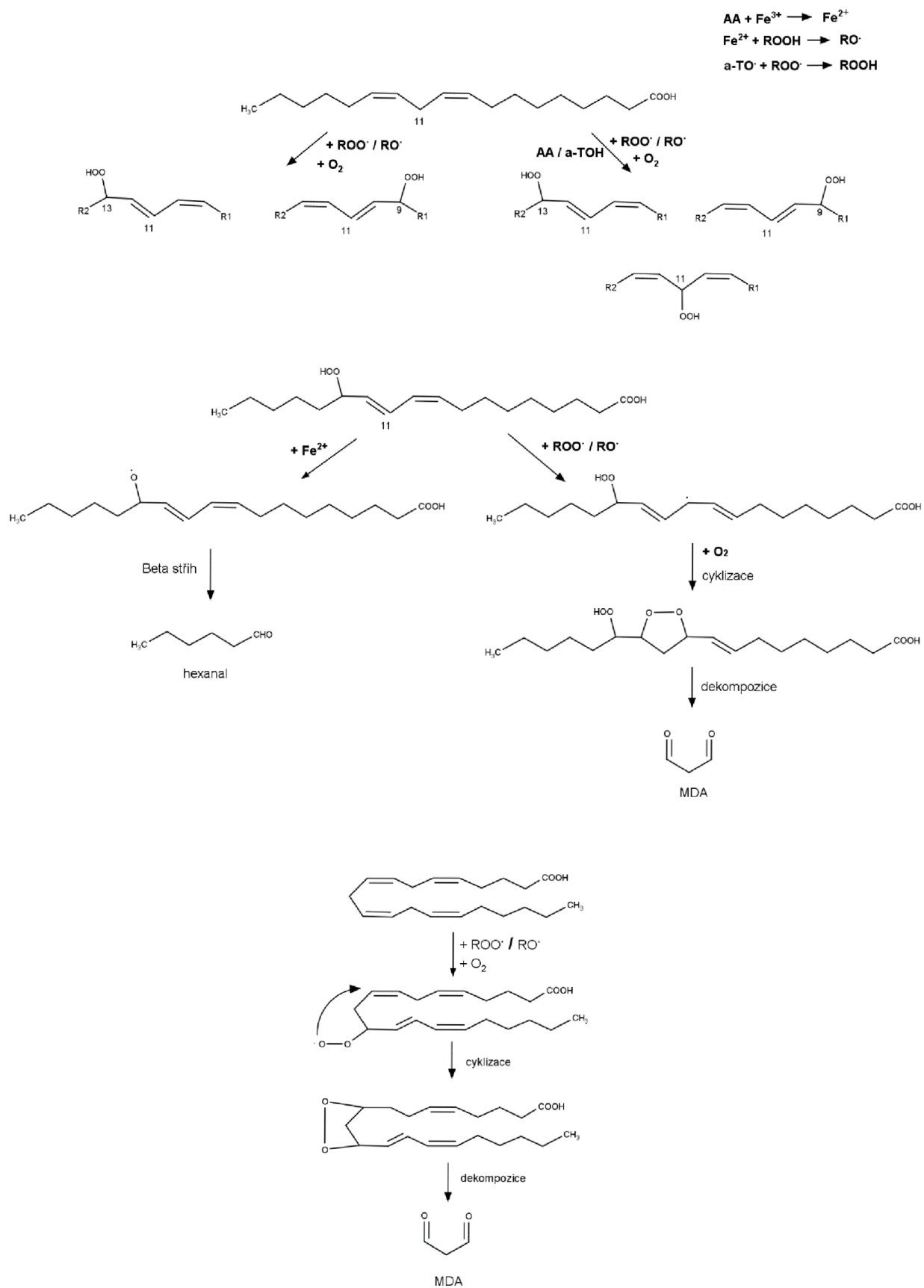
Jak již bylo dříve zmíněno MDA je produktem lipidové peroxidace převážně omega-6 nenasycených mastných kyselin. V kůži se nachází kyselina arachidonová, ze které pravděpodobně vzniká MDA-DNPH adukt detekovaný v této práci. Tvorbu MDA z kyseliny arachidonové popsal již Pryor *et al.* (1976), jako produkt dekompozice endoperoxidů. Už Hamberg a Samuelsson (1967) detekovali MDA vytvořené z kyseliny arachidonové.

Nicméně nejvíce zastoupenou nenasycenou mastnou kyselinou v kůži je kyselina linolová. Během peroxidace kyseliny linolové vznikají jako primární produkty ROOH, které jsou nestabilní a dále se rozkládají na sekundární produkty mezi, které patří i v této práci detekovaný hexanal. Ve shodě s výsledky diplomové práce, Cao *et al.* (2014) detekovali hexanal jako sekundární produkt lipidové peroxidace kyseliny linolové, nicméně společně s hexanalem byl detekován i nonenal, který v diplomové práci nebyl detekován. Podle Mas-Bargues *et al.* (2021) může docházet k tvorbě MDA i z kyseliny linolové. Produkci MDA z kyseliny linolové detekovali již Tamura, Shibamoto (1991),

kdy v této práci byla použita Fentonova reakce k iniciaci lipidové peroxidace. Tsikas (2017) navrhuje možnou tvorbu MDA z kyseliny linolové nejprve vytvořením endoperoxidu a následné dekompozice na MDA. Tomuto mechanismu tvorby by odpovídalo i mnohem větší množství námi detekovaného MDA než hexanal, jelikož během tvorby MDA z endoperoxidu kyseliny linolové nedochází k tvorbě hexanal. V této práci použitý azoiniciátor AAPH vytváří  $ROO^\bullet$ , který interaguje s kyselinou linolovou za vzniku hydroperoxidu. Tento hydroperoxid se dále rozkládá na příslušný  $ROO^\bullet$  nebo  $RO^\bullet$ . Nicméně podle Miyashita *et al.* (1985) může dojít k další adici  $ROO^\bullet$  na konjugovaný hydroperoxid kyseliny linolové. Vzniká tak  $R^\bullet$  a následnou adicí  $O_2$  a cyklizací vzniká endoperoxid. Ten poté podléhá dekompozici na MDA.

Další část této diplomové práce byla zaměřena na vliv antioxidantů na tvorbu MDA a hexanal v kožních buňkách. Byl studován vliv lipofilního  $\alpha$ -TOH a hydrofilního AA. Při použití obou antioxidantů byl pozorován nárůst MDA-DNPH aduktu oproti kontrolním vzorkům. V tomto případě se tedy oba antioxidanty chovají jako prooxidanty. Jak již bylo zmíněno při větší míře oxidace může vlivem  $\alpha$ -TOH docházet k zvýšené tvorbě ROOH ze kterého poté může vznikat MDA. Naproti tomu AA vykazuje prooxidační účinky v přítomnosti přechodných kovů. Je dobře známo, že kůže za fyziologických podmínek obsahuje železo (Molin, Wester 1976, Kurz *et al.* 1987). A právě AA může redukovat  $Fe^{3+}$  na  $Fe^{2+}$ . Železnaté kationty  $Fe^{2+}$  poté mohou redukovat  $H_2O_2$  na  $HO^\bullet$  a ROOH na  $RO^\bullet$ . Následuje Fentonova reakce, u které již byl detekován nárůst MDA v prasečích kožních buňkách (Rynkowska *et al.* 2021). Laudicina, Marnett (1990) zaznamenali významný prooxidační efekt AA při sledování lipidové peroxidace v krysích játrech a přisuzují tento efekt právě schopnosti AA redukovat kovové ionty.

U hexanal-DNPH aduktu byl zaznamenán pokles u obou antioxidantů oproti vzorku ošetřeném AAPH bez antioxidantu. Větší pokles byl naměřen při použití AA než  $\alpha$ -TOH. Yin *et al.* (2011) popisuje vliv donorů H jako je např.  $\alpha$ -TOH na tvorbu hydroperoxidů kyseliny linolové. Pokud se  $\alpha$ -TOH chová jako prooxidant dochází k tvorbě hydroperoxidů na C11, C9 a C13 kyseliny linolové v poměru 1:1:1. Při oxidaci bez  $\alpha$ -TOH se netvoří žádný nebo nedetekovatelné množství C11 hydroperoxidu. Efekt na tvorbu hydroperoxidu má i AA. A právě z C11 hydroperoxidu nemůže vznikat hexanal jako produkt lipidové peroxidace, což koresponduje s našimi naměřenými výsledky. Kompletní schéma tvorby sekundárních produktů detekovaných v této práci je shrnuto na Obrázku 26.



Obrázek 26 Schéma lipidové peroxidace kyseliny linolové a arachidonové.

## 7. Závěr

Cílem této práce byla detekce sekundárních produktů lipidové peroxidace v kůži z prasečích uší. Lipidová peroxidace byla iniciována použitím azoiniciátoru AAPH na homogenát z kožních buněk. Sekundární produkty lipidové peroxidace byly následně vyizolovány a analyzovány pomocí HPLC-PDA s využitím derivatizačního činidla DNPH. Analýza ukázala přítomnost dvou sekundárních produktů lipidové peroxidace MDA-DNPH a hexanal-DNPH aduktu. Použitím vnitřního standartu a následnou analýzou bylo ověřeno, že se skutečně jedná o MDA-DNPH a hexanal-DNPH adukt. U těchto karbonylů byla sledována časová závislost jejich tvorby při působení azoiniciátoru po dobu 15, 30, 45 a 60 min. U obou produktů byl zaznamenán nárůst ve všech stanovených časech oproti kontrolnímu vzorku bez AAPH. Detekované množství MDA-DNPH aduktu bylo v 60 min až 40x větší než hexanal-DNPH aduktu. Provedením statistické analýzy se potvrdilo, že nárůst MDA-DNPH i hexanal-DNPH aduktu je statisticky významný.

Předpokládáme, že námi detekovaný MDA-DNPH adukt vzniká lipidovou peroxidací kyseliny arachidonové a linolové. Azoiniciátor vytváří  $\text{ROO}^\bullet$ , který vytrhne H z kyseliny arachidonové, vzniká tak  $\text{R}^\bullet$  a následnou adicí  $\text{O}_2$  dochází k tvorbě  $\text{ROO}^\bullet$ . Tento  $\text{ROO}^\bullet$  cyklizací vytvoří endoperoxid, který dekompozicí produkuje MDA. Tvorba MDA z kyseliny linolové probíhá stejně, nicméně výchozí látkou je již dříve vytvořený hydroperoxid, na kterém dochází k tvorbě  $\text{R}^\bullet$  vlivem  $\text{ROO}^\bullet$ . Hexanal-DNPH adukt je produktem lipidové peroxidace kyseliny linolové. Peroxylový radikál vytrhne H z kyseliny linolové a následnou adicí  $\text{O}_2$  vzniká  $\text{ROO}^\bullet$ . Interakcí s RH vzniká hydroperoxid. Jen C13 hydroperoxydy mohou vést na tvorbu hexanalů, který vzniká redukcí a následným beta stříhem těchto hydroperoxidů.

V další části práce byl sledován vliv antioxidantů na tvorbu MDA-DNPH a hexanal-aduktu pomocí AAPH. Byly použity dva antioxidanty, a to hydrofilní AA a lipofilní  $\alpha$ -TOH. U obou antioxidantů byl zaznamenán nárůst MDA-DNPH aduktu oproti vzorku bez antioxidantu. Statistická analýza potvrdila nárůst MDA-DNPH po použití antioxidantů oproti kontrolnímu vzorku bez AAPH i antioxidantů tak i u vzorku s AAPH jako statisticky významný. Oba antioxidanty se tedy v tomto případě chovají jako prooxidanty, čímž podporují tvorbu MDA-DNPH aduktu.

Nicméně u hexanal-DNPH aduktu byl zaznamenán pokles po použití obou antioxidantů oproti vzorku s AAPH bez antioxidantu. Provedenou statistickou analýzou bylo potvrzeno, že pokles mezi vzorky ošetřenými AAPH a antioxidanty a vzorkem s AAPH bez antioxidantu je statisticky významný. Domníváme se, že zde dochází k poklesu kvůli působení antioxidantů na tvorbu hydroperoxidů kyseliny linolové. V případě, kdy se AA i  $\alpha$ -TOH chovají jako prooxidanty dochází k zvýšené produkci C11 hydroperoxidu, který nevede na tvorbu hexanalu.

Na výsledky z této diplomové práce by mohlo být navázáno při dalším studiu lipidové peroxidace v kožních buňkách. Další práce by mohly být rozšířeny o detekci většího spektra produktů lipidové peroxidace, ale i vlivu jiných antioxidantů. Také by mohl být studován vliv současného působení AA a  $\alpha$ -TOH vzhledem k tomu, že tyto antioxidanty se chovají synergicky.

## 8. Seznam literatury

- Ayala A., Munoz M. F., Arguelles S. (2014) Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* **2014**, 360438.
- Bae Y. S., Oh H., Rhee S. G., Yoo Y. D. (2011) Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Mol Cells* **32**, 491-509.
- Barcelos R. C. S., Vey L. T., Segat H. J., Roversi K., Roversi K., Dias V. T., Trevizol F., Kuhn F. T., Dolci G. S., Pase C. S., Piccolo J., Veit J. C., Emanuelli T., Luz S. C. A., Burger M. E. (2014) Cross-generational trans fat intake exacerbates UV radiation-induced damage in rat skin. *Food and Chemical Toxicology* **69**, 38-45.
- Beyer R. E. (1994) THE ROLE OF ASCORBATE IN ANTIOXIDANT PROTECTION OF BIOMEMBRANES - INTERACTION WITH VITAMIN-E AND COENZYME-Q. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **26**, 349-358.
- Bhandary B., Marahatta A., Kim H.-R., Chae H.-J. (2012) An involvement of oxidative stress in endoplasmic reticulum stress and its associated diseases. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 434-456.
- Bielski B. H. J., Arudi R. L., Sutherland M. W. (1983) A STUDY OF THE REACTIVITY OF HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>- WITH UNSATURATED FATTY-ACIDS. *Journal of Biological Chemistry* **258**, 4759-4761.
- Bielski B. H. J., Cabelli D. E. (1995) Superoxide and Hydroxyl Radical Chemistry in Aqueous Solution. *Active Oxygen in Chemistry*. C. S. Foote, J. S. Valentine, A. Greenberg and J. F. Liebman. Dordrecht, Springer Netherlands: 66-104.
- Brash A. R. (2000) Autoxidation of methyl linoleate: identification of the bis-allylic 11-hydroperoxide. *Lipids* **35**, 947-952.
- Brigelius-Flohé R., Maiorino M. (2013) Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* **1830**, 3289-3303.
- Brown A. J., Dean R. T., Jessup W. (1996) Free and esterified oxysterol: formation during copper-oxidation of low density lipoprotein and uptake by macrophages. *J Lipid Res* **37**, 320-335.
- Cao J., Zou X. G., Deng L., Fan Y. W., Li H., Li J., Deng Z. Y. (2014) Analysis of nonpolar lipophilic aldehydes/ketones in oxidized edible oils using HPLC-QqQ-MS for the evaluation of their parent fatty acids. *Food Research International* **64**, 901-907.
- Deliconstantinos G., Villiotou V., Stavrides J. C. (1996) Alterations of nitric oxide synthase and xanthine oxidase activities of human keratinocytes by ultraviolet B radiation - Potential role for peroxynitrite in skin inflammation. *Biochemical Pharmacology* **51**, 1727-1738.
- Depboylu B., Dogru-Abbasoglu S., Aykac-Toker G., Uysal M. (2007) Increased susceptibility of serum and apo-B-containing lipoproteins to peroxidation in aged rats. *Clinical and Experimental Medicine* **7**, 158-163.
- Dizdaroglu M., Jaruga P. (2012) Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res* **46**, 382-419.
- Dröge W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**, 47-95.
- Du J., Cullen J. J., Buettner G. R. (2012) Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* **1826**, 443-457.
- Esterbauer H., Eckl P., Ortner A. (1990) Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat Res* **238**, 223-233.



- Esterbauer H., Schaur R. J., Zollner H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* **11**, 81-128.
- Fransen M., Nordgren M., Wang B., Apanasets O. (2012) Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease. *Biochim Biophys Acta* **1822**, 1363-1373.
- Frühbeck G., Gómez-Ambrosi J., Muruzábal F. J., Burrell M. A. (2001) The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E827-847.
- Gaschler M. M., Stockwell B. R. (2017) Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* **482**, 419-425.
- Girotti A. W. (1998) Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* **39**, 1529-1542.
- Grundmann J. U., Wiswedel I., Hirsch D., Gollnick H. P. M. (2004) Detection of monohydroxyeicosatetraenoic acids and F-2-isoprostanes in microdialysis samples of human UV-irradiated skin by gas chromatography-mass spectrometry. *Skin Pharmacology and Physiology* **17**, 37-41.
- Gutteridge J. M. C. (1995) Lipid-Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue-Damage. *Clinical Chemistry* **41**, 1819-1828.
- Halliwell B., Gutteridge, J.M.C. (2007) *Free radicals in biology and medicine* New York, Oxford University Press.
- Hamanaka R. B., Glasauer A., Hoover P., Yang S. N., Blatt H., Mullen A. R., Getsios S., Gottardi C. J., DeBerardinis R. J., Lavker R. M., Chandel N. S. (2013) Mitochondrial Reactive Oxygen Species Promote Epidermal Differentiation and Hair Follicle Development. *Science Signaling* **6**, 9.
- Han I. H., Csallany A. S. (2009) Formation of Toxic alpha,beta-Unsaturated 4-Hydroxy-Aldehydes in Thermally Oxidized Fatty Acid Methyl Esters. *Journal of the American Oil Chemists Society* **86**, 253-260.
- Harrison R. (2002) Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med* **33**, 774-797.
- Howard J. A., Ingold K. U. (1968) SELF-REACTION OF SEC-BUTYLPEROXY RADICALS . CONFIRMATION OF RUSSELL MECHANISM. *J Am Chem Soc* **90**, 1056-&.
- Huang Z. R., Lin Y. K., Fang J. Y. (2009) Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology. *Molecules* **14**, 540-554.
- Choe E., Min D. B. (2006) Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **5**, 169-186.
- Chu Y. F., Liu R. H. (2004) Novel low-density lipoprotein (LDL) oxidation model: Antioxidant capacity for the inhibition of LDL oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 6818-6823.
- Kohen R., Nyska A. (2002) Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* **30**, 620-650.
- Kuhn M., Wolber R., Kolbe L., Schnorr O., Sies H. (2006) Solar-simulated radiation induces secretion of IL-6 and production of isoprostanes in human skin in vivo. *Archives of Dermatological Research* **297**, 477-479.
- Kukreja R. C., Kontos H. A., Hess M. L., Ellis E. F. (1986) SUPEROXIDE GENERATION BY PROSTAGLANDIN SYNTHETASE AND LIPOXYGENASE IN PRESENCE OF NADH OR NADPH. *Federation Proceedings* **45**, 451-451.

- Kurz K., Steigleder G. K., Bischof W., Gonsior B. (1987) PIXE ANALYSIS IN DIFFERENT STAGES OF PSORIATIC SKIN. *Journal of Investigative Dermatology* **88**, 223-226.
- Lane N. (2002) *Oxygen: The Molecule That Made the World*.
- Laudicina D. C., Marnett L. J. (1990) Enhancement of hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in rat liver microsomes by ascorbic acid. *Arch Biochem Biophys* **278**, 73-80.
- Lipinski B., Pretorius E. (2012) Hydroxyl radical-modified fibrinogen as a marker of thrombosis: the role of iron. *Hematology* **17**, 241-247.
- Lotito S. B., Fraga C. G. (1998) (+)-catechin prevents human plasma oxidation. *Free Radical Biology and Medicine* **24**, 435-441.
- Lynch M. P., Faustman C., Silbart L. K., Rood D., Furr H. C. (2001) Detection of lipid-derived aldehydes and aldehyde : protein adducts in vitro and in beef. *Journal of Food Science* **66**, 1093-1099.
- Macan A. M., Kraljevic T. G., Raic-Malic S. (2019) Therapeutic Perspective of Vitamin C and Its Derivatives. *Antioxidants* **8**, 36.
- Miyashita K., Hara N., Fujimoto K., Kaneda T. (1985) DIMERS FORMED IN OXYGENATED METHYL LINOLEATE HYDROPEROXIDES. *Lipids* **20**, 578-587.
- Mlakar A., Spiteller G. (1996) Dihydroxy and hydroxyoxo fatty acids as products of nonenzymic lipid peroxidation of polyunsaturated fatty acids. *Chem Phys Lipids* **82**, 25-32.
- Moldovan L., Moldovan N. I. (2004) Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochem Cell Biol* **122**, 395-412.
- Molin L., Wester P. O. (1976) ESTIMATED DAILY LOSS OF TRACE-ELEMENTS FROM NORMAL SKIN BY DESQUAMATION. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* **36**, 679-682.
- Muller F. L., Lustgarten M. S., Jang Y., Richardson A., Van Remmen H. (2007) Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med* **43**, 477-503.
- Nakanishi-Ueda T., Kamegawa M., Ishigaki S., Tsukahara M., Yano S., Wada K., Yasuhara H. (2006) Inhibitory effect of lutein and pycnogenol on lipid peroxidation in porcine retinal homogenate. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **38**, 204-210.
- Nielsen G. S., Larsen L. M., Poll L. (2004) Formation of volatile compounds in model experiments with crude leek (*Allium ampeloprasum* var. Lancelot) enzyme extract and linoleic acid or linolenic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 2315-2321.
- Niki E. (2009) Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology and Medicine* **47**, 469-484.
- Niki E., Yoshida Y., Saito Y., Noguchi N. (2005) Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 668-676.
- Niki E. (2015) Lipid oxidation in the skin. *Free Radic Res* **49**, 827-834.
- Nimse S. B., Pal D. (2015) Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Rsc Advances* **5**, 27986-28006.
- Palozza P., Calviello G., Bartoli G. M. (1995) PROOXIDANT ACTIVITY OF BETA-CAROTENE UNDER 100-PERCENT OXYGEN-PRESSURE IN RAT-LIVER MICROSOMES. *Free Radical Biology and Medicine* **19**, 887-892.
- Papparella I., Ceolotto G., Lenzini L., Mazzoni M., Franco L., Sartori M., Ciccariello L., Semplicini A. (2005) Angiotensin II-induced over-activation of p47phox in fibroblasts from hypertensives: which role in the enhanced ERK1/2 responsiveness to angiotensin II? *Journal of Hypertension* **23**, 793-800.

- Pappas A. (2009) Epidermal surface lipids. *Dermatoendocrinol* **1**, 72-76.
- Peyrat-Maillard M. N., Cuvelier M. E., 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**, 1007-1012.
- Phaniendra A., Jestadi D. B., Periyasamy L. (2015) Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* **30**, 11-26.
- Porter N. A., Caldwell S. E., Mills K. A. (1995) Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* **30**, 277-290.
- Pratt D. A., Mills J. H., Porter N. A. (2003) Theoretical calculations of carbon-oxygen bond dissociation enthalpies of peroxy radicals formed in the autoxidation of lipids. *J Am Chem Soc* **125**, 5801-5810.
- Pryor W. A., Stanley J. P., Blair E., Cullen G. B. (1976) Autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Part I. Effect of ozone on the autoxidation of neat methyl linoleate and methyl linolenate. *Arch Environ Health* **31**, 201-210.
- Pryor W. A., Porter N. A. (1990) SUGGESTED MECHANISMS FOR THE PRODUCTION OF 4-HYDROXY-2-NONENAL FROM THE AUTOXIDATION OF POLYUNSATURATED FATTY-ACIDS. *Free Radical Biology and Medicine* **8**, 541-543.
- Rinnerthaler M., Bischof J., Streubel M. K., Trost A., Richter K. (2015) Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules* **5**, 545-589.
- Rinnerthaler M., Büttner S., Laun P., Heeren G., Felder T. K., Klinger H., Weinberger M., Stolze K., Grousl T., Hasek J., Benada O., Frydlova I., Klocker A., Simon-Nobbe B., Jansko B., Breitenbach-Koller H., Eisenberg T., Gourlay C. W., Madeo F., Burhans W. C., Breitenbach M. (2012) Yno1p/Aim14p, a NADPH-oxidase ortholog, controls extramitochondrial reactive oxygen species generation, apoptosis, and actin cable formation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 8658-8663.
- Rynkowska A., Stepniak J., Karbownik-Lewinska M. (2021) Melatonin and Indole-3-Propionic Acid Reduce Oxidative Damage to Membrane Lipids Induced by High Iron Concentrations in Porcine Skin. *Membranes* **11**, 8.
- Sevilla C. L., Becker D., Sevilla M. D. (1986) AN ELECTRON-SPIN-RESONANCE INVESTIGATION OF RADICAL INTERMEDIATES IN CHOLESTEROL AND RELATED-COMPOUNDS - RELATION TO SOLID-STATE AUTOXIDATION. *Journal of Physical Chemistry* **90**, 2963-2968.
- Shahidi F., Pegg R. B. (1994) HEXANAL AS AN INDICATOR OF THE FLAVOR DETERIORATION OF MEAT AND MEAT-PRODUCTS. *Lipids in Food Flavors*. C. T. Ho and T. G. Hartman. Washington, Amer Chemical Soc. **558**: 256-279.
- Schaur R. J. (2003) Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med* **24**, 149-159.
- Stadtman E. R., Levine R. L. (2000) Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci* **899**, 191-208.
- Steinbrenner H., Sies H. (2009) Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochim Biophys Acta* **1790**, 1478-1485.
- Stojiljkovic D., Pavlovic D., Arsic I. (2014) Oxidative Stress, Skin Aging and Antioxidant Therapy. *Acta Facultatis Medicae Naissensis* **31**, 207-217.
- Tamura H., Shibamoto T. (1991) Gas chromatographic analysis of malonaldehyde and 4-hydroxy-2-(E)-nonenal produced from arachidonic acid and linoleic acid in a lipid peroxidation model system. *Lipids* **26**, 170-173.

- Tsikakos D. (2017) Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem* **524**, 13-30.
- Turrens J. F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* **552**, 335-344.
- Venero J. L., Revuelta M., Atiki L., Santiago M., Toms-Camardiel M. C., Cano J., Machado A. (2003) Evidence for dopamine-derived hydroxyl radical formation in the nigrostriatal system in response to axotomy. *Free Radic Biol Med* **34**, 111-123.
- Wagner B. A., Buettner G. R., Burns C. P. (1994) FREE RADICAL-MEDIATED LIPID-PEROXIDATION IN CELLS - OXIDIZABILITY IS A FUNCTION OF CELL LIPID BIS-ALLYLIC HYDROGEN CONTENT. *Biochemistry* **33**, 4449-4453.
- Wahl R. U. R., Zeng L. S., Madison S. A., DePinto R. L., Shay B. J. (1998) Mechanistic studies on the decomposition of water soluble azo-radical-initiators. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2*, 2009-2017.
- Watabe T., Sawahata T. (1979) Biotransformation of cholesterol to cholestane-3beta,5alpha,6beta-triol via cholesterol alpha-epoxide (5alpha,6alpha-epoxycholestan-3beta-ol) in bovine adrenal cortex. *J Biol Chem* **254**, 3854-3860.
- Werber J., Wang Y. J., Milligan M., Li X., Ji J. A. (2011) Analysis of 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride degradation and hydrolysis in aqueous solutions. *J Pharm Sci* **100**, 3307-3315.
- Wiseman H., Halliwell B. (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* **313** ( Pt 1), 17-29.
- Yamamoto Y., Niki E., Kamiya Y. (1982) OXIDATION OF LIPIDS .1. QUANTITATIVE-DETERMINATION OF THE OXIDATION OF METHYL LINOLEATE AND METHYL LINOLENATE. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **55**, 1548-1550.
- Yamazaki S., Ozawa N., Hiratsuka A., Watabe T. (1999) Increases in cholesterol 7-hydroperoxides in lipids of human skin by sunlight exposure. *Free Radical Biology and Medicine* **26**, 1126-1133.
- Yin H., Porter N. A. (2005) New insights regarding the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Antioxid Redox Signal* **7**, 170-184.
- Yin H., Xu L., Porter N. A. (2011) Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev* **111**, 5944-5972.
- Zhang J. F., Hou X., Ahmad H., Zhang H., Zhang L. L., Wang T. (2014) Assessment of free radicals scavenging activity of seven natural pigments and protective effects in AAPH-challenged chicken erythrocytes. *Food Chemistry* **145**, 57-65.
- Zhang P., Omaye S. T. (2001) beta-Carotene: interactions with alpha-tocopherol and ascorbic acid in microsomal lipid peroxidation. *Journal of Nutritional Biochemistry* **12**, 38-45.