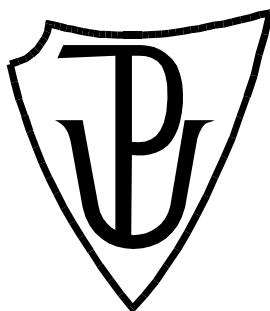


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## **Stanovení 4-hydroxynonenalu jako sekundárního produktu lipidové peroxidace v lidských nádorových buňkách**

### **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Martina Zehnálková</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. RNDr. Pavel Pospíšil, Ph.D.</b>
Konzultantka:	<b>Mgr. Ursula Ferretti</b>
Rok:	2020

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne ..... *podpis diplomanta*

### **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. RNDr. Pavlovi Pospíšilovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce, jeho čas a připomínky. Velký dík patří konzultantce Mgr. Ursule Ferretti za její pomoc s realizací experimentální části práce, cenné podněty, čas, vstřícnost a podporu, jež mi po celou dobu vypracovávání diplomové práce věnovala. Poděkování patří i mým nejbližším, kteří mne po celou dobu studia s láskou podporovali.

Diplomová práce byla finančně podpořena grantem č. IGA\_PrF\_2020\_028 s názvem "Inovativní a moderní přístupy v obecné a molekulární biofyzice".

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Martina Zehnálková
Název práce	Stanovení 4-hydroxynonenalu jako sekundárního produktu lipidové peroxidace v lidských nádorových buňkách
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Pavel Pospíšil, Ph.D.
Konzultantka	Mgr. Ursula Ferretti
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	<p>Lipidová peroxidace je děj řetězového oxidačního poškození polynenasycených mastných kyselin, jenž může způsobit i buněčnou smrt. Sekundárními produkty lipidové peroxidace jsou karbonyly o různé délce uhlíkového řetězce. Tato práce se zabývá stanovením sedmi karbonylů vznikajících lipidovou peroxidací pomocí HPLC/MS analýzy. Lipidová peroxidace byla iniciována hydroxylovým radikálem v chemickém systému kyseliny linoleové a v biologickém systému lidských rakovinných buněk. Ve vzorcích byly sledovány tyto karbonyly: malondialdehyd, formaldehyd, acetaldehyd, aceton, 4-hydroxynonenal, valeraldehyd a hexanal. Největší kinetické změny vykazoval malondialdehyd, formaldehyd a acetaldehyd. Z výsledků plyne, že 4-hydroxynonenal podléhá v prostředí hydroxylového radikálu rozkladu na jednoduché aldehydy: formaldehyd a acetaldehyd. Byl navržen mechanismus, kterým k tomuto štěpení dochází. Studie lipidové peroxidace mají význam pro její lepší porozumění a sledování ve výzkumu i potenciální klinické praxi.</p>
Klíčová slova	Lipidová peroxidace, 4-hydroxynonenal, HPLC
Počet stran	72
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Martina Zehnálková
Title	Determination of 4-hydroxynonenal as the secondary product of lipid peroxidation in human cancer cells
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Pavel Pospíšil, Ph.D.
Consultant	Mgr. Ursula Ferretti
The year of presentation	2020
Abstract	<p>Lipid peroxidation is a chain-reaction of oxidative damage of polyunsaturated fatty acids that can cause cell death. Secondary products of lipid peroxidation are carbonyls of different chain length. This study comprises the determination of seven carbonyls formed by lipid peroxidation by HPLC/MS analysis. Lipid peroxidation was initiated by the hydroxyl radical in linoleic acid samples (chemical system) and in samples of human cancer cells (biological system). The following carbonyls were detected in the samples: malondialdehyde, formaldehyde, acetaldehyde, acetone, 4-hydroxynonenal, valeraldehyde and hexanal. Malondialdehyde, formaldehyde and acetaldehyde showed the greatest changes in time. The results indicate that 4-hydroxynonenal undergoes decomposition into shorter aldehyde (formaldehyde and acetaldehyde) in the presence of hydroxyl radical. The mechanism of this cleavage was proposed. Studying of lipid peroxidation is important for its understanding and monitoring in research and potentially in clinical practice.</p>
Keywords	Lipid peroxidation, 4-hydroxynonenal, HPLC
Number of pages	72
Number of appendices	0
Language	Czech

## OBSAH

1	ÚVOD .....	9
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	10
2.1	Lipidová peroxidace.....	10
2.1.1	Neenzymatická lipidová peroxidace .....	10
2.1.2	Enzymatická lipidová peroxidace .....	12
2.1.3	Produkty lipidové peroxidace .....	14
2.1.3.1	Primární produkty lipidové peroxidace .....	14
2.1.3.2	Sekundární produkty lipidové peroxidace .....	15
2.2	4-hydroxynonenal .....	16
2.2.1	Vznik 4-hydroxynonenalu .....	17
2.2.2	Reaktivita 4-hydroxynonenalu.....	21
2.2.2.1	Buněčný metabolismus 4-hydroxynonenalu.....	22
2.2.2.2	Adukty 4-hydroxynonenalu s biomolekulami .....	23
2.2.3	Metody detekce a kvantifikace 4-hydroxynonenalu .....	26
2.2.4	Vliv 4-hydroxynonenalu na buňky .....	28
2.2.5	Vliv 4-hydroxynonenalu na zdraví .....	30
2.3	Porovnání 4-hydroxynonenalu a malondialdehydu .....	34
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	36
3.1	Materiál .....	36
3.1.1	Chemikálie .....	36
3.1.2	Přístrojové vybavení .....	36
3.2	Biologický materiál a kultivační podmínky.....	37
3.3	Metody .....	37
3.3.1	Příprava směsi standardů pro HPLC/MS analýzu .....	37
3.3.2	Příprava vzorků kyseliny linoleové pro HPLC/MS analýzu.....	38
3.3.3	Určení počtu a vitality buněk.....	38
3.3.4	Příprava biologických vzorků .....	39
3.3.5	Příprava biologických vzorků pro HPLC/MS analýzu .....	39
3.3.6	Příprava vzorků standardu 4-hydroxynonenalu pro test stability .....	39
3.3.7	HPLC/MS analýza vzorků .....	40
3.3.8	Statistická analýza.....	41

4	VÝSLEDKY .....	42
4.1	HPLC/MS analýza směsi standardů karbonylů .....	42
4.2	Vliv hydroxylového radikálu na tvorbu karbonylů ve vzorcích kyseliny linoleové.....	44
4.3	Vliv hydroxylového radikálu na tvorbu karbonylů v rakovinných buňkách ....	47
4.4	Vliv hydroxylového radikálu na stabilitu standardu 4-hydroxynonenalu.....	50
5	DISKUZE .....	53
6	ZÁVĚR .....	58
7	LITERATURA .....	60
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....	71

## **CÍLE PRÁCE**

### **Teoretická část**

Vypracovat literární rešerši na téma lipidová peroxidace a produkce 4-hydroxynonenalu, vliv 4-hydroxynonenalu na buňky a zdraví. Porovnat 4-hydroxynonenal a malondialdehyd.

### **Praktická část**

Zvládnout metodiku práce s vysokotlakou kapalinovou chromatografií (HPLC) s PDA a QDa detektorem. Stanovit produkci 4-hydroxynonenalu v lidských nádorových buňkách pomocí HPLC. Vyhodnotit naměřené výsledky a diskutovat v porovnání s literaturou.



# 1 ÚVOD

Lipidy jsou biologické makromolekuly s rozmanitými biologickými funkcemi (strukturní, zásobní, signální). Nejsnáze podléhají oxidaci lipidy, jež obsahují mastné kyseliny s několika dvojnými vazbami (polynenasycené mastné kyseliny). Pokud dojde k poškození těchto molekul v biologickém systému vlivem oxidačního stresu, může to vést až k buněčné smrti.

Lipidová peroxidace je řetězová reakce způsobující oxidativní poškození nenasycených mastných kyselin. Ta může být zapříčiněna neenzymaticky prostřednictvím působení reaktivních forem kyslíku nebo skrze specifické enzymy (lipoxygenasy, cyklooxygenasy, epoxygenasy). Lipidovou peroxidací vzniká široké spektrum produktů. Primárními produkty jsou relativně stabilní lipidové hydroperoxy, které ale mohou podléhat dalším reakcím za vzniku sekundárních produktů lipidové peroxidace. Sekundárně se tak tvoří hydroxy mastné kyseliny a aldehydy o různé délce uhlíkového řetězce. Nejvýznamnějšími sekundárně vznikajícími aldehydy jsou 4-hydroxynonenal, malondialdehyd, hexanal a další.

Za jeden z důležitých markerů lipidové peroxidace je považován 4-hydroxynonenal. Tento aldehyd vzniká jak neenzymatickou, tak enzymatickou cestou lipidové peroxidace především kyselin arachidonové a linoleové. 4-hydroxynonenal vykazuje cytotoxické účinky, může působit i mutageně a genotoxicky, reagovat s biomolekulami a kovalentně je modifikovat. Ve fyziologických koncentracích působí 4-hydroxynonenal jako signální molekula, ale jeho zvýšené hladiny v organismu vyvolávají i provází různé patologické stavy.

Teoretická část této diplomové práce je zaměřena na lipidovou peroxidaci a produkci 4-hydroxynonenalu, jeho vlastnosti a biologické působení. Také je 4-hydroxynonenal srovnáván s dalším významným markerem lipidové peroxidace, malondialdehydem. Praktická část této práce se zabývá detekcí sedmi karbonylů, jež vznikají lipidovou peroxidací na modelu kyseliny linoleové a rakovinných buněk, pomocí HPLC/MS analýzy a také stabilitou 4-hydroxynonenalu v prostředí hydroxylového radikálu.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Lipidová peroxidace

Lipidy jsou biologické makromolekuly s rozmanitými biologickými funkcemi. Ve formě fosfolipidů jsou základními stavebními kameny buněčných membrán a jejich stav výrazně ovlivňuje fyziologii buněk. Dle přítomnosti dvojných vazeb dělíme mastné kyseliny obsažené v lipidech na nasycené a nenasycené, přičemž polynenasycené mastné kyseliny (PUFA), obsahující dvě a více dvojných vazeb, jsou nejnáze oxidovatelné. Mezi PUFA se řadí například kyselina linolová, kyselina linoleová či kyselina arachidonová (Gardner, 1989).

Lipidová peroxidace je řetězovou reakcí, při níž dochází k oxidativnímu poškození nenasycených mastných kyselin (Porter *et al.*, 1995). Může probíhat neenzymatickou cestou prostřednictvím působení reaktivních forem kyslíku (ROS) nebo enzymatickou cestou (lipoxygenasy (EC 1.13.11.-), cyklooxygenasy (EC 1.14.99.1), epoxygenasy (EC 1.14.13.69)) v rostlinných i živočišných buňkách (Smith a Murphy, 2002; Yin *et al.*, 2011). Při fyziologické nebo nízké míře lipidové peroxidace (subtoxické podmínky) dochází v buňkách ke stimulaci antioxidantních obranných systémů a signálních drah aktivující expresi antioxidantních proteinů. Je-li míra lipidové peroxidace střední až vysoká (toxické podmínky), je ochranná kapacita buněk převyšena jejich oxidačním poškozením. V buňkách je vyvolána programovaná buněčná smrt nebo nekroza (Kinnunen *et al.*, 2012). Tyto procesy jsou způsobeny přímým oxidačním poškozením buněčných struktur a dlouhodobé působení oxidačního stresu, zahrnujícího i lipidovou peroxidaci, může indukovat vývoj patologických stavů a zrychlené stárnutí celého organismu (Fruhworth *et al.*, 2007).

#### 2.1.1 Neenzymatická lipidová peroxidace

Neenzymatická lipidová peroxidace je řetězovou oxidační reakcí nejčastěji zprostředkovanou volnými radikály, jíž podléhají PUFA. Jednotlivé reakce probíhají především volně v cytosolu, v blízkosti membrán, ale i v organelách např. v mitochondriích (Bindoli, 1988) a extracelulárním prostoru (Bodera *et al.*, 2015), na rozdíl od katalytického místa enzymu v případě enzymatické lipidové peroxidace. Tak jako i ostatní radikálové reakce, lipidová peroxidace zahrnuje tři hlavní fáze: iniciace, propagace a terminace.

Pro iniciaci je klíčovým krokem tvorba lipidového uhlíkového radikálu ( $L^\bullet$ ). V biologických systémech může být peroxidace indukována exogenními fyzikálně-chemickými vlivy (UV záření, ionizující záření, kouření, znečištění vzduchu), ale i endogenními enzymovými systémy uvolňujícími volné radikály. Příkladem těchto systémů je především elektronový transportní systém v mitochondriích, NADPH-oxidasa (EC 1.6.3.1), xanthinoxidasa (EC 1.17.3.2) a cytochrom P450 (EC 1.14.-.-) (Bochkov *et al.*, 2010). Peroxidace lipidů bývá iniciována použitím přechodných kovů ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^+$  - Fentonova reakce) za vývoje hydroxylového radikálu ( $HO^\bullet$ ),  $\gamma$ -záření nebo enzymů produkujících radikály. U mechanistických chemických analýz je důležité zajistit tvorbu radikálů s definovanou rychlostí jejich vzniku. Pro tento účel je na místě použití azoiniciátorů. Kinetika rozkladu azoiniciátorů odpovídá kinetice prvního řádu a jsou známy rychlostní konstanty rozkladu za mnoha různých podmínek. Pro studium různých systémů byly vyvinuty hydrofilní, amfifilní i hydrofobní azoiniciátory (Culbertson a Porter, 2000). Volný radikál atakuje cílové uhlíkové atomy v molekule PUFA, jenž tvoří tzv. methylenové můstky (jsou z obou stran obklopeny uhlíkovými atomy, které tvoří dvojnou vazbu). Přítomnost dvojně vazby u methylenového uhlíku oslabuje vazbu uhlík-vodík, a tím zvyšuje citlivost vodíku k odštěpení. Po odštěpení vodíkového radikálu zůstává na cílovém uhlíku nepárový elektron, který může být stabilizován přeskupením dvojných vazeb v molekule často za vzniku konjugovaných dienů (Halliwell a Gutteridge, 2007).

Reakcemi takto vzniklých radikálů s molekulárním kyslíkem vznikají lipidové peroxylové radikály ( $LOO^\bullet$ ) schopné dalšího odštěpování citlivých vodíků a tím je nastartována řetězová reakce. Lipidové peroxylové radikály jsou klíčové meziprodukty, které pohánějí propagaci radikálových reakcí. Jelikož propagace zahrnuje adici molekuly kyslíku, její rychlost je závislá na jeho parciálním tlaku, jenž se v různých tkáních, orgánech a za různých podmínek liší. Vzniklé  $LOO^\bullet$  mají schopnost odštěpovat vodíky z citlivých míst v molekulách PUFA a vedou k tvorbě většího množství lipidových hydroperoxidů ( $LOOH$ ). Lipidové hydroperoxydy jsou ve srovnání s ostatními produkty relativně stabilními primárními produkty lipidové peroxidace. Avšak  $LOOH$  se v přítomnosti redukovaných přechodných kovů ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^+$ ) rozkládají za tvorby lipidového alkoxylového radikálu ( $LO^\bullet$ ) a hydroxidového aniontu, zatímco v přítomnosti oxidovaných přechodných kovů ( $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) dochází k velmi pomalé produkci  $LOO^\bullet$ . Všechny vzniklé radikály se mohou účastnit další propagace řetězové reakce. Lipidové uhlíkové radikály vzniklé v průběhu výše popsaných reakcí podléhají

intramolekulárním radikálovým substitucím. V případě radikálové substituce v molekule LOOH dochází k tvorbě  $LO^{\bullet}$  a epoxidu, zatímco v molekule obsahující  $LOO^{\bullet}$  a dvojnou vazbu dochází k cyklizaci. Tyto meziprodukty podléhají dalším reakcím, v nichž vznikají stabilní alkoholy, aldehydy a alkany (Yin *et al.*, 2011).

Řetězová reakce volných radikálů probíhá tak dlouho, dokud se dva radikály nespojí (rekombinace) mezi sebou, čímž zanikne přítomnost volného elektronu. Terminace lipidové peroxidace může být vyvolána přítomností antioxidantů jako např. vitamin E (tokoferol), askorbát a  $\beta$ -karoten. Radikálové reakce jsou ukončeny v momentě, kdy jsou všechny radikály odstraněny (Halliwell a Gutteridge, 2007).

## 2.1.2 Enzymatická lipidová peroxidace

Enzymatická lipidová peroxidace zahrnuje tvorbu lipidových peroxidů probíhající v aktivním místě enzymu. Před samotnou peroxidací PUFA dochází působením lipas (EC 1.3.1.3) k hydrolýze jejich zásobních forem (triacylglyceroly, fosfolipidy) na alkohol a mastné kyseliny. V průběhu enzymatické lipidové peroxidace vznikají stereospecifické produkty s důležitými biologickými účinky. Ačkoliv jsou volné radikály důležitými meziprodukty enzymatických reakcí, jsou uzavřeny v katalytické kapse enzymů, ve formě radikálů se do prostředí neuvolňují. Nejdůležitější enzymy podílející se na enzymatické lipidové peroxidaci jsou cyklooxygenasy (COX) a lipoxygenasy (LOX) (Kuehl a Egan, 1980).

Cyklooxygenasa je hemoprotein aktivní ve formě homodimeru, jenž se nachází v membráně endoplasmatického retikula nebo jaderné membráně. Savci disponují dvěma izoenzymy: COX-1 a COX-2. Každý monomer COX disponuje dvěma aktivními místy, jedním peroxidasovým a jedním oxygenasovým. V oxygenasovém aktivním místě dochází k aktivaci substrátu, v peroxidasovém k peroxidaci umožněné přítomností hemu. COX katalyzuje dvě za sebou jdoucí reakce v přeměně kyseliny arachidonové na prostaglandin  $H_2$  (PGH<sub>2</sub>).

Lipoxygenasy jsou nehemové proteiny obsahující ionty železa. Jsou tvořeny jedním polypeptidovým řetězcem, jenž se skládá do dvou domén. Jedna doména LOX je tvořena převážně  $\alpha$ -helixy, která je katalytická, a druhou tvoří  $\beta$ -barel. Lidské buňky disponují šesti izoenzymy LOX, jejichž substrátem je kyselina arachidonová, a katalyzují oxygenační reakce na čtyřech různých pozicích v molekule kyseliny arachidonové. Na rozdíl od živočichů se u rostlin vyskytují enzymy LOX, jejichž substráty jsou především kyseliny linoleová a linolenová. Každá oxidační reakce

katalyzovaná LOX zahrnuje vazbu  $O_2$  na dvojici dvojných vazeb substrátu (Brash, 1999; Feussner a Wasternack, 2002).

I když COX a LOX katalyzují podobné dioxygenační reakce, nejsou si tyto enzymy podobné sekvencí, ani strukturou, ani jejich tkáňovou či buněčnou lokalizací. I přesto je mechanismus působení obou skupin enzymů stejný (odštěpení vodíku a dioxygenace). Primárními produkty COX jsou endoperoxidy nebo endoperoxid-hydroperoxydy, u LOX vznikají primárně jednoduché hydroperoxydy. Prvotní produkty reakcí COX a LOX potom vedou k lokální tvorbě hormonů nazývaných jako eikosanoidy (lipidy s 20 uhlíky). V případě LOX vznikají leukotrieny, zatímco v případě COX vznikají prostanoidy, prostaglandiny a tromboxany (Marnett *et al.*, 1999; Viita *et al.*, 2012). Eikosanoidy a další produkty se u živočichů účastní signalizace prostřednictvím receptorů spojených s G-proteiny, jsou zahrnuty v proliferaci a diferenciaci a i v patologických procesech (Schneider *et al.*, 2007).

Cytochromy P450 jsou hemové proteiny disponující několika různými enzymovými aktivitami. Z pohledu metabolismu PUFA je nejdůležitější monoxygenasová a epoxygenasová aktivita. Na rozdíl od COX a LOX, kde probíhá dioxygenace (inkorporace celé molekuly  $O_2$ ), se u P450 jedná o monoxygenace (inkorporace pouze jednoho atomu kyslíku). Odštěpením vodíku z PUFA může docházet k tvorbě alkylového radikálu a následné hydroxylaci za vzniku hydroxymastných kyselin. Dalším způsobem interakce s P450 je monoxygenace dvojných vazeb nebo epoxygenace (Capdevila *et al.*, 2000). Oxidační produkty vzniklé z kyseliny arachidonové, především epoxyeikosatrienové kyseliny, vedou k vasodilataci, mají protizánětlivé účinky a chrání srdeční sval před ischemicko-reperfúzním poškozením. Podobně jsou epoxyeikosatetraenové kyseliny účinnými inhibitory srdečních arytmií a epoxydokosapentaenové kyseliny dokonce inhibují angiogenezi a zmírňují tvorbu metastáz nádorů. Tyto produkty jsou tak jedny z mála pozitivních vlivů lipidové peroxidace na zdraví (Spector *et al.*, 2004; Deng *et al.*, 2010).

Vzhledem k přítomnosti hemu jako kofaktoru nebo iontů železa v aktivních místech zmíněných enzymů se projevuje důležitost železa pro reakce lipidové peroxidace. Redoxní cykly železa zásadně ovlivňují míru lipidové peroxidace, protože dokážou interagovat jak s meziprodukty vzniklými čistě chemicky, tak i enzymaticky. Řetězové radikálové reakce v enzymových systémech probíhají velice podobně jako v neenzymových, pouze u nich dochází k tvorbě stereospecifických produktů.

### 2.1.3 Produkty lipidové peroxidace

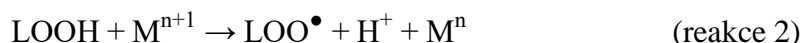
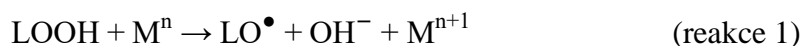
Při lipidové peroxidaci dochází ke vzniku širokého spektra produktů, primárními produkty jsou lipidové hydroperoxy. Lipidové hydroperoxy jsou relativně stabilní, avšak mohou podléhat dalším reakcím za vzniku sekundárních produktů lipidové peroxidace jako jsou hydroxy mastné kyseliny a aldehydy o různé délce uhlíkového řetězce. Nejvýznamnějšími sekundárně vznikajícími aldehydy jsou malondialdehyd, 4-hydroxynonenal, propanal, hexanal a další (Esterbauer a Cheeseman, 1990).

#### 2.1.3.1 Primární produkty lipidové peroxidace

Lipidové hydroperoxy vznikají v propagační fázi a jsou hlavními primárními produkty lipidové peroxidace. Hydroperoxidová skupina může být navázána na různé typy lipidových molekul (volné mastné kyseliny, triacylglyceroly, fosfolipidy, steroly). Problematiku lipidových hydroperoxidů, včetně jejich tvorby, přeměn a působení v biologických systémech, shrnul A. Girotti (1998). Jak už bylo uvedeno výše, LOOH jsou na rozdíl od volných radikálů za mírných podmínek (nízká teplota, absence iontů přechodných kovů) relativně stabilními produkty. Bylo zjištěno, že přítomnost LOOH v séru může být využita pro predikci oxidačního stresu ve tkáních včetně změn míry lipidové peroxidace fluktuující v průběhu dne. Jakmile dojde k tvorbě LOOH, mohou tyto podléhat různým redukčním reakcím vedoucím buď k inhibici nebo k indukci peroxidačního poškození (Argüelles *et al.*, 2004, 2007).

Lipidové hydroperoxy se mohou *in vivo* rozkládat na základě dvou-elektronové redukce, jež může inhibovat peroxidační poškození. Enzymy zodpovědné za tuto redukci LOOH jsou glutathionperoxidasy (GPX; EC 1.11.1.9) závislé na selenu a selenoprotein P. GPX katalyzují redukci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na vodu a organických hydroperoxidů na odpovídající alkoholy za využití glutathionu (GSH) jako redukčního činidla. Glutathionperoxidasy se vyskytují ve vysoké míře v savčích tkáních a v buňkách byly nalezeny v jádrech, cytosolu a mitochondriích. (Brigelius-Flohé a Maiorino, 2013) Přítomnost selenocysteinového residua jako katalytického řetězce zajišťuje rychlou reakci s hydroperoxidem a následnou účinnou zpětnou redukci pomocí GSH. Selenoprotein P je hlavním selenoproteinem v lidské plasmě, jež redukuje hydroperoxy za využití GSH nebo thioredoxinu jako kosubstrátu a chrání lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL) před peroxidací (Steinbrenner a Sies, 2009).

Druhou možností rozpadu LOOH *in vivo* je jedno-elektronová redukce, která na rozdíl od výše popsané inhibice podporuje iniciaci a propagaci lipidové peroxidace. Dochází tak k tvorbě nových LOOH, což prodlužuje trvání peroxidačního procesu a přispívá k většímu rozsahu oxidačních poškození. Lipidové hydroperoxy se při interakci s přechodným kovem (M) rozkládají na LOO• a/nebo na LO• na základě redoxního stavu M, jenž je ovlivněn tzv. redoxním cyklem (reakce 1 a 2).



LOOH reagují i s peroxodusitanem (silný induktor buněčné smrti) nebo kyselinou chlornou (vznikající v místech zánětu) za tvorby molekuly singletního kyslíku (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). Reakce <sup>1</sup>O<sub>2</sub> s mastnými kyselinami vede k tvorbě dalších LOOH, zatímco při reakci s aminokyselinami dochází v závislosti na přítomnosti a charakteru reaktivních skupin ke vzniku různých oxidačních produktů, obecně peroxidů a endoperoxidů (Stadtman a Berlett, 1997). V případě, že reaguje <sup>1</sup>O<sub>2</sub> s aminokyselinovými residui v rámci proteinu, dochází k fragmentaci, změně konformací, inaktivaci enzymů a narušení buněčného obratu proteinů (Davies, 2003; Miyamoto *et al.*, 2007).

### 2.1.3.2 Sekundární produkty lipidové peroxidace

Pokud probíhají další cykly lipidové peroxidace, dochází k dalším reakcím a fragmentaci vzniklých meziproduktů na hydroxy mastné kyseliny a aldehydy o různé délce uhlíkového řetězce. Radikálové meziprodukty lipidové peroxidace působí lokálně, ale vzniknuvší aldehydy mohou difundovat přes membrány, dokonce i přes karyotéku (Halliwell a Gutteridge, 2007). Tímto způsobem mohou aldehydy ovlivňovat i biomolekuly vzdálené od místa tvorby aldehydů, například kovalentně modifikovat proteiny či reagovat s nukleovými kyselinami. Sekundární produkty peroxidace lipidů mohou být součástí buněčné signalizace, ale taktéž mohou mít mutagenní či toxické účinky (Negre-Salvayre *et al.*, 2008).

Monohydroxy mastné kyseliny (OHFA) jsou důležitými sekundárními produkty lipidové peroxidace využitelné jako plasmatické markery její míry *in vivo* i *ex vivo*. Delší dobu byly OHFA opomíjeny, neboť nebylo možné je jednoduše spektrofotometricky detekovat. Až v roce 1995 bylo popsáno měření C18, C20 a C22 OHFA pomocí plynové chromatografie s plamenovou ionizací. Za použití této metody však musel být každý vzorek analyzován dvakrát, jednou s derivatizací za tvorby

methylesterů a jednou bez ní (Nikkari *et al.*, 1995). O rok později byla vyvinuta technika pro detekci a kvantifikaci pomocí GC/MS (Wilson *et al.*, 1997). Protože OHFA mohou hrát důležitou roli v tvorbě aterosklerotických plaků a až 30 % esterů cholesterolu s kyselinou linoleovou vzniká z její oxidované formy, kyseliny hydroxylinoleové, byla na místě analýza možného využití OHFA jako markeru lipidové peroxidace v klinické praxi (Suarna *et al.*, 1997). V této studii byly využity extrakty plasmy podrobené účinku volných radikálů odpovídající nízkým či mírným oxidačním podmínkám a vysokým oxidačním podmínkám. Byly detekovány a kvantifikovány C18 OHFA s pozicí hydroxylové skupiny na uhlících C8 až C16. Zatímco při mírných oxidačních podmínkách se koncentrace všech zvýšila podobně, za silných oxidačních podmínek byla pozorována koncentrační závislost pouze u 9- a 13- OHFA. Na základě této studie a díky jejich korelaci s mírou oxidačního stresu jsou tyto dvě OHFA doporučeny jako markery v klinické praxi (Kaikkonen *et al.*, 2004).

Mezi sekundárními produkty lipidové peroxidace bylo nalezeno mnoho různých aldehydů, především malondialdehyd (MDA), 4-hydroxynon-2-enal (4-HNE), formaldehyd, acetaldehyd, propionaldehyd, hexanal a 4-hydroxyhex-2-enal, jež byly intenzivně studovány Esterbauerem a jeho kolektivem v 80. letech (Esterbauer *et al.*, 1982; 1984; 1989). MDA byl široce využíván po dlouhou dobu jako spolehlivý marker lipidové peroxidace  $\omega$ -3 a  $\omega$ -6 mastných kyselin a to na základě reakce s thiobarbiturovou kyselinou (TBA). Tato reakce však byla výrazně nespecifická, což vedlo k následné kontroverzi jejího využití pro kvantifikaci MDA ze vzorku *in vivo* (Pryor, 1989). Následně byly vyvinuty nové metody pro stanovení volného i vázaného MDA pomocí GC-MS/MS, LC-MS/MS a několik derivatizačních technik (Giera *et al.*, 2012). Jelikož je MDA jedním z nejvíce populárních a spolehlivých markerů oxidačního stresu, je stále klinicky relevantní. Jedná se o bifunkční aldehyd, jehož aktivita vzrůstá při klesajícím pH, kdy dochází k přesmyku na  $\beta$ -hydroxyakrolein. Jelikož je MDA elektrofil, reaguje silně s nukleofilními centry aminokyselin, tvoří adukty s proteiny, může vyvolávat síťování DNA a má také několik důležitých signálních úloh v buňkách (Ayala *et al.*, 2014).

## 2.2 4-hydroxynonenal

4-hydroxynonenal je  $\beta$ -nenasyceným elektrofilním aldehydem a hlavním představitelem 4-hydroxyalkenalů, které vznikají jako koncové produkty oxidačního rozkladu PUFA prostřednictvím enzymové i neenzymové oxidace. Tato sloučenina je díky přítomnosti



reaktivních center schopna podléhat reakcím s mnoha různými molekulami, jež jsou popsány v kapitole 2.2.2. Rozsáhlá reaktivita 4-HNE umožňuje tvorbu proteinových či DNA aduktů, což jsou dysfunkční formy těchto biomolekul, čímž dochází k ovlivnění důležitých buněčných pochodů. Ze všech známých produktů lipidové peroxidace je nejvíce studovaným právě 4-HNE, vzhledem k jeho reaktivitě a roli v patologických stavech (Spickett, 2013).

### 2.2.1 Vznik 4-hydroxynonenalu

Mechanismus tvorby 4-hydroxynon-2-enalu byl po dlouhou dobu předmětem zkoumání, protože 4-HNE je hlavním cytotoxickým produktem lipidové peroxidace. Bylo zjištěno, že substráty pro tvorbu 4-HNE jsou kyseliny linoleová a arachidonová. Devět uhlíkových atomů tvořících molekulu 4-HNE odpovídá devíti uhlíkovým atomům z  $\omega$ -konce těchto nenasycených mastných kyselin (Uchida, 2003). V roce 1990 Pryor a Porter navrhli první možný mechanismus tvorby 4-HNE a o tři roky později Gardner a Hamberg (1993) získali první experimentální důkazy o tvorbě 4-HNE z hydroperoxidů zmíněných mastných kyselin. Následná studie Schneidera a kolektivu (2001) využila 9- a 13- hydroperoxy kyseliny linoleové jako výchozí reaktanty. Tito zjistili, že existují dva různé mechanismy vedoucí k 4-hydroperoxy-2E-nonenalu (4-HPNE). Prvním mechanismem je radikálové odštěpení vodíku na atomu C8 v molekule kyseliny 13-hydroperoxyoktadekadienové (13-HPODE), které vede k tvorbě 10,13-dihydroperoxidu, jenž podléhá štěpení. Druhým způsobem je přímé štěpení kyseliny 9-hydroperoxyoktadekadienové (9-HPODE) za tvorby 3Z-nonenalu, který je prekurzorem 4-HNE a kyseliny 9-oxononanové.

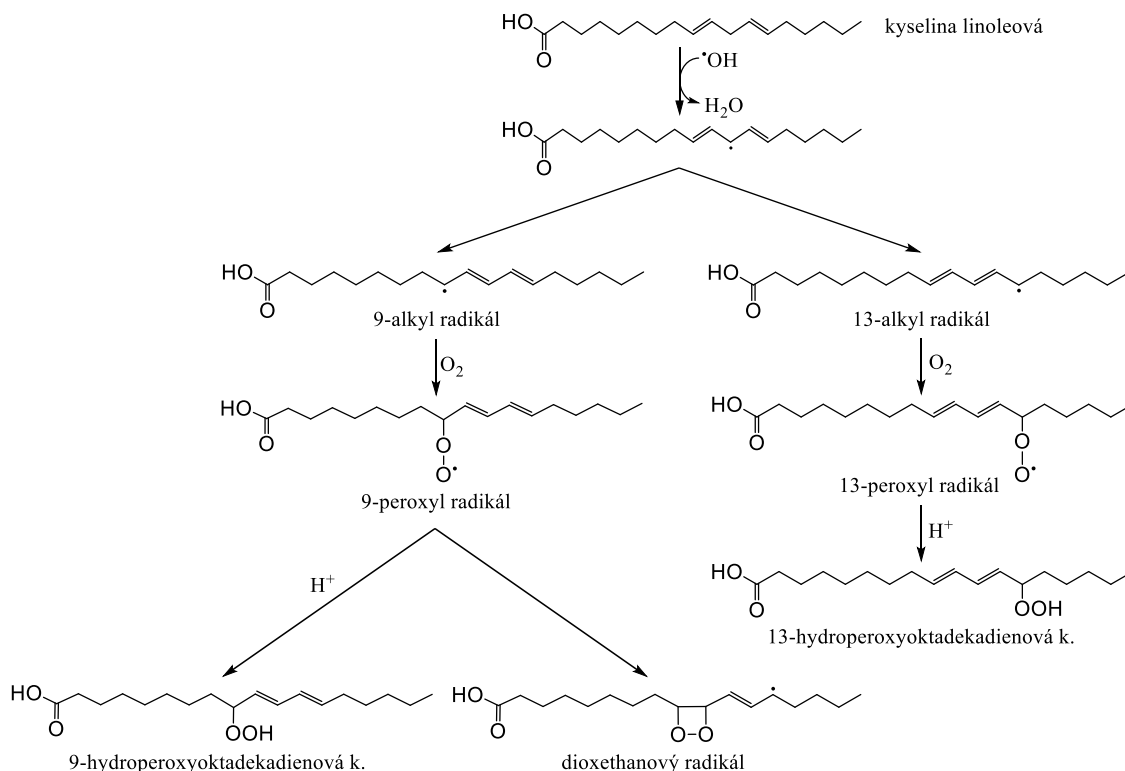
Je známo 5 hlavních mechanismů, jimiž může 4-HNE obecně vznikat:

- Redukce hydroperoxidu na alkoxylový radikál prostřednictvím  $\text{Fe}^{2+}$  následovaný beta-stříhem.
- Protonace lipidového hydroperoxidu, po které dochází k Hockovu přeskupení a následné hydrolyze a Hockovu štěpení.
- Cyklizace peroxylového radikálu a tvorba dioxetanu a jeho štěpení.
- Atak volného radikálu v bis-allylové poloze  $\omega$ -6 PUFA vedoucí ke vzniku radikálového intermediátu, jež dále reaguje s molekulou kyslíku a tvoří hydroperoxy jako např. HPODE. Odštěpení dalšího allylového vodíku v jejich struktuře produkuje opět radikálový intermediát, který je po oxygenaci přeměněn

na nestabilní dihydroperoxidový radikál podléhající Hockovu přeskupení a štěpení.

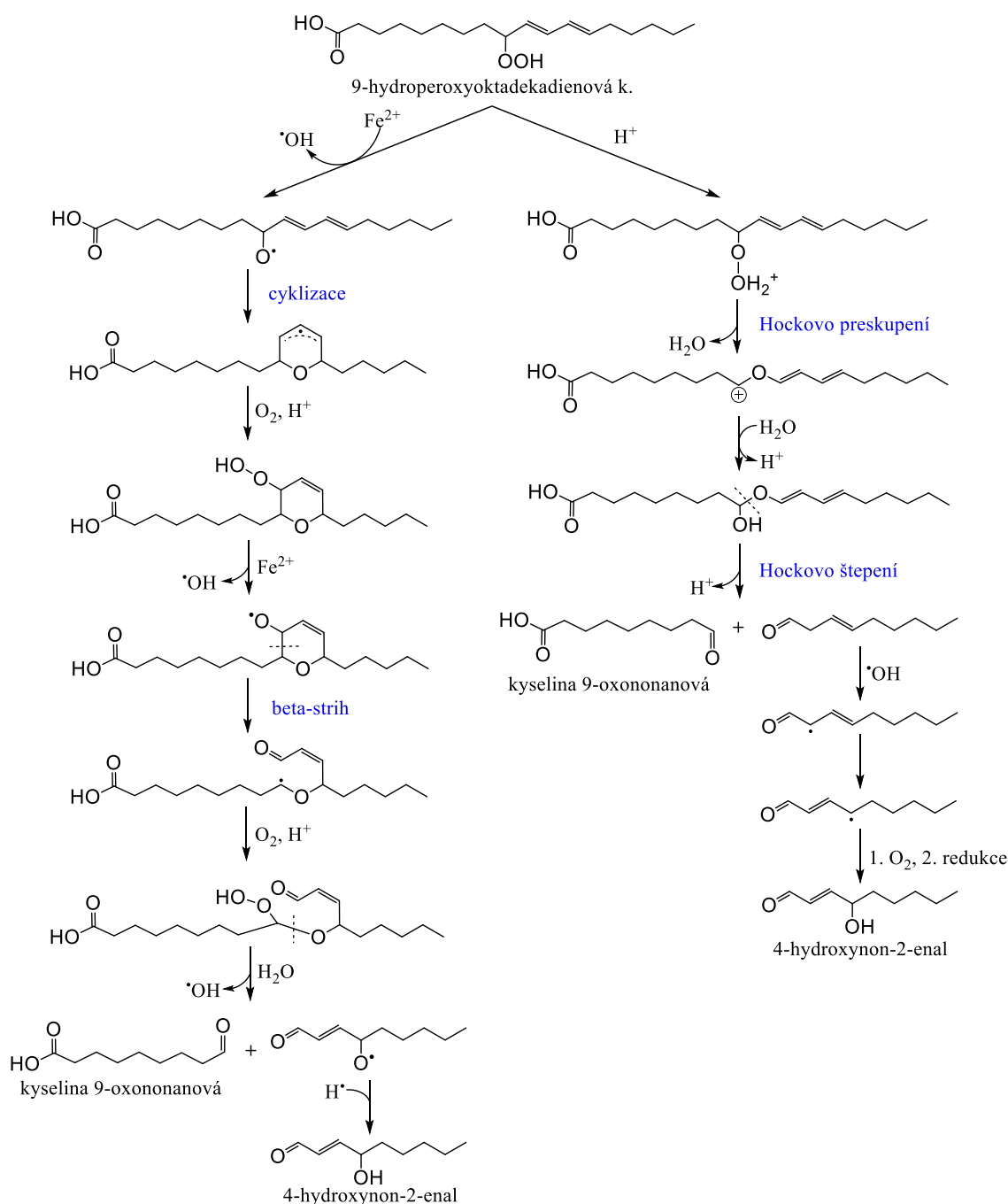
- Oxidační produkty vytvořené reakcí hydroperoxidového epoxidu s  $\text{Fe}^{2+}$  a následným přeskupením a beta-stříhem zahrnují mnoho různých aldehydů, včetně 4-HNE (Ayala *et al.*, 2014).

Některé mechanismy tvorby 4-HNE jsou demonstrovány na příkladu kyseliny linoleové (Obr. 1, Obr. 2, Obr. 3, Obr. 4). Reakce je iniciována radikálovým odštěpením vodíku v bis-allylové poloze na uhlíku C11. Odštěpení vede k tvorbě lipidového uhlíkového radikálu, jehož následným přeskupením vznikají dva hlavní meziprodukty: 9- a 13-alkylové radikály kyseliny oktadekadienové (Obr. 1). Radikálové meziprodukty jsou oxidovány za vzniku lipidových peroxylových radikálů, které mohou přijmout proton nebo podléhat přesmyku za vzniku dioxethanového radikálu. Vytržením protonu z jiné biomolekuly a jeho přijetím lipidovými peroxylovými radikály jsou tvořeny 9-HPODE a 13-HPODE. Dioxethanový radikál je pro tvorbu 4-HNE relevantní pouze z 9-peroxylového radikálu (Spickett, 2013). Vzniknuší hydroperoxyoktadekadienáty podléhají několika různým reakcím.

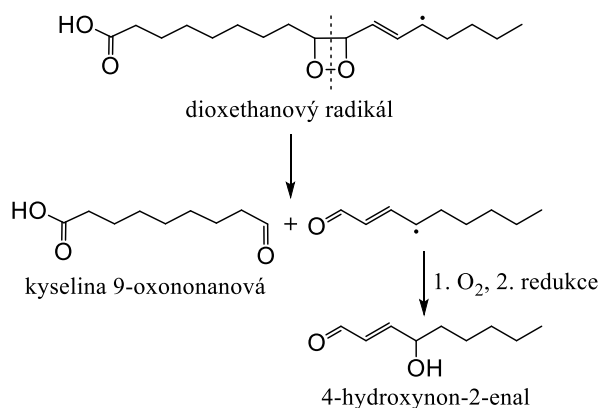


Obr. 1 Schéma prvotních fází peroxidace kyseliny linoleové.

9-HPODE je v prostředí iontů přechodného kovu ( $\text{Fe}^{2+}$ ) přeměněn na 9-alkoxyradikál, který podléhá cyklizaci. Po reakci s molekulou kyslíku a protonaci vzniká cyklický hydroxyalkoxyl, jež podléhá beta-stříhu za tvorby 4-HNE a 9-oxononanové kyseliny. Další možnou cestou vedoucí od 9-HPODE je protonace hydroperoxylové skupiny, jež umožňuje Hockovo přeskupení. To zahrnuje tvorbu epoxidového intermediátu podléhajícího následnému Hockovu štěpení. Produkty Hockova štěpení jsou opět 9-oxononanová kyselina a 4-HNE (Obr. 2) (Pryor a Porter, 1990; Loidl-Stahlhofen *et al.*, 1994).



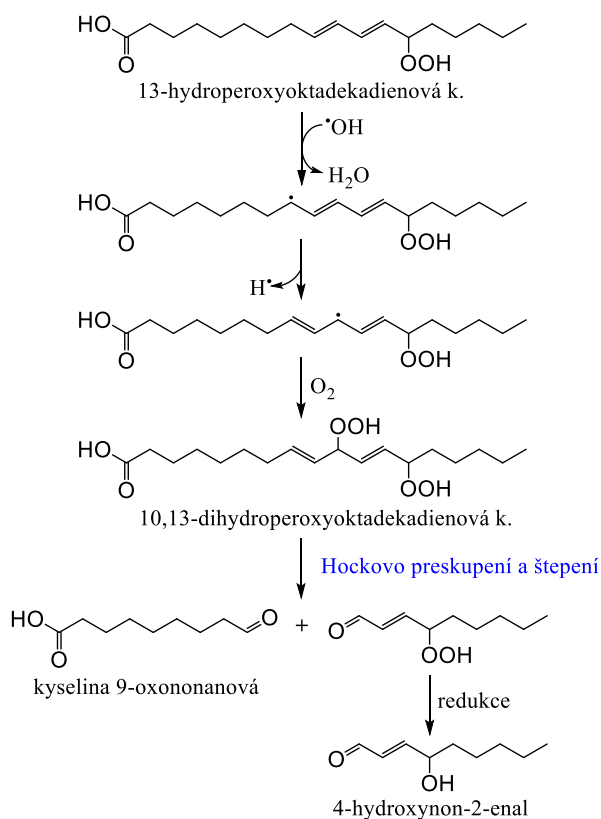
Obr. 2 Schéma možných cest tvorby 4-HNE z 9-HPODE.



Obr. 3 Schéma tvorby 4-HNE z dioxethanového radikálu.

Poslední možným osudem 9-peroxylového radikálu je jeho cyklizace za vzniku dioxethanového radikálu, jenž je fragmentován na 9-oxononanovou kyselinu a 4-hydroperoxyononanal, což je přímý prekurzor 4-HNE (Obr. 3) (Pryor a Porter, 1990).

Cesta vedoucí od 13-HPODE majoritně vede k dalšímu radikálovému odštěpení vodíku, tvorba dihydroperoxylového meziprojektu a jeho štěpení Hockovým mechanismem (Obr. 4). Minoritní je cesta vedoucí přes dioxetan nebo alkoxylový radikál (Esterbauer *et al.*, 1986, Pryor a Porter, 1990).

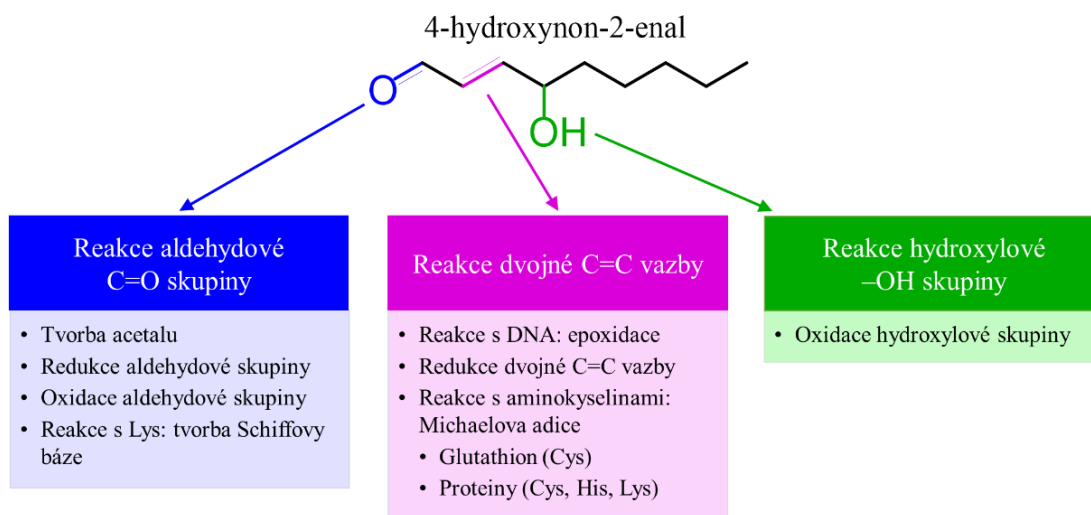


Obr. 4 Schéma majoritní tvorby 4-HNE z 13-HPODE.

4-HNE je také konečným produktem enzymatické transformace  $\omega$ -6 PUFA (Ayala *et al.*, 2014). V savčích buňkách je tento proces katalyzován 15-lipoxygenasami (15-LOX). Existují dvě třídy těchto enzymů – jedna třída je exprimovaná v retikulocytech, eosinofilech a makrofázích, zatímco druhá enzymová třída je zastoupena v buňkách kůže, rohovky, prostaty, plic a jícnu (Ivanov *et al.*, 2010; Klil-Drori a Ariel, 2013). Hlavními prekurzory enzymatické tvorby 4-HNE jsou u lidských buněk 13-HPODE a kyselina 15-hydroxyeicosatetraenová (15-HPETE) (Schneider *et al.*, 2001). Rostlinná dráha enzymatické tvorby 4-HNE zahrnuje LOX vytvářející primární prekurzory, jež jsou dále přeměňovány hydroperoxidlyasami (EC 4.2.99.-), alkenaloxigenasami (EC 1.13.-.-) a nakonec peroxygenasou (EC 1.11.2.1) katalyzující poslední krok (Takamura a Gardner, 1996).

### **2.2.2 Reaktivita 4-hydroxynonenalu**

I přes svou relativní stabilitu ve srovnání s volnými radikály je 4-HNE velmi reaktivní sloučeninou. Ve své molekule obsahuje tři reaktivní skupiny: C2=C3 dvojnou vazbu, C1=O aldehydovou skupinu a C4-OH hydroxylovou skupinu. Přítomné elektrofilní uhlíky v molekule jej dělají velmi reaktivním pro nukleofilní atak thioly a aminoskupinami. Reaktivita je umožněna jak prostřednictvím Michaelovy adice (majoritně) na uhlík C3, tak tvorbou Schiffovy báze mezi uhlíkem C1 a primárními aminy. Díky těmto predispozicím může 4-HNE reagovat s širokým spektrem molekul, jako jsou proteiny (obsahující His, Cys a Lys), fosfolipidy obsahující aminoskupinu a s nukleovými kyselinami (především s guanosem po epoxidaci). Interakce s biomakromolekulami vedou k jejich síťování, změně a ztrátě biologické aktivity. Oxidačně redukční pochody na aldehydové skupině jsou součástí buněčného metabolismu a antioxidační ochrany. Jednotlivé možné reakce 4-HNE popisuje Obr. 5 (Schaur, 2003; Dalleau *et al.*, 2013).

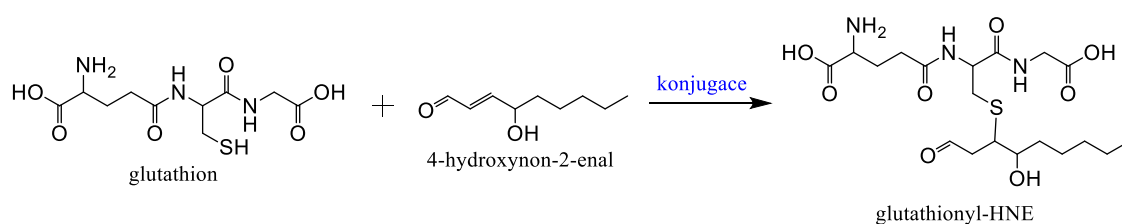


Obr. 5 Přehled reakcí, jimž mohou podléhat jednotlivé reaktivní skupiny molekuly 4-HNE (Dalleau *et al.*, 2013).

### 2.2.2.1 Buněčný metabolismus 4-hydroxynonenalu

Savčí buňky si vyvinuly mnohé enzymové cesty pro detoxifikaci 4-HNE. Hlavním cílem rychlé intracelulární metabolizace je ochránit klíčové molekuly před modifikací aldehydovými zbytky vzniklými při lipidové peroxidaci (Siems a Grune, 2003). Biochemické dráhy metabolismu 4-HNE vedoucí k tvorbě příslušného alkoholu (1,4-dihydroxy-2-nonen, DHN) nebo kyseliny (4-hydroxy-2-nonenové, HNA) se liší v závislosti na úrovni oxidačního stresu (Ayala *et al.*, 2014).

Při fyziologických či nízkých hladinách oxidačního stresu je hlavní detoxifikační reakcí konjugace 4-HNE s GSH katalyzovaná glutathion S-transferasami (GST; EC 2.5.1.18) za tvorby glutathionyl-HNE (GS-HNE), kterou znázorňuje Obr. 6. Konjugace probíhá prostřednictvím Michaelovy adice na uhlíku C3, čímž zabraňuje jiným nukleofilním adicím s biomolekulami. Konjugovaný 4-HNE může následně podléhat dvěma různým reakcím. Buď probíhá redukce katalyzovaná NADH-dependentní alkoholdehydrogenasou (EC 1.1.1.71) za tvorby glutathionyl-DHN a/nebo proběhne oxidace katalyzovaná aldehyddehydrogenasou (ALDH; EC 1.2.1.3) za vzniku glutathionyl-HNA (Balogh a Atkins, 2011).



Obr. 6 Schéma konjugace GSH a 4-HNE za vzniku GS-HNE.

Při středních hladinách oxidačního stresu podléhá 4-HNE přímé oxidaci aldehyddehydrogenasou na HNA. HNA může být v mitochondriích dále metabolizována prostřednictvím  $\beta$ -oxidace (Siems a Grune, 2003).

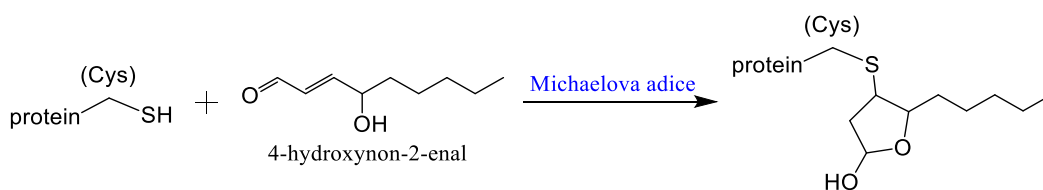
U vysokých hladin oxidačního stresu je volný 4-HNE i GS-HNE metabolizován pomocí aldoketoreduktasy (AKR; EC 1.1.1.21) za tvorby DHN. Zmíněná AKR disponuje vysokou enzymatickou aktivitou pro redukci dalších  $\alpha,\beta$ -nenasycených aldehydů jako jsou akrolein, *trans*-2-hexenal, *trans*-2-nonenal. Její aktivita je několiknásobně vyšší vůči GSH-konjugátům ve srovnání s volnými alkanaly (Siems a Grune, 2003; Alary *et al.*, 2003). Burczynski *et al.* (2001) demonstrovali, že 4-HNE i další zmíněné  $\alpha,\beta$ -nenasycené aldehydy vedou k indukci exprese isoformy C1 aldoketoreduktasy schopné tyto reaktivní aldehydy rychle odstraňovat.

Z biologických experimentů vyplynulo, že narušení genu *Gsta4* kódujícího isoenzym GST u myši vede k neschopnosti odbourání 4-HNE a jeho akumulaci. Tímto byla potvrzena zásadní role GST v detoxifikaci 4-HNE (McElhanon *et al.*, 2013). Naopak nadměrná exprese aldehyddehydrogenas snižuje tvorbu 4-HNE proteinových aduktů a toxicitu 4-HNE v buněčných kulturách (Black *et al.*, 2012; Kong a Kotraiah, 2012).

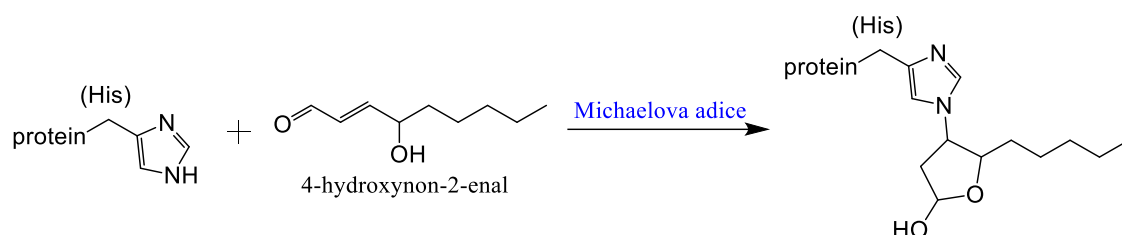
### 2.2.2.2 Adukty 4-hydroxynonenalu s biomolekulami

Jak již bylo zmíněno výše, zásadními produkty reakcí 4-HNE jsou adukty s proteiny a DNA. V rámci proteinových aduktů roste preference pro reakci s aminoskupinou ve směru Lys < His << Cys (Sayre *et al.*, 2006).

Cysteinové adukty jsou mnohem častější u 4-hydroxy-2-alkenalů (což je i 4-HNE), než u  $\alpha,\beta$ -nenasycených aldehydů postrádajících C4 hydroxylovou skupinu. Tato skutečnost je způsobena tím, že elektron-akceptorová 4-hydroxyskupina přispívá k vyšší elektropozitivě na uhlíku C3 a snadnějšímu nukleofilnímu ataku. Reakce 4-HNE s thioley (Cys) vede k tvorbě nasyceného aldehydu s thioetherovou vazbou sulfhydrilové skupiny z uhlíku C3. Aldehydový řetězec vzniklého produktu může ale dále reagovat se 4-hydroxylovou skupinou za tvorby cyklického hemiacetalového derivátu (Obr. 7) (Esterbauer *et al.*, 1975).



Obr. 7 Schéma tvorby cysteinového aduktu 4-HNE.



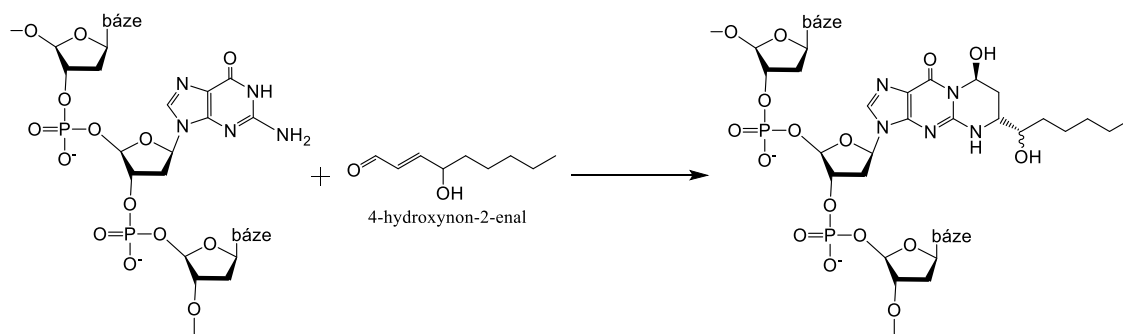
Obr. 8 Schéma tvorby histidinového aduktu 4-HNE.

Struktura aduktů 4-HNE s His byla poprvé objasněna Uchidou a Stadtmanem (1992). Michaelův adukt HNE-His je možné izolovat a stabilizovat. Později bylo na základě NMR analýzy aduktů zjištěno, že reakce probíhá výhradně v jedné pozici na dusíku N<sup>ε</sup>-imidazolového kruhu (Obr. 8) (Hashimoto *et al.*, 2003).

Reakcí 4-HNE s lysinovou ε-amino skupinou vzniká mnoho produktů zahrnujících především Michaelův adukt, pyrrolový adukt a fluoreskující zesíťovaný adukt (Obr. 9) (Esterbauer *et al.*, 1991). Několik let po jejich identifikaci byly zjištěny další podrobnosti vzniku těchto lysinových aduktů. Michaelův adukt vzniká především při velkém nadbytku Lys oproti 4-HNE (Obr. 9 A), zatímco při ekvimolárních množstvích dochází k tvorbě aduktů obsahujících 2 a více molekul 4-HNE. Pyrrolové adukty byly jedněmi z prvních aduktů založených na Schiffově bázi (Obr. 9 B), vykazujících vysokou stabilitu a jsou pravděpodobně i nejstabilnějšími konečnými produkty 4-HNE modifikace proteinů (Nadkarni a Sayre, 1995). Fluoreskující adukty byly objeveny při kovalentní modifikaci LDL působením 4-HNE (Esterbauer *et al.*, 1986) a následně byl identifikován 3-hydroxy-3-imino-1,2-dihydropyrrolový derivát (Obr. 9 C) zodpovědný za fluorescenční vlastnosti (Tsai *et al.*, 1998).



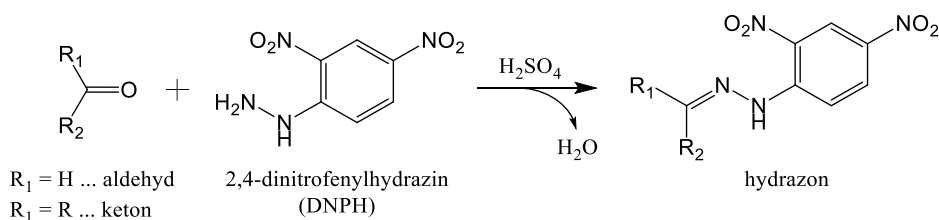




Obr. 10 Schéma vzniku 4-HNE-guanosinového aduktu.

### 2.2.3 Metody detekce a kvantifikace 4-hydroxynonenalu

Pro pochopení tvorby a biologických účinků 4-HNE je důležitým aspektem jeho detekce a kvantifikace v chemických systémech i tkáních (plasmě). Existuje několik různých metod pro analýzu 4-HNE, ale z pohledu jeho reaktivity je hlavní otázkou, zda detekovat volný aldehyd, či jeho adukty (Esterbauer *et al.*, 1991). Volné 4-HNE absorbuje v UV oblasti ( $\lambda_{\max} = 220\text{-}223$  nm) a v chemických systémech prostých proteinů je možné jej detekovat přímo po separaci od ostatních aldehydů pomocí HPLC. Naopak u biologických vzorků je dosaženo větší specifity a sensitivity pomocí derivatizačních činidel reagujících s aldehydy, z nichž nejznámější jsou 2,4-dinitrofenylhydrazin (DNPH) (Obr. 11) či 1,3-cyklohexandion. I přes derivatizaci je nutné provést HPLC separaci a použít standardy pro správnou identifikaci 4-HNE v komplexní směsi alkanalů a alkenalů, protože derivatizační činidla reagují obecně s aldehydovou skupinou (Yan a Forster, 2011).



Obr. 11 Derivatizační reakce 2,4-dinitrofenylhydrazinu s aldehydem/ketonem, při níž vzniká hydrazonový adukt.

Další možností je využití hmotnostní spektrometrie, jejíž výhodou je identifikace na základě  $m/z$  a fragmentačních vzorů. GC-MS vyžaduje derivatizaci vzorků do těkavého stavu, v případě 4-HNE je to např. reakce s pentafluorobenzyloximem následovaná silylací. Derivatizovaný 4-HNE je poté ionizován v negativním módu a kvantifikován na základě porovnání s deuterovaným 4-HNE jako vnitřním standardem (van Kuijk *et al.*, 1995; Selley, 1997). Výhoda přístupu LC-MS je v tom, že není potřeba derivatizací dosáhnout těkavosti, proto je nakládání se vzorkem jednodušší (Gioacchini *et al.*, 1999). Separace kapalinovou chromatografií je provedena na reverzní fázi za použití kolony s C18 sorbentem a ionizací elektrosprejem v negativním módu (Zanardi *et al.*, 2002). Z pohledu kvantifikace volného 4-HNE nemá GC-MS ani LC-MS velkou vypovídací hodnotu vzhledem k jeho reaktivitě a velkému podílu aduktů s biomolekulami. Je vhodné proto analyzovat vedle volného 4-HNE i jeho adukty, nebo 4-HNE z aduktů uvolnit provedením hydrolyzy, deproteinace a neprodleně vzorek analyzovat (Aldini *et al.*, 2006).

Detekci proteinových aduktů 4-HNE se věnovalo mnoho studií, přičemž existují dva hlavní přístupy a to: imunochemická technika nebo analýza hmotnostní spektrometrií. Před analýzou aduktů je nutno vzít v potaz, že jejich tvorba je reversibilní a jejich stabilita se různí (Michaelovy adukty tvoří až 99% všech detekovaných a His- Michaelovy adukty jsou nejstabilnější) (Zhu *et al.*, 2009). Z tohoto důvodu většina analýz aduktů zahrnuje redukci borohydridem, jež stabilizuje Schiffovy báze a většinu Michaelových aduktů (Rauniyar a Prokai, 2009).

Vývoj protilátek specifických proti 4-HNE vázanému na proteiny a další biomolekuly byl bezpochyby užitečný pro stanovení typů patologických stavů, kde je 4-HNE produkováno a objasnění jeho rozmístění v tkáních (Steinbrecher *et al.*, 1984). Antiséra proti různým formám modifikovaných LDL byla známa již dříve, avšak první doklad o vývoji protilátky anti-4-HNE a anti-MDA proteinům byl publikován Palinskim a kolektivem (1990). Následně byly vyvinuty polyklonální i monoklonální protilátky rozpoznávající 4-HNE lysinové adukty na LDL a 4-HNE-albumin. Avšak tyto protilátky vykazovaly křížovou reaktivitu s jinými 4-HNE modifikovanými proteiny a MDA proteinovými adukty (Chen *et al.*, 1992). V roce 1993 vyvinul kolektiv Uchidy pět monoklonálních protilátek s vysokou specificitou vůči 4-HNE histidinovým aduktům a paralelně s tím byly vyvinuty specifické monoklonální protilátky imunizací králíků (Uchida *et al.*, 1993; Hartley *et al.*, 1997). Od začátku vývoje protilátek bylo záměrem jejich využití pro ELISA, pomocí které byly detekovány 4-HNE-His adukty,

následně byl vytvořen kit pro detekci těchto aduktů v lyzátech buněk (Uchida *et al.*, 1995; Satoh *et al.*, 1999). Mnoho vytvořených protilátek bylo použito k imunohistochemické detekci 4-HNE v tkáních postižených zánětem (Itakura *et al.*, 2000), ischemických srdečních svalech (Eaton *et al.*, 1999), extraktech mozků s prokázanou Alzheimerovou chorobou (Reed *et al.*, 2008; 2009) a dalších. V poslední době je možné detekovat 4-HNE adukty, jako biomarkery, pomocí ELISA i v séru pacientů (Mehta a Patel, 2019).

Zatímco použití protilátek a ELISA umožňuje detekci a kvantifikaci 4-HNE aduktů, nedává dostatek informací o typu proteinu či aduktu. Z tohoto pohledu je zajímavější, ale avšak také náročnější, použití hmotnostní spektrometrie. Zatímco detekce aduktů obvykle využívá fragmentaci a analýzu otisku prstu (adukty jsou detekovány na základě navýšení hodnoty  $m/z$  u peptidu v porovnání s nativním stavem), sekvencování proteinu pomocí tandemové MS/MS umožňuje přesnou identifikaci místa a charakteru modifikace. Vzorky jsou obvykle připraveny podle klasického postupu (redukce, methylace, štěpení trypsinem, separace pomocí nanoLC a následné spojení s MALDI-TOF-MS/MS). Hmoty odpovídající modifikaci 4-HNE lze vyhledat v klasických proteomických databázích (Doorn a Petersen, 2002; Carini *et al.*, 2004). Díky těmto přístupům byly *in vitro* popsány adukty myoglobinu se 4-HNE a 4-oxo-2-nonenalem (Liu *et al.*, 2003), všechny typy 4-HNE aduktů na cytochromu c (Isom *et al.*, 2004) a taktéž modifikace kreatinkinasy, jež byly spojeny se sníženou enzymovou aktivitou (Eliuk *et al.*, 2007). Několik studií také detekovalo adukty 4-HNE *in vivo* například modifikace erytrocytové katalasy u pacientů s chorobou lupus erythematosus (D'Souza *et al.*, 2008) nebo cysteinové adukty Hsp90 na modelu chronické alkoholové jaterní nemoci u myši (Carbone *et al.*, 2005). Cílené postupy pro detekci 4-HNE aduktů byly taktéž vyvinuty a validovány na komplexní směsi plasmatických proteinů (Rauniyar a Prokai, 2011) a dále se uvažuje o jejich využití v klinické praxi jako biomarkeru oxidativního poškození a některých autoimunitních onemocnění (Méndez *et al.*, 2012).

#### **2.2.4 Vliv 4-hydroxynonenalu na buňky**

Je všeobecně známo, že tvorba 4-HNE souvisí s tvorbou superoxidového aniontového radikálu v mitochondriích, který vede k lipidové peroxidaci  $\omega$ -6-PUFA v buněčných membránách. Nedávné práce však ukázaly, že oxidace mitochondriálního fosfolipidu kardiolipinu vede taktéž k tvorbě významných množství 4-HNE a dalších produktů

oxidace (Yin a Zhu, 2012). Vznik 4-HNE z kardiolipinu hraje důležitou roli ve vnitřní cestě iniciace apoptosy u arterosklerózy a onkologických malignit. Navíc asi 30 % aduktů 4-HNE s proteiny je lokalizováno v mitochondriích, z nichž většina z nich jsou komponenty dýchacího řetězce (Zhao *et al.*, 2014). Všechny tyto cesty jsou evolučně umístěny v mitochondriích, aby odbourávaly ROS a snižovaly oxidační stres (Siems a Grune, 2003).

Když dochází k interakci 4-HNE s buněčnými organelami, může být ovlivněno chování biomakromolekul, s nimiž tvoří adukty biofyzikální i biochemickou cestou. Biofyzikální cestou se může působení 4-HNE projevit především u membránových proteinů, jejich konformačními změnami a také zvýšením fluidity fosfolipidové dvojvrstvy. Při rozsáhlé modifikaci membránových proteinů typu transportérů a pump může dojít až k protržení membrán (Subramaniam *et al.*, 1997; Fleuranceau-Morel *et al.*, 1999). Biochemické působení zahrnuje tvorbu všech známých aduktů s DNA a proteiny, jejímž důsledkem jsou změny v buněčné signalizaci, genové expresi, metabolismu a celkovém chování buňky.

V závislosti na typu buňky, stavu buněčného metabolismu a hladině přítomného 4-HNE může tento aldehyd podporovat přežití buněk nebo naopak vyvolat jejich smrt. Při nízkých koncentracích (fyziologicky  $> 1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) 4-HNE dochází k jeho enzymatickému odbourání (viz kapitola 2.2.2.1), a buňky přežívají. Za fyziologických podmínek je poločas odbourávání 4-HNE okolo 2 min (Dalleau *et al.*, 2013). Zároveň při těchto hladinách funguje jako signální molekula a jeho působení vede ke zvýšení genové exprese jaderného faktoru odvozeného od erytrocytů (NRF2). NRF2 patří do rodiny transkripčních faktorů, jež aktivují cytoprotektivní pochody prostřednictvím exprese antioxidantních proteinů. Mezi tyto antioxidantní proteiny patří GST, ALDH, AKR, thioredoxinreduktasy (EC 1.8.1.9) a další (Eckl, 2003). Současně bylo zjištěno, že 4-HNE může měnit signalizaci  $\text{Ca}^{2+}$  iontů na základě jejich akumulace v cytoplasmě prostřednictvím inhibice  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  ATPasy. V netoxických koncentracích 4-HNE aktivuje stresovou odpověď prostřednictvím nárůstu fosforylace tyrosinů, což vede k aktivaci p38 a c-Jun N-koncových kinas (EC 2.7.11.24). Tyto proteiny jsou členy dráhy mitogenem aktivovaných protein kinas (MAPK) a ovlivňují transkripci stresových a detoxifikačních genů. Současně bylo dokázáno, že 4-HNE může stimulovat aktivitu receptorů růstových faktorů, proteinkinasy C (EC 2.7.11.13), adenylátcyklasy (EC 4.6.1.1), fosfolipasy C (EC 3.1.4.3) a D (EC 3.1.4.4) (Rossi *et al.*, 1993; Parola *et al.*, 1998). Aktivace stresových signálních drah je důležitým

mechanismem pro kontrolu detoxifikace a zahrnuje aktivaci transkripce genů pro složky antioxidačního buněčného systému.

Při vyšších koncentracích 4-HNE dochází k poškození proteinů a organel a může dojít k zastavení buněčného cyklu a senescenci (buňka přežívá v klidovém stádiu) nebo dochází k indukci programované buněčné smrti autofagie či apoptosy. 4-HNE spouští apoptosu prostřednictvím vnitřní i vnější cesty iniciace a inhibicí ochranných mechanismů jako je proteasomální degradace proteinů nebo přirozené imunitní odpovědi (Suzuki *et al.*, 2001). Apoptosa vyvolaná rozsáhlou lipidovou peroxidací v přítomnosti iontů Fe se v některých zdrojích nazývá ferroptosa. Je známo, že při tomto pochodu dochází ke ztrátě enzymové aktivity zásadního membránového antioxidačního enzymu GPX4, avšak průběh ferroptosy a subcelulární lokalizace toxických LOOH je dodnes nedostatečně prozkoumána. Důkladné pochopení mechanismu by mohlo přispět k vývoji léčebných strategií proti patologickým oxidačním stavům vedoucím k nemocem (Feng a Stockwell, 2018; Conrad a Pratt, 2019). Při vyšších hladinách ( $1-10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) 4-HNE se spotřebovává signifikantní množství GSH, což vede k jeho nedostatku, který se projevuje tvorbou 4-HNE aduktů s biomolekulami. Takové koncentrace 4-HNE vedou zpětně i k vyšší koncentraci ROS, což obecně snižuje viabilitu buněk (Uchida *et al.*, 1999). Při velmi vysokých koncentracích 4-HNE dochází k výraznému poškození, nekróze buněk a tím mohou být zasaženy celé tkáně (Ayala *et al.*, 2014).

Bylo zjištěno, že 4-HNE vykazuje výrazný vliv na proliferaci rakovinných buněk. Jeho působení v koncentracích podobných fyziologicky stanoveným ve zdravých buňkách ( $> 1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) vedlo k zastavení proliferace a naopak k vyvolání diferenciac buněk leukemické linie HL-60. Toto působení bylo spojeno s výrazným nárůstem populace buněk v G0/G1 fázích buněčného cyklu. Příčinou tohoto bloku bylo snížení exprese cyklinů D a A zapříčiněné právě vlivem 4-HNE, zatímco hladina cyklin-dependentních kinas 4 a 2 (EC 2.7.11.22) se nezměnila (Pizzimenti *et al.*, 1999). Mimo zastavení buněčného cyklu byl pozorován i výrazný proapoptický efekt na buněčných liniích odvozených od neuronů, hepatocytů či buněk endotelu (Poli a Schaur, 2000).

### **2.2.5 Vliv 4-hydroxynonenalu na zdraví**

Účinky 4-HNE na lidské zdraví vyplývají z jeho působení na buněčné úrovni. Toxicita 4-HNE je spojována s řadou závažných onemocnění, které jsou způsobeny jeho interakcí s proteiny či DNA. Je asociován se zánětlivými reakcemi,

neurodegenerativními a kardiovaskulárními chorobami, včetně aterosklerózy prostřednictvím oxidace LDL (Grootveld *et al.*, 1998; Nègre-Salvayre *et al.*, 2017). Dále je 4-HNE považován za prostředníka jaterních chorob přes fibrózu, steatózu až k cirhóze, často způsobených nadměrnou konzumací alkoholu (Parola a Robino, 2001).

Zánětlivé procesy jsou většinou spojeny s fibrogenezí při chronických onemocněních. 4-HNE se v tomto kontextu jeví jako výrazný aktivátor prostřednictvím zvýšení hladiny zánětlivého a fibrogenního cytokinu TGF $\beta$ 1 produkovaného makrofágy. Relativně dlouho je znám přímý chemotaktický efekt neutrofilních leukocytů k tomuto aldehydu, poprvé popsán *in vitro* (Curzio *et al.*, 1982) a *in vivo* (Schaur *et al.*, 1994). Následně však bylo zjištěno, že tato atraktance je způsobena zvýšením exprese chemotaktického proteinu monocytů MCP1 (Marra *et al.*, 1999). Regulace zánětlivých onemocnění v souvislosti s 4-HNE se liší mezi jednotlivými tkáněmi. Zatímco u buněk leukocytů vede působení 4-HNE ke snížení syntézy tumor-nekrotizujícího faktoru  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) a poklesu tvorby prozánětlivých cytokinů (Page *et al.*, 1999), tak na modelu hepatocytů alkoholických myší způsobovaly 4-HNE modifikované proteiny aktivaci COX a expresi prozánětlivého tumor-nekrotizujícího faktoru  $\alpha$  (Li *et al.*, 1997).

Kardiovaskulární onemocnění je jednou z nejčastějších příčin úmrtí ve vyspělých zemích. Srdeční sval je orgánem s nejvyšším příjmem a spotřebou molekulárního kyslíku a jeho využití energie je závislé na oxidační fosforylaci v mitochondriích (Duncker a Bache, 2008). Jeden komorový myocyt disponuje asi 7 000 mitochondriemi, jež tvoří přibližně 25% objemu cytosolu. Vysoká oxidační kapacita je stálým zdrojem ROS a sekundárně i 4-HNE. Za fyziologických podmínek je 4-HNE enzymaticky metabolizován, avšak určité patologické vlivy (ischemická reperfuze, srdeční selhání, diabetes) mohou vést k překročení metabolické kapacity, zvýšené tvorbě 4-HNE a následným dysfunkcím (Mali a Palaniyandi, 2014). Bylo zjištěno, že samotná srdeční ischemie nevede k nárůstu tvorby 4-HNE ani jeho aduktů. Naopak po proběhnutí srdeční ischemie a následné reperfuzi byly pozorovány až šestinásobné zvýšení koncentrace 4-HNE a jeho aduktů nezávisle na délce ischemie. Toto poškození je patrně způsobeno akumulací sukcinátu po dobu ischemie a jeho následným oxidačním odbouráním v komplexu II (EC 1.3.5.1) na vnitřní mitochondriální membráně, které vede k výrazné produkci ROS (Renner *et al.*, 2005). Později bylo zjištěno, že srdeční poškození může být omezeno působením mitochondriální ALDH2. Farmakologická aktivace ALDH2 vedla k 35% snížení koncentrace 4-HNE *in vitro* a 60% zmenšení

poškozené části srdce *in vivo* (Gomes *et al.*, 2014). Nadměrná exprese ALDH2 snížila hladiny 4-HNE v průběhu ischemie i reperfuze, naopak vypnutí genu pro ALDH2 vedla ke zvýšení koncentrace 4-HNE a poškození srdeční tkáně (Munukutla *et al.*, 2019).

Vzhledem k vysokým energetickým nárokům a markantnímu zastoupení lipidů (a PUFA) v neuronech, je mozková tkáň taktéž velmi citlivá na přítomnost ROS. Současně je v mozkové tkáni relativně vysoké zastoupení iontů kovů i přísun kyslíku, což může vést k produkci 4-HNE, jehož zvýšená koncentrace je spojena hned s několika neurodegenerativními chorobami (Csala *et al.*, 2015). Zvýšené koncentrace 4-HNE v plasmě byly detekovány u pacientů s obecnou depresí (Gardner *et al.*, 2003), zatímco zvýšené koncentrace v mozkové kůře u pacientů s bipolární poruchou a schizofrenií (Sanders *et al.*, 2002). Patogeneze a genetické pozadí neurodegenerativních poruch jsou známé a lipidová peroxidace a její produkty včetně 4-HNE nemusí být přímou příčinou jejich vzniku, avšak výrazně přispívají k progresi těchto onemocnění. V případě Huntingtonovy a Parkinsonovy choroby byla zvýšená koncentrace 4-HNE asociována s akumulací železa právě v oblasti mozku zodpovědné za tyto patologické stavy (Devos *et al.*, 2014). U Huntingtonovy choroby hraje oxidativní poškození důležitou roli v patofyziologii. U pacientů bylo identifikováno několik oxidačních modifikací proteinů i DNA a v jejich mozkové tkáni byly nalezeny zvýšené hladiny MDA a 4-HNE (Lee *et al.*, 2011). Dále bylo zjištěno, že je 4-HNE lokalizováno především v inkluzích mutantního proteinu huntingtinu a že 4-HNE inhibuje funkci proteasomu a vede ke zvýšené akumulaci proteinových agregátů (Di Domenico *et al.*, 2017). Parkinsonova choroba se vyznačuje přítomností tzv. Lewyho tělísek, jejichž hlavní součástí je agregovaný protein  $\alpha$ -synuklein ( $\alpha$ -syn). Bylo zjištěno, že oxidace a nitrace  $\alpha$ -syn zvyšuje jeho agregaci, přičemž oxidační poškození proteasomu vede k jeho snížené degradaci (Xiang *et al.*, 2013). Bylo prokázáno, že 4-HNE adukt s  $\alpha$ -syn má výrazně zvětšený oligomerační potenciál a vyvolává další výraznou proteinovou agregaci. Progresi Parkinsonovy choroby může 4-HNE také urychlit prostřednictvím narušení dopaminové signalizace (Cagle *et al.*, 2019). Alzheimerova choroba je nejvíce studovanou neurodegenerativní poruchou, jejíž projevy začínají mírným zhoršením kognitivních schopností a vyvíjejí se až do vážných pozdních fází ztráty mentální aktivity (Penke *et al.*, 2018). Na buněčné úrovni dochází k akumulaci agregovaného peptidu amyloidu  $\beta$ , jenž dokonce zvyšuje tvorbu ROS (Praticò a Sung, 2004). V prvotních fázích dochází ke zvýšené produkci  $H_2O_2$  a LOOH, jež dále podněcují tvorbu MDA a 4-HNE. Oxidativní poškození ovlivňuje řadu proteinů, mění jejich



strukturní a funkční vlastnosti na intracelulární i synaptické úrovni (Zhao a Zhao, 2013). Cíli modifikací 4-HNE jsou často enzymy zahrnuté do energetického metabolismu neuronů (akonitasa (EC 4.2.1.3), enolasa (EC 4.2.1.11) a ATP-syntasa (EC 7.1.2.2)) nebo antioxidační ochrany (superoxiddismutasa (EC 1.15.1.1) a hem-oxygenasa (EC 1.14.14.18)) (Di Domenico *et al.*, 2017). Amyotrofická laterální skleróza (ALS) je chronické onemocnění charakterizované degenerací motorických neuronů vedoucí k oslabení svalů a atrofii. Asi 20 % pacientů s ALS disponuje mutací v antioxidačním enzymu superoxiddismutase, která vede k neurotoxicitě. Toxicita může být způsobena jak nesprávnou konformací proteinu a jeho agregací, tak i působením odkrytých reakčních center obsahujících Cu/Zn, které mohou reagovat s peroxodusitanem či superoxidovým radikálem za paradoxní podpory lipidové peroxidace (Valentine, 2002). Zvýšené markery oxidativního stresu (včetně 4-HNE aduktů) byly detekovány v míše, mozkomíšním moku a séru pacientů s ALS. I v případě této choroby dochází k ovlivnění energetického metabolismu, struktury neuronů a proteinové homeostázy působením 4-HNE (Di Domenico *et al.*, 2017).

Úloha 4-HNE v rakovinném bujení je stále prozkoumávána. Bylo popsáno několik potenciálně mutagenních 4-HNE-DNA modifikací, např. DNA adukt nejčastěji mutovaného genu lidských malignit *p53* (Hu *et al.*, 2002). Avšak vysoká reaktivita 4-HNE vůči proteinům ve srovnání s DNA vedla ke zjištění, že hlavními cytotoxickými a karcinogenními vlivy 4-HNE je poškození proteinů zajišťujících opravy DNA (Feng *et al.*, 2004). Rakovinné buňky si však paradoxně udržují nízké hladiny 4-HNE ve srovnání s buňkami zdravých tkání prostřednictvím nadměrné exprese eliminačních enzymů (GST) (Zanetti *et al.*, 2003). Vyšší odolnost vůči oxidačnímu stresu může komplikovat protirakovinnou léčbu radioterapií a chemoterapií, na které se buňky mohou adaptovat a vytvořit si rezistenci. Hlavní roli v této regulaci hraje NRF2, který dodává maligním buňkám vyšší adaptabilitu, růstovou výhodu a zvyšuje rezistenci. Pro vývoj účinnější protirakovinné terapie by bylo nutné prozkoumat fyziologické a patologické role 4-HNE na širokém spektru lidských malignit (Kansanen *et al.*, 2013).

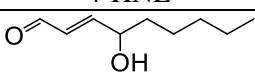
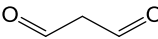
Na vyvážení účinků 4-HNE byly nalezeny přírodní inhibitory produkce ROS vyvolané 4-HNE. Mezi ně patří quercetin, čajové polyfenoly, jejichž inhibiční efekt klesá v řadě: epigallokatechingallát, teaflavindigallát, teaflavingallát a teaflavin. Tyto polyfenoly projevily i protektivní účinek vůči rakovinnému bujení, který může plynout jak z inhibice tvorby ROS, tak z modulace aktivity enzymů spojených s buněčnou proliferací a kancerogenezí (Feng *et al.*, 2001).

## 2.3 Porovnání 4-hydroxynonenalu a malondialdehydu

Mezi širokým spektrem produktů lipidové peroxidace jsou hlavními sekundárními produkty reaktivní aldehydy. Tyto fungují jako signální molekuly a taktéž jako cytotoxické produkty mají dlouhé biologické působení především prostřednictvím kovalentní modifikace proteinů. Mezi zásadní reaktivní produkty patří 4-HNE a MDA, jenž jsou už několik desítek let studovány ve smyslu mechanismu jejich tvorby a metabolismu a taktéž jsou využívány jako markery lipidové peroxidace (Ayala *et al.*, 2014). Hladiny těchto aldehydů s věkem a při patologických stavech mnohonásobně narůstají oproti jejich fyziologickým koncentracím (Gęgotek a Skrzydlewska, 2019). Jejich základní vlastnosti, chování a funkce jsou předkládány v této kapitole. Některé fyzikálně chemické a fyziologické vlastnosti jsou uvedeny v Tab. 1.

Zatímco 4-HNE je tvořen jako hlavní produkt peroxidace především  $\omega$ -6 PUFA, MDA je obecně nejvíce abundantním aldehydem při lipidové peroxidaci (Esterbauer a Cheeseman, 1990). Jak již vyplývá z Tab. 1, 4-HNE vykazuje vyšší toxicitu než MDA, zatímco MDA disponuje vyšší mutagenitou. Mechanismus mutagenity MDA vychází z tvorby guanosinových, adenosinových i cytosinových aduktů a vedou k substitucím bazí i rozsáhlým insercím či delecím. Genotoxicita 4-HNE je dána také tvorbou DNA aduktů (hlavně s guanosinem), jež vyvolávají výměnu sesterských chromatid. Některé buňky a tkáně (obzvláště jaterní a endoteliální) jsou na působení 4-HNE citlivější než jiné (Guéraud *et al.*, 2010).

Tab. 1 Hlavní fyzikálně chemické a fyziologické vlastnosti 4-HNE a MDA. (The Human Metabolome Database; PubChem)

	4-HNE	MDA
Strukturní vzorec		
Molekulová hmotnost M [g·mol <sup>-1</sup> ]	156,22	72,06
Počet donorů H vazby	1	0
Počet akceptorů H vazby	2	2
LD <sub>50</sub> [mg·kg <sup>-1</sup> ] (krysa, perorálně)	35	632
LD <sub>50</sub> [mg·kg <sup>-1</sup> ] (myš, perorálně)	69	606
Partiční koeficient logP	1,7	-0,6
Rozpustnost ve vodě [g·l <sup>-1</sup> ]	3,1	241
Disociační konstanta pK <sub>a</sub>	12,8	6,7
Fyziologická koncentrace c [μmol·l <sup>-1</sup> ] (krev)	0,05 - 0,15	1 - 2
Fyziologická koncentrace c [μmol·mmol <sub> kreatinin </sub> <sup>-1</sup> ] (moč)	0,03	0,22

Vzhledem k přítomnosti reaktivních center dochází u obou aldehydů k četným reakcím s nukleofily, jako jsou např. bazické aminokyseliny. 4-HNE má větší schopnost tvořit proteinové adukty přes Schiffovy báze (Lys) a přes Michaelovy adice (Cys, His, Lys, GSH), zatímco MDA tvoří pouze Schiffovy báze s Lys a může síťovat proteiny. Specifickým případem MDA aduktů jsou kombinované malondialdehyd-acetaldehydové proteinové adukty (MAA), které mohou vznikat reakcí Lys s jedním nebo dvěma ekvivalenty MDA a jedním ekvivalentem acetaldehydu. Nedávno bylo zjištěno, že podobné adukty mohou vznikat i reakcí MDA s formaldehydem (Nakamura *et al.*, 2017). MAA vykazují vysokou míru imunogenity a také mohou způsobovat síťování proteinů i DNA (Weismann a Binder, 2012). Zesíťované biomolekuly ztrácí svou funkci a biologické vlastnosti, se vzrůstajícím věkem a u chronických nemocí se tyto akumulují (Cheng *et al.*, 2011). Oba dva srovnávané aldehydy přes tvorbu aduktů ovlivňují syntézu a odbourávání proteinů. MDA přímo modifikuje elongační faktor EF-2, čímž zabraňuje interakci s ribozomem a narušuje translaci (Argüelles *et al.*, 2009). 4-HNE přes Cys adukty inhibuje enzymy např. proteindisulfidomerasu (molekulární chaperon; EC 5.3.4.1) u alkoholických jater, přičemž vůči MDA je tento enzym resistantní. Podobně, ačkoliv jsou oba aldehydy substráty ALDH2 (katalytickým residuem je Cys), je 4-HNE zároveň jejím inhibitorem (Guéraud *et al.*, 2010).

4-HNE i MDA ovlivňují signální dráhy, přičemž role 4-HNE byla popsána v kapitole 2.2.4. Ve zkratce 4-HNE ovlivňuje aktivitu mitochondriálních enzymů (tím může zvyšovat tvorbu ROS), v určitých koncentracích aktivuje vnitřní i vnější cestu apoptosy, ovlivňuje antioxidační odpověď a může regulovat i proliferaci buněk hladkého svalstva při ateroskleróze (Ayala *et al.*, 2014; Gęgotek a Skrzydlewska, 2019). MDA také může fungovat jako přenašeč signálu a může regulovat glukosou stimulovanou sekreci insulinu v Langerhansových ostrůvcích. V jaterních buňkách indukuje zvýšenou expresi kolagenu a může podporovat fibrogenézi. Adukty MDA s kolagenem současně vedou k zesíťování, ztrátě elasticity a patologickým stavům krevních cév (Yamada *et al.*, 2009). Biologický vliv MDA je prozatím dobře prozkoumán pouze u vlivu aduktů MDA a MAA na proteiny, které vedou k prozánětlivým reakcím v rámci celého organismu. Zvýšené množství aduktů může aktivovat specifické lymfocyty a vyvolávat autoimunitní odpověď (Wang *et al.*, 2012), přispívat k ateroskleróze i sekreci prozánětlivých cytokinů (interleukinů 6 a 8) (Gonen *et al.*, 2014). Prostřednictvím proteinkinasy C aktivuje také jaderný faktor  $\kappa$ B a zvyšuje expresi TNF $\alpha$ , což obecně podporuje zánětlivé reakce (Busch a Binder, 2017).

## **3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **3.1 Materiál**

#### **3.1.1 Chemikálie**

Médium RPMI-1640 (Biosera, Francie), fetální hovězí sérum (Biosera, Francie), streptomycin (Biosera, Francie), penicilin (Biosera, Francie), trypanová modř (Sigma-Aldrich, USA), peroxid vodíku (Sigma-Aldrich, USA), heptahydrát síranu železnatého (BDH Laboratory Supplies, Velká Británie), hydroxid sodný (Lach-Ner, Česká republika), kyselina chloristá (Sigma-Aldrich, USA), 2,4-dinitrofenylhydrazin (Sigma-Aldrich, Rakousko), kyselina sírová (Lach-Ner, Česká republika), voda pro HPLC (Sigma-Aldrich, Izrael), acetonitril pro HPLC (Sigma-Aldrich, Izrael), kyselina linoleová (Sigma-Aldrich, USA), 4-hydroxynonenal (Cayman Chemical, USA), formaldehyd (Lach-Ner, Česká republika), acetaldehyd (Sigma-Aldrich, USA), aceton (Lach-Ner, Česká republika), 1,1,3,3-tetraethoxypropan (Sigma-Aldrich, Čína), valeraldehyd (Sigma-Aldrich, USA), hexanal (Sigma-Aldrich, USA), 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina (MES; Sigma-Aldrich, USA).

#### **3.1.2 Přístrojové vybavení**

Laminární box s vertikálním prouděním (Merci, Česká republika), kultivační inkubátor (Contherm Mitre 4000 series, Nový Zéland), automatický počítač buněk (Automated Cell Counter TC20 Bio-Rad Laboratories, USA), sklíčka pro počítání buněk (Bio-Rad Laboratories, USA), stolní centrifuga (Fisher Scientific, Korea), stolní mini centrifuga (ThermoFisher, USA), stolní centrifuga (Sigma 3-30K Sartorius, Německo), vortex (IKA Works MS2, USA), třepačka (BioSan SIA PSU-10i, Lotyšsko), ultrasonikátor (Ultrasonikátor UP50H Hielscher, Německo), termoblok (BioSan SIA Bio TDB-100, Lotyšsko), HPLC (Waters Alliance e2695 HPLC System, USA), PDA detektor (Waters 2998 Photodiode Array Detector, USA), QDa detektor (Waters ACQUITY QDa Detector, USA), chromatografická kolona (Symetry C18, 4,6 x 75 mm, velikost částic 3,5  $\mu\text{m}$ , Waters, USA).

## 3.2 Biologický materiál a kultivační podmínky

Pro experimenty byla použita buněčná linie U937, která byla kultivována při 37 °C v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře. Ke kultivaci bylo použito RPMI-1640 médium s 10% fetálním hovězím sérem a antibiotiky (penicilin 100 U·ml<sup>-1</sup>, streptomycin 100 µg·ml<sup>-1</sup>). Buňky linie U937 jsou kultivovány ve formě suspenzní kultury.

Buněčná linie U937 byla odvozena z maligních buněk získaných výplachem hrudní dutiny 37-letého neléčeného pacienta s difúzním lymfomem. Může u nich být vyvolána konečná diferenciací ve zralé monocytů. Buňky exprimují FAS receptor, proto jsou citlivé na působení tumor-nekrotizujícího faktoru TNF. Tato linie se používá ke studiu chování a diferenciací monocytů, jež je ovlivňováno mnohými rozpustnými látkami. (US Public Health Service)

## 3.3 Metody

### 3.3.1 Příprava směsi standardů pro HPLC/MS analýzu

Byla připravena směs komerčních standardů analyzovaných karbonylů, jejichž výsledná koncentrace v nástriku byla odhadnuta podle předpokládané intenzity signálu. Zakoupené karbonyly byly naředěny do 96% (v/v) ethanolu na koncentraci 100 mmol·l<sup>-1</sup>, kromě 4-HNE a MDA. Komerční standard 4-HNE byl naředěn do 96% (v/v) ethanolu na zásobní koncentraci 1 mmol·l<sup>-1</sup>.

Standard pro MDA byl připraven z 500 µl 1% (v/v) kyseliny sírové a 20 µl 1,1,3,3-tetraetoxipropanu (TEP). Směs byla inkubována při teplotě 40 °C ve tmě po dobu 2 hodin. Poté byla na absorpčním spektrofotometru změřena absorbance standardu MDA při 244 nm (absorpční spektrofotometr byl vynulován na hodnotu 1% v/v kyseliny sírové; molární absorpční koeficient standardu  $\epsilon_{\text{MDA}} = 13700 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Z naměřené hodnoty absorbance byla vypočítána koncentrace připraveného standardu, na jejímž základě byla upravena jeho koncentrace naředěním 1% (v/v) kyselinou sírovou na 1 mmol·l<sup>-1</sup>.

Zásobní roztoky standardů karbonylů byly smíseny a doředěny 1% (v/v) kyselinou sírovou na finální koncentrace uvedené v Tab. 2.

Tab. 2 Zásobní a finální koncentrace standardů karbonylů pro HPLC/MS analýzu jejich směsi.

Aldehyd	Zásobní koncentrace	Finální koncentrace ve směsi
Malondialdehyd	1 mmol·l <sup>-1</sup>	10 μmol·l <sup>-1</sup>
Formaldehyd	100 mmol·l <sup>-1</sup>	15 mmol·l <sup>-1</sup>
Acetaldehyd	100 mmol·l <sup>-1</sup>	1 mmol·l <sup>-1</sup>
Aceton	100 mmol·l <sup>-1</sup>	5 mmol·l <sup>-1</sup>
4-hydroxynonenal	1 mmol·l <sup>-1</sup>	100 μmol·l <sup>-1</sup>
Valeraldehyd	100 mmol·l <sup>-1</sup>	500 μmol·l <sup>-1</sup>
Hexanal	100 mmol·l <sup>-1</sup>	500 μmol·l <sup>-1</sup>

Do vialky bylo odebráno 250 μl směsi standardů karbonylů. Směs byla inkubována ve tmě s 2 μl 50 mmol·l<sup>-1</sup> DNPH rozpuštěného v 50% (v/v) kyselině sírové po dobu 30 min při teplotě 4 °C. Reakcí karbonylů s DNPH došlo k derivatizaci za vzniku karbonyl-DNPH aduktů a vzorek byl neprodleně analyzován pomocí HPLC/MS.

### 3.3.2 Příprava vzorků kyseliny linoleové pro HPLC/MS analýzu

Byly připraveny vzorky kyseliny linoleové o koncentraci 0,5 mmol·l<sup>-1</sup>, jež byly vystaveny Fentonově reakci, při níž vznikl HO•. Tato reakce byla vyvolána v 520 μl vzorku kyseliny linoleové, k níž byl přidán heptahydrát síranu železnatého do výsledné koncentrace 1 mmol·l<sup>-1</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve výsledné koncentraci 5 mmol·l<sup>-1</sup>. Kontrolními vzorky byla kyselina linoleová o koncentraci 0,5 mmol·l<sup>-1</sup>, která nebyla dále upravována. Bylo provedeno kinetické měření v časech 0, 5, 15 a 60 min od vyvolání reakce. Po uplynutí inkubační doby bylo do vialky ihned odebráno 125 μl vzorku kyseliny linoleové, který byl po dobu 30 min inkubován při 4 °C s 1 μl 50 mmol·l<sup>-1</sup> DNPH rozpuštěného v 50% (v/v) kyselině sírové. Po dokončení derivatizace s DNPH byl vzorek okamžitě analyzován pomocí HPLC/MS.

### 3.3.3 Určení počtu a vitality buněk

Před každým použitím buněčné linie byl stanoven počet buněk a jejich vitalita pomocí automatického počítáče buněk (Automated Cell Counter TC20 Bio-Rad Laboratories, USA). Pro zjištění vitality buněk je nutné obarvení buněčné suspenze 0,4% w/v trypanovou modří v poměru 1:1. Obarvená suspenze je nanášena na počítací sklíčko a vložena do automatického počítáče buněk určujícího jak celkový počet buněk, tak i množství živých buněk ve vzorku.

### 3.3.4 Příprava biologických vzorků

V experimentech byly použity vzorky připravené tak, aby obsahovaly  $5 \cdot 10^6$  buněk v 200  $\mu\text{l}$ . Buněčná suspenze byla před samotným měřením třikrát promyta v 25  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  MES pufru o pH 6,5 (pH bylo upraveno 1  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  NaOH), aby bylo eliminováno falešné pozadí z kultivačního média.

V promytých buněčných suspenzích byl analyzován vliv  $\text{HO}^\bullet$ . Vzorek byl vystaven Fentonově reakci, při níž vzniká vysoce reaktivní  $\text{HO}^\bullet$ . Reakce byla vyvolána ve 200  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze přidáním heptahydrátu síranu železnatého do výsledné koncentrace 1  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  s  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve výsledné koncentraci 5  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Kontrolní vzorek buněčné suspenze už nebyl dále upravován. Bylo provedeno kinetické měření, během něhož byly vzorky sledovány v časech 0, 5, 15 a 60 min. Vzorky byly po dobu inkubace udržovány na třepačce při pokojové teplotě.

### 3.3.5 Příprava biologických vzorků pro HPLC/MS analýzu

Ze vzorků buněčné suspenze ošetřených reagenty pro zkoumání vlivu  $\text{HO}^\bullet$  byl následujícím způsobem izolován 4-HNE a analyzován pomocí HPLC s detektorem diodového pole (PDA). Po dokončení inkubace byl vzorek neprodleně sonikován na ledu po dobu 90 s. Po 15 min centrifugaci při 10 000 g při 4 °C bylo do čisté zkumavky odebráno 180  $\mu\text{l}$  ze vzniklého supernatantu, k němuž bylo přidáno 36  $\mu\text{l}$  6  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  hydroxidu sodného. Vytvořený vzorek byl inkubován v termobloku po dobu 30 min při 60 °C, kdy alkalickou hydrolyzou došlo k uvolnění aldehydů navázaných na proteiny. K zamezení zpětného navázání aldehydů k proteinům, byly proteiny precipitovány pomocí 90  $\mu\text{l}$  35% (v/v) kyseliny chloristé a okamžitou centrifugací po dobu 10 min při 16 000 g při 4 °C odstraněny ze vzorku. Po dokončení bylo 150  $\mu\text{l}$  získaného supernatantu odebráno do vialky. Do takto připraveného vzorku bylo přidáno 1,2  $\mu\text{l}$  50  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  DNPH rozpuštěného v 50% (v/v) kyselině sírové a následovala 30 min inkubace ve tmě při pokojové teplotě, při níž vznikaly karbonyl-DNPH adukty. Po derivatizaci DNPH byl vzorek připraven pro neprodlenou HPLC/MS analýzu.

### 3.3.6 Příprava vzorků standardu 4-hydroxynonenalu pro test stability

Pro test stability 4-HNE v přítomnosti  $\text{HO}^\bullet$  byly připraveny vzorky standardu 4-HNE o koncentraci 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v 1% (v/v) kyselině sírové. Po celou dobu bylo se standardem pracováno ve tmě. Kontrolní vzorky standardu 4-HNE nebyly dále

upravovány, zatímco ve vzorcích sledujících působení HO• byla vyvolána Fentonova reakce. Fentonova reakce byla iniciována v 500 µl standardu 4-HNE přidáním heptahydrátu síranu železnatého do výsledné koncentrace 1 mmol·l<sup>-1</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do výsledné koncentrace 5 mmol·l<sup>-1</sup>. Bylo provedeno kinetické měření, během kterého byly vzorky sledovány v časech 0, 15 a 60 min. Po dokončení inkubace bylo odebráno 125 µl vzorku standardu 4-HNE do vialky, k němuž byl přidán 1 µl 50 mmol·l<sup>-1</sup> DNPH rozpuštěného v 50% (v/v) kyselině sírové. Tento vzorek byl inkubován ve tmě po dobu 30 min při 4 °C a po takto provedené derivatizaci byl ihned analyzován pomocí HPLC/MS.

### 3.3.7 HPLC/MS analýza vzorků

Prvním krokem k zavedení metodiky stanovení aldehydů v biologických vzorcích byla provedena analýza směsi derivatizovaných standardů vybraných karbonylů, u kterých byla předpokládána přítomnost v reálných vzorcích (viz kapitola 3.3.1). Další analýzy byly poté provedeny se vzorky kyseliny linoleové vystavené působení HO• (viz kapitola 3.3.2) a následně se vzorky buněčné suspenze vystavené působení HO• (viz kapitola 3.3.4 a 3.3.5). Nakonec byly pro test stability analyzovány i vzorky standardu 4-HNE vystaveného působení HO• (viz kapitola 3.3.6).

Analýza karbonyl-DNPH aduktů probíhala izokratickou separací pomocí HPLC, jejíž mobilní fáze byla složena z vody pro HPLC a acetonitrilu v poměru 2:3 (v/v). Prostor s vialkami obsahující analyzované vzorky byl udržován při teplotě 4 °C. Pro separaci byla použita kolona Symetry C18 (4,6 x 75 mm, velikost částic 3,5 µm), jejíž teplota byla 35 °C. Mobilní fáze protékala rychlostí 0,3 ml·min<sup>-1</sup> a nástřikový objem analytu činil 10 µl. Měření jednoho vzorku probíhalo po dobu 40 min.

Detekce analytů byla provedena pomocí detektoru diodového pole (PDA) a zároveň hmotnostního detektoru (QDa). Na detektor PDA byl nastaven rozsah absorpčních vlnových délek 200-400 nm. Hmotnostní detektor s ionizací elektrosprejem byl nastaven takto: napětí kónu (cone voltage) 15 V, napětí kapiláry 0,8 kV, teplota próby 600 °C. Hmotnostní spektra všech analytů byla měřena v negativním módu, kromě MDA-DNPH měřeného v módu pozitivním. K evaluaci výsledků získaných HPLC/MS analýzou byl použit software Empower® 3.



### 3.3.8 Statistická analýza

Pomocí programu GraphPad Prism byly výsledky podrobeny statistické analýze. Byly provedeny nepárové parametrické t-testy porovnávající kontrolu a ošetřený vzorek ve stejném čase. Dále byla provedena analýza variance jednocestná ANOVA s Tukey testem. Analýzy byly provedeny na hladině významnosti  $\alpha = 95 \%$ . Podle výsledků uvedených analýz byly statisticky signifikantně rozdílné soubory dat označeny „\*“ (viz popisky obrázků).

## 4 VÝSLEDKY

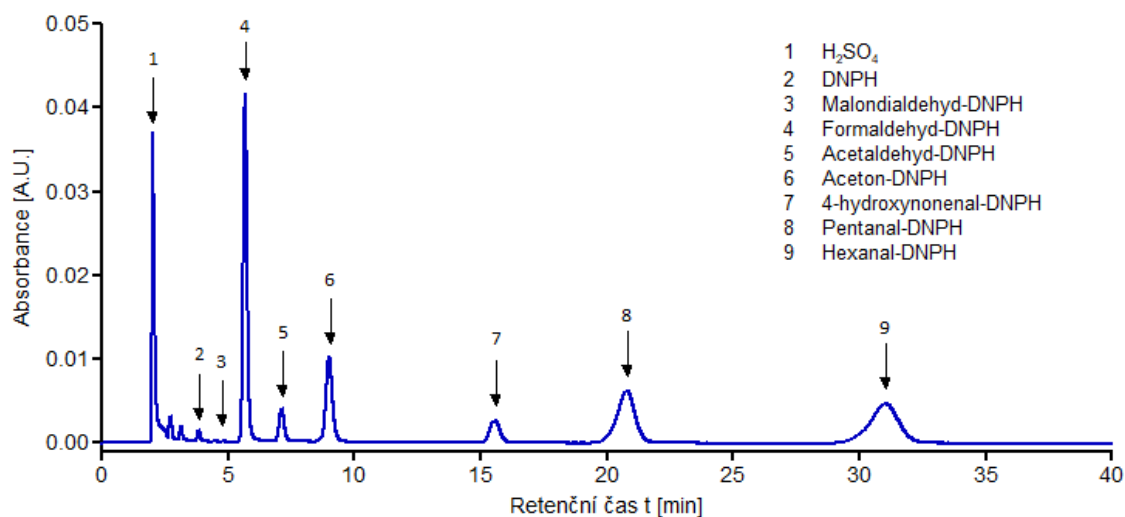
Experimenty provedené v praktické části korespondují s dlouhodobějším výzkumem prováděným na pracovišti, věnujícím se problematice ROS a lipidové peroxidace. Jelikož je na pracovišti intenzivně studován fyziologický význam a dopady lipidové peroxidace u rostlinného (Pospíšil a Yamamoto, 2017; Ferretti *et al.*, 2018) i živočišného (Rác *et al.*, 2015) materiálu, může být předkládaná práce rozšiřující pole detekovaných karbonylových produktů i do budoucna přínosná.

### 4.1 HPLC/MS analýza směsi standardů karbonylů

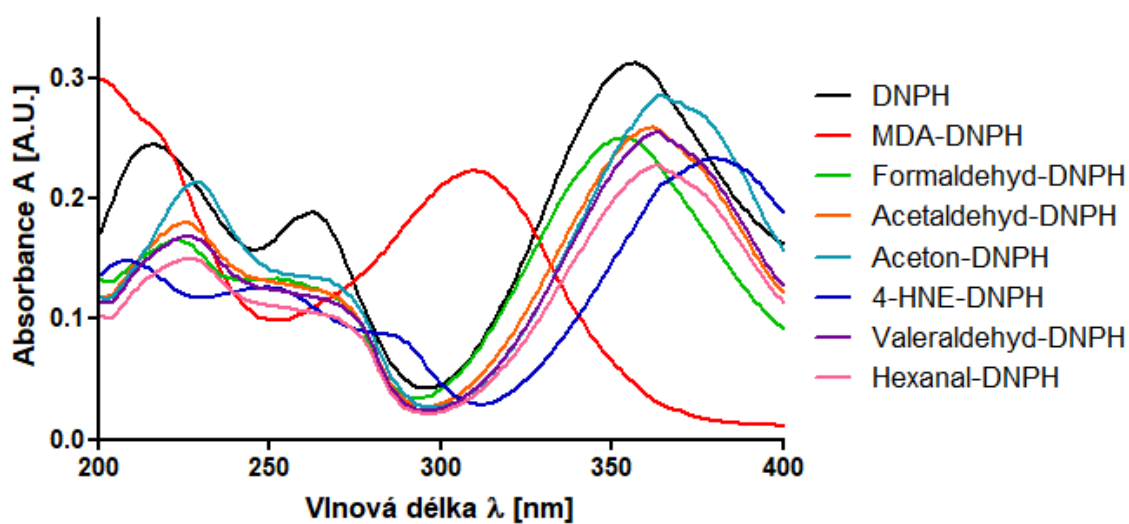
Byla vytvořena směs komerčně dostupných standardů karbonylů, u kterých byla předpokládána přítomnost ve vzorcích vystavených působení  $\text{HO}^\bullet$  s probíhající lipidovou peroxidací. Tato směs (viz kapitola 3.3.1) byla po derivatizaci s DNPH podrobena HPLC/MS analýze. Na základě záznamu z detektoru PDA Obr. 12 popisujícího separaci derivatizovaných standardů vybraných karbonylů byly stanoveny klíčové identifikační parametry (vlnová délka absorpčního maxima (Obr. 13) a retenční čas). Následná analýza pomocí hmotnostního detektoru QDa vedla ke stanovení třetího identifikačního parametru, hodnoty  $m/z$ . Hodnoty uvedených identifikačních parametrů pro jednotlivé karbonyly jsou uvedeny v Tab. 3. Tyto parametry umožnily identifikaci a sloužily k potvrzení přítomnosti karbonyl-DNPH aduktů ve vzorcích kyseliny linoleové i buněčné suspenze podrobených působení  $\text{HO}^\bullet$ .

Tab. 3 Identifikační parametry derivatizovaných standardů karbonylů pro HPLC/MS analýzu.

Karbonyl-DNPH	$t_R$ (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	$m/z$
Malondialdehyd-DNPH	4,9	310	235
Formaldehyd-DNPH	5,7	355	209
Acetaldehyd-DNPH	7,2	360	223
Aceton-DNPH	9,2	360	235
4-hydroxynonenal-DNPH	15,6	380	335
Valeraldehyd-DNPH	20,8	360	265
Hexanal-DNPH	31,5	360	279



Obr. 12 Ukázka chromatogramu derivatizované směsi standardů karbonylů při 360 nm.

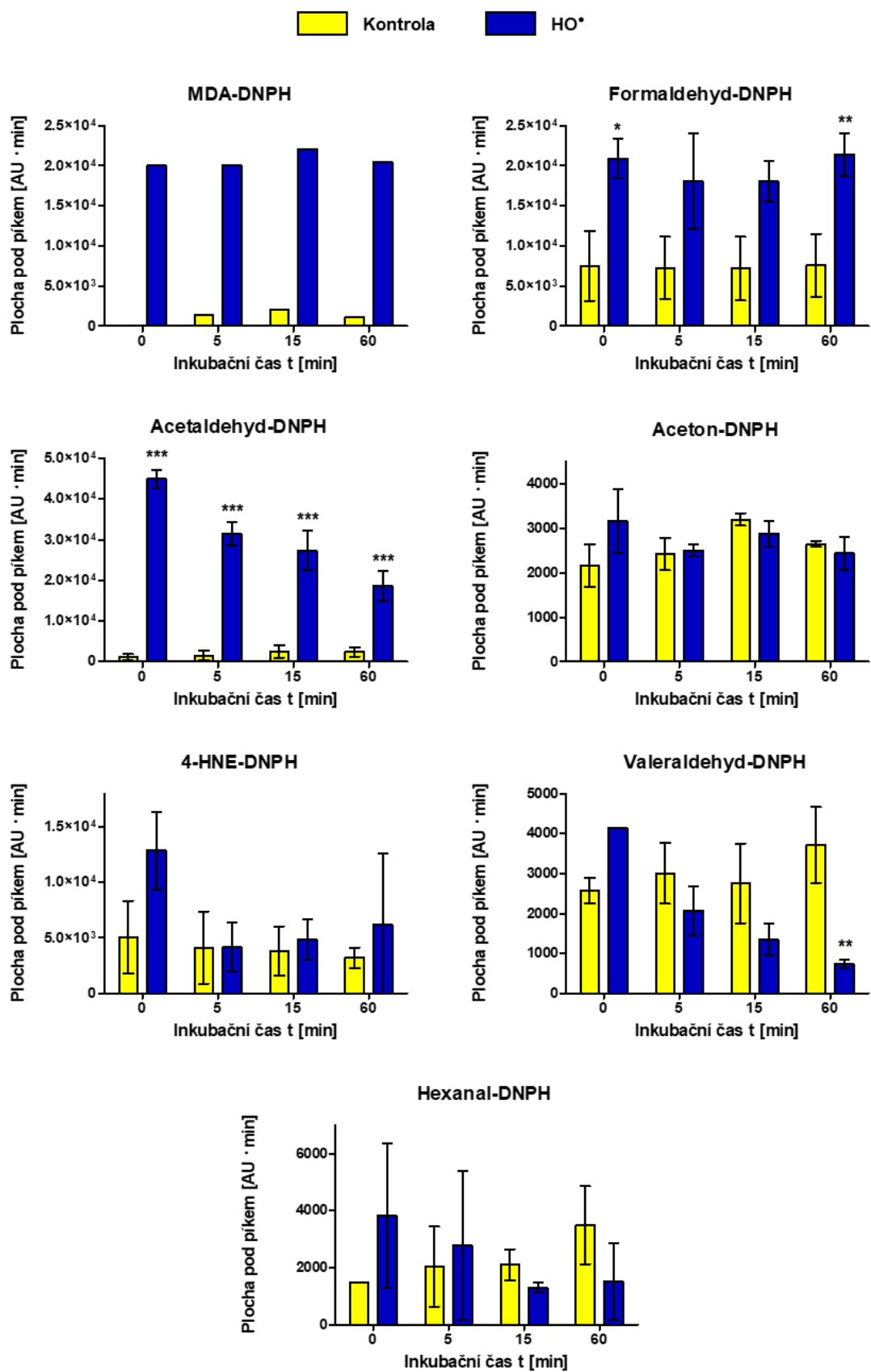


Obr. 13 Srovnání absorpčních spekter analyzovaných karbonyl-DNPH aduktů.

## 4.2 Vliv hydroxylového radikálu na tvorbu karbonylů ve vzorcích kyseliny linoleové

Na základě zjištěných identifikačních parametrů derivatizovaných karbonylů byla vyhodnocena data získaná HPLC/MS analýzou vzorků kyseliny linoleové, jež byly vystaveny působení HO<sup>•</sup>. V chromatogramech získaných z PDA byly identifikovány píky karbonyl-DNPH aduktů a integrací jejich křivek byla stanovena plocha pod píkem.

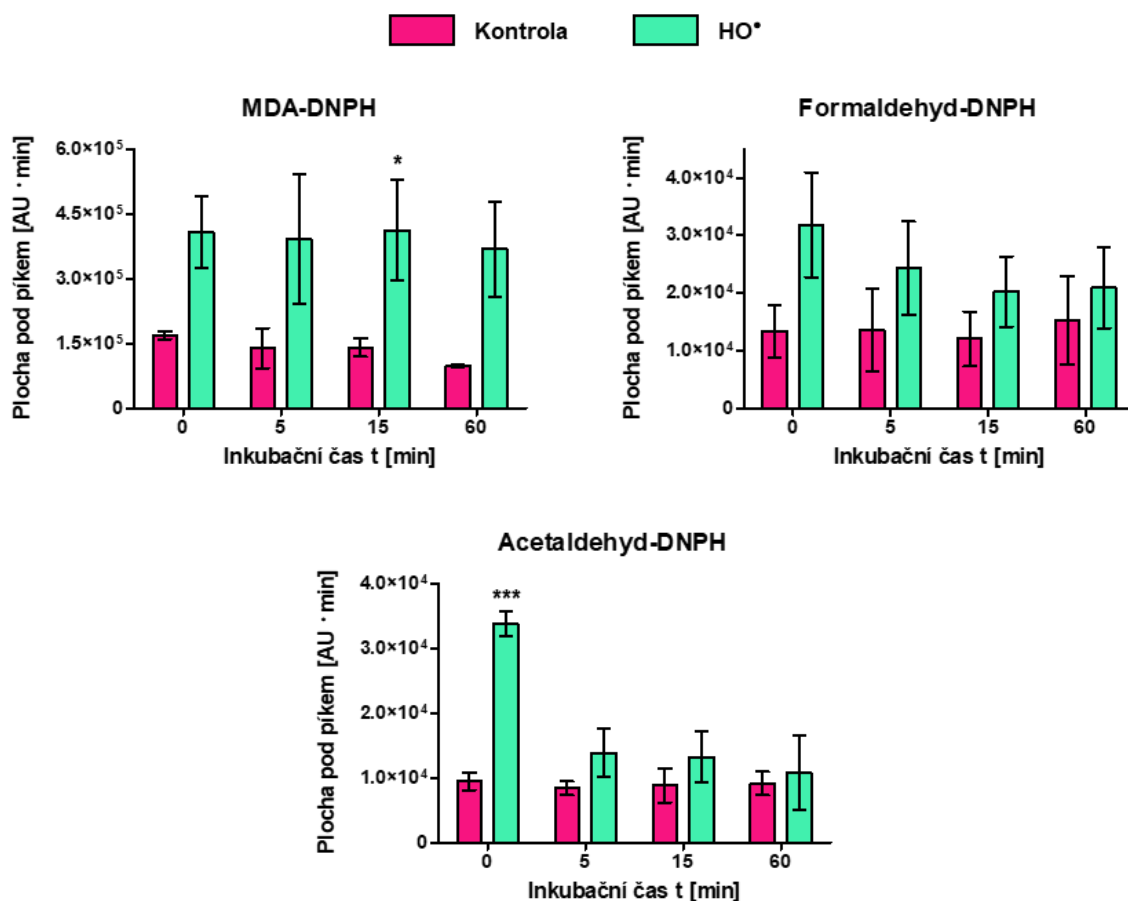
Pomocí HPLC analýzy byly ve vzorcích kyseliny linoleové detekovány tyto karbonyl-DNPH adukty: MDA-DNPH, formaldehyd-DNPH, acetaldehyd-DNPH, aceton-DNPH, 4-HNE-DNPH, valeraldehyd-DNPH a hexanal-DNPH (Obr. 14). Jelikož MDA-DNPH byl identifikován jen v některých opakováních experimentu, nejsou u něj uvedeny směrodatné odchylky a nemohla být provedena statistická analýza. Podobně je tomu u valeraldehyd-DNPH u vzorků kyseliny linoleové vystavené působení HO<sup>•</sup> v čase 0 min a u hexanal-DNPH u kontrol v čase 0 min. U MDA-DNPH, formaldehyd-DNPH a acetaldehyd-DNPH byl pozorován průkazný nárůst těchto aldehydů ve vzorcích kyseliny linoleové už okamžitě po ošetření HO<sup>•</sup>. Množství aduktu acetaldehyd-DNPH detekovaného v ošetřených vzorcích kyseliny linoleové bylo v čase 0 min po ošetření 40x vyšší než ve vzorcích kontrolních, po 60 min od ošetření to bylo 8x více. V případě 4-HNE-DNPH byl pozorován okamžitý nárůst po ošetření HO<sup>•</sup> oproti kontrole, ale už po 5 min došlo k poklesu na stabilní úroveň kontrolního vzorku. Bylo tedy potvrzeno, že při peroxidaci kyseliny linoleové sice 4-HNE vzniká, ale jeho množství se v čase poměrně rychle snižuje. Z tohoto důvodu byl proveden test stability standardu 4-HNE v prostředí HO<sup>•</sup> (viz kapitola 0). Nutno podotknout, že plochy píků aceton-DNPH, valeraldehyd-DNPH a hexanal-DNPH byly detekovány pouze do hodnot 4000 AU·min a proto jsou u těchto analytů větší směrodatné odchylky a méně signifikantní rozdíly v čase, ve srovnání např. s acetaldehyd-DNPH. Poněvadž byl u některých karbonyl-DNPH aduktů (aceton-DNPH, 4-HNE-DNPH, valeraldehyd-DNPH, hexanal-DNPH) v kontrolních a ošetřených vzorcích stanoven podobně vysoký signál (a tedy i srovnatelná koncentrace), mohlo docházet k oxidaci kyseliny linoleové již před analýzou při předchozím skladování.



Obr. 14 Kinetické měření vlivu HO<sup>•</sup> na tvorbu karbonyl-DNPH aduktů ve vzorcích kyseliny linoleové (n=3, ± SD; v případě MDA-DNPH n=2), výsledky z PDA. Signifikantní rozdíly mezi kontrolou a ošetřením stanovené pomocí analýzy variance jednocestná ANOVA s Tukey testem jsou označeny hvězdičkami: \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001. Rozdíly byly potvrzeny pomocí t-testu.

Ve vzorcích kyseliny linoleové vystavené vlivu  $\text{HO}^\bullet$  byly pomocí QDa detekovány pouze adukty MDA-DNPH, formaldehyd-DNPH a acetaldehyd-DNPH (Obr. 15). MDA-DNPH bylo v ošetřených vzorcích detekováno asi 2,5x více než v kontrolních a tato hladina byla stabilní po celou sledovanou dobu. Stejný nárůst byl ve vzorcích kyseliny linoleové ošetřené  $\text{HO}^\bullet$  pozorován i u formaldehyd-DNPH a acetaldehyd-DNPH v čase 0 min, ale s inkubační dobou se množství těchto aduktů snižovalo. U formaldehyd-DNPH docházelo k postupnému snížení množství v ošetřených vzorcích, nicméně hodnoty ošetřených vzorků byly i po 60 min inkubace o 35 % vyšší než u kontrolních. U acetaldehyd-DNPH bylo u ošetřených vzorků snížení rapidní mezi 0. a 5. min, načež byla hladina acetaldehyd-DNPH od 5. min takřka stabilní a cca o 20 % vyšší než kontrola.

Výsledky získané pomocí PDA a QDa korespondují v případě MDA-DNPH a formaldehyd-DNPH, kdy byl u obou aduktů pozorován výrazný nárůst v ošetřených vzorcích oproti kontrole a jejich hladina v čase zůstávala přibližně stejná. Trend výsledků získaných pomocí PDA a QDa pro acetaldehyd-DNPH se také shoduje, avšak po prvotním nárůstu v čase 0 min byl následný pokles signálu v ošetřených vzorcích výrazný a konstantní od času 5-60 min, zatímco u PDA byl pokles postupný.



Obr. 15 Kinetické měření vlivu HO• na tvorbu aldehyd-DNPH aduktů ve vzorcích kyseliny linoleové (n=3, ± SD), výsledky z QDa. Signifikantní rozdíly mezi kontrolou a ošetřením stanovené pomocí analýzy variance jednocestná ANOVA s Tukey testem jsou označeny hvězdičkami: \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001. Rozdíly byly potvrzeny pomocí t-testu.

### 4.3 Vliv hydroxylového radikálu na tvorbu karbonylů v rakovinných buňkách

Na základě zjištěných identifikačních parametrů derivatizovaných karbonylů byla vyhodnocena data získaná HPLC/MS analýzou vzorků rakovinných buněk U937, které byly vystaveny vlivu HO•. V chromatogramech byly identifikovány píky karbonyl-DNPH aduktů a integrací jejich křivek stanovena plocha pod píkem.

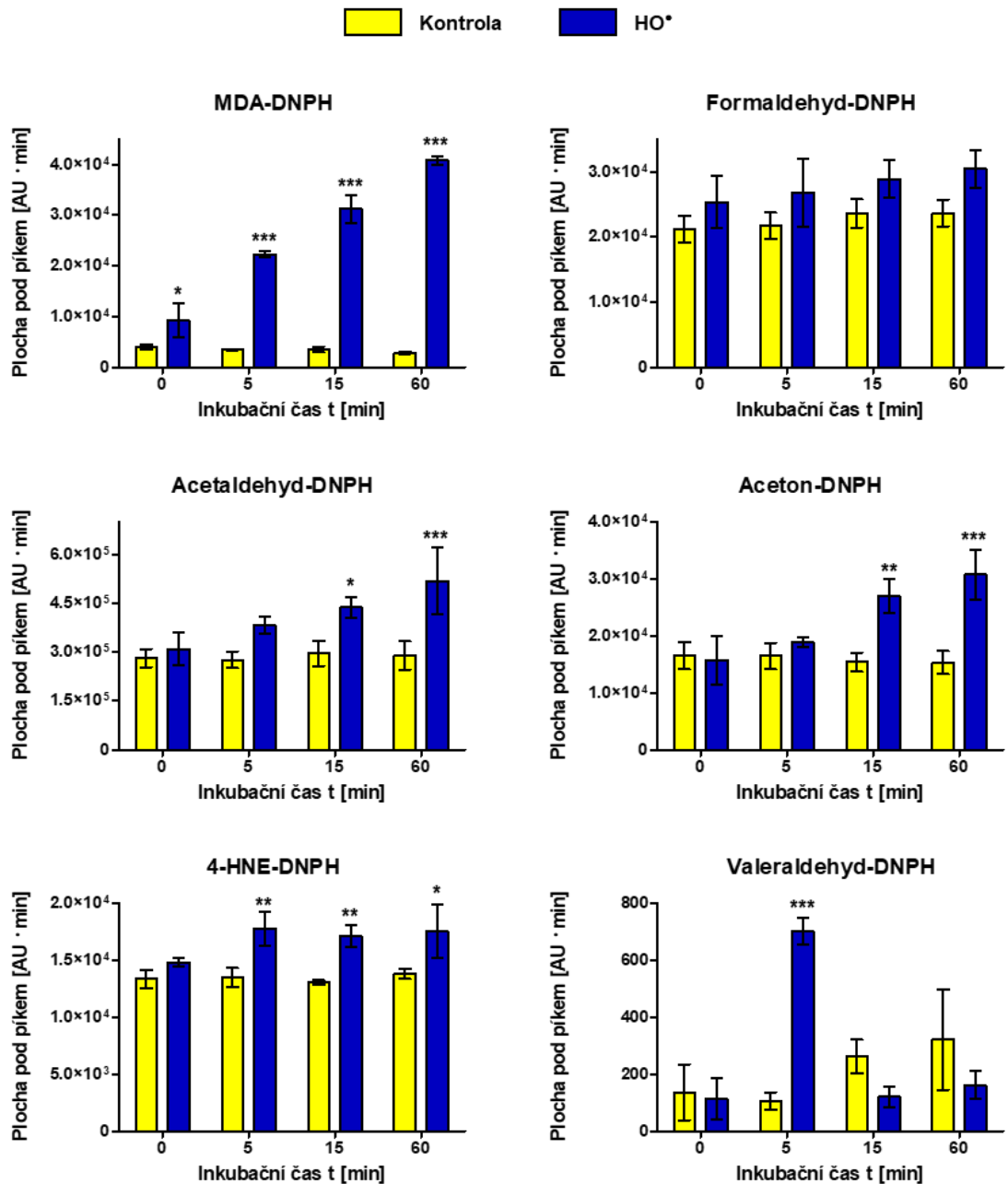
Pomocí PDA detektoru bylo ve vzorcích ošetřených rakovinných buněk detekováno stejných sedm karbonyl-DNPH aduktů (Obr. 16) jako ve vzorcích kyseliny linoleové. V kontrolních vzorcích byly hladiny většiny z nich (MDA-DNPH, formaldehyd-DNPH, acetaldehyd-DNPH, aceton-DNPH a 4-HNE-DNPH) stabilní po celou dobu experimentu. MDA-DNPH vykazovalo v biologických vzorcích ošetřených HO• oproti

kontrolním signifikantní nárůst signálu po celou sledovanou inkubační dobu (v čase 0 min je to 2x více než v kontrole, v čase 60 min asi 15x více než v kontrole). Nárůst signálu formaldehyd-DNPH v ošetřených vzorcích byl v čase jen mírný, na počátku ošetření byl o 20 % vyšší a po 60 min asi o 30 % vyšší oproti kontrolním vzorkům. V případě acetaldehyd-DNPH byl pozorován postupný nárůst množství po vystavení rakovinných buněk vlivu HO• v porovnání s kontrolními neošetřenými buňkami. Ihned po ošetření buněk acetaldehyd-DNPH vzrostl asi o 10 %, po pěti minutách již o 40 % a po hodině působení HO• dosahoval 80% nárůstu. Aceton-DNPH vykazoval nárůst až po 5. min působení HO•, po 60 min bylo jeho množství oproti kontrole dvojnásobné. Nárůst 4-HNE-DNPH v ošetřených buňkách byl také pomalejší, ihned po ošetření pouze 10%, a od 5. min až do 60. min vykazoval 4-HNE-DNPH stabilní hladinu o 30 % vyšší než v kontrolních buňkách. Pomocí PDA byly v buněčných extraktech také detekovány valeraldehyd-DNPH a hexanal-DNPH, ale pouze ve velmi malých množstvích. U valeraldehyd-DNPH byl v buňkách pozorován signifikantní nárůst (6x více než v kontrole) pouze v 5. min, v 5. a 60. min byla množství v ošetřených vzorcích oproti kontrole dokonce poloviční (ale statisticky nesignifikantní). Hexanal-DNPH nebyl v kontrolních vzorcích rakovinných buněk vůbec detekován, v ošetřených vzorcích byl hexanal-DNPH detekován jen v některých opakováních experimentu, z tohoto důvodu u tohoto aduktu nejsou uvedeny směrodatné odchylky. V těch opakováních, kde byl hexanal-DNPH detekován vykazoval po celou inkubační dobu postupný nárůst, po 60 min o 80 % víc oproti 0. min.

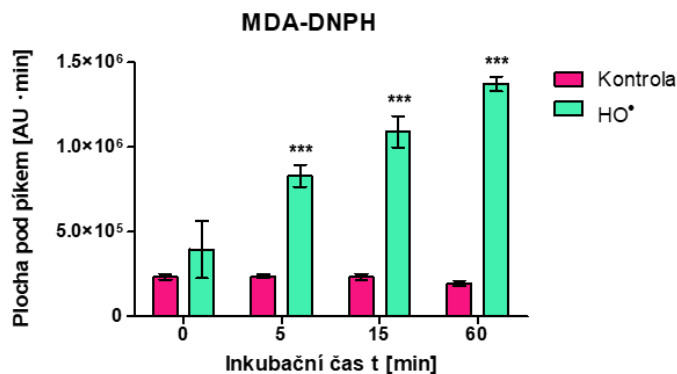
V analyzovaných vzorcích rakovinných buněk, které byly vystaveny působení HO•, byl QDa detektorem detekován pouze MDA-DNPH (Obr. 17). Tento v kontrolních vzorcích vykazoval stabilní hladinu po celou dobu inkubace a v ošetřených vzorcích jeho množství s inkubačním časem významně rostlo. V čase 0 min MDA-DNPH vzrostl v ošetřených vzorcích o 70 %. Po 60 min inkubace bylo v ošetřených vzorcích sedminásobné množství oproti kontrole.

Data získaná z PDA (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**) a QDA (Obr. 17) pro MDA-DNPH výborně korelují, shoduje se trend i poměry nárůstu signálu v čase.





Obr. 16 Kinetické měření vlivu HO\* na tvorbu karbonyl-DNPH aduktů v rakovinných buňkách (n=3, ± SD), výsledky z PDA. Signifikantní rozdíly mezi kontrolou a ošetřením stanovené pomocí analýzy variance jednocestná ANOVA s Tukey testem jsou označeny hvězdičkami: \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001. Rozdíly byly potvrzeny pomocí t-testu.

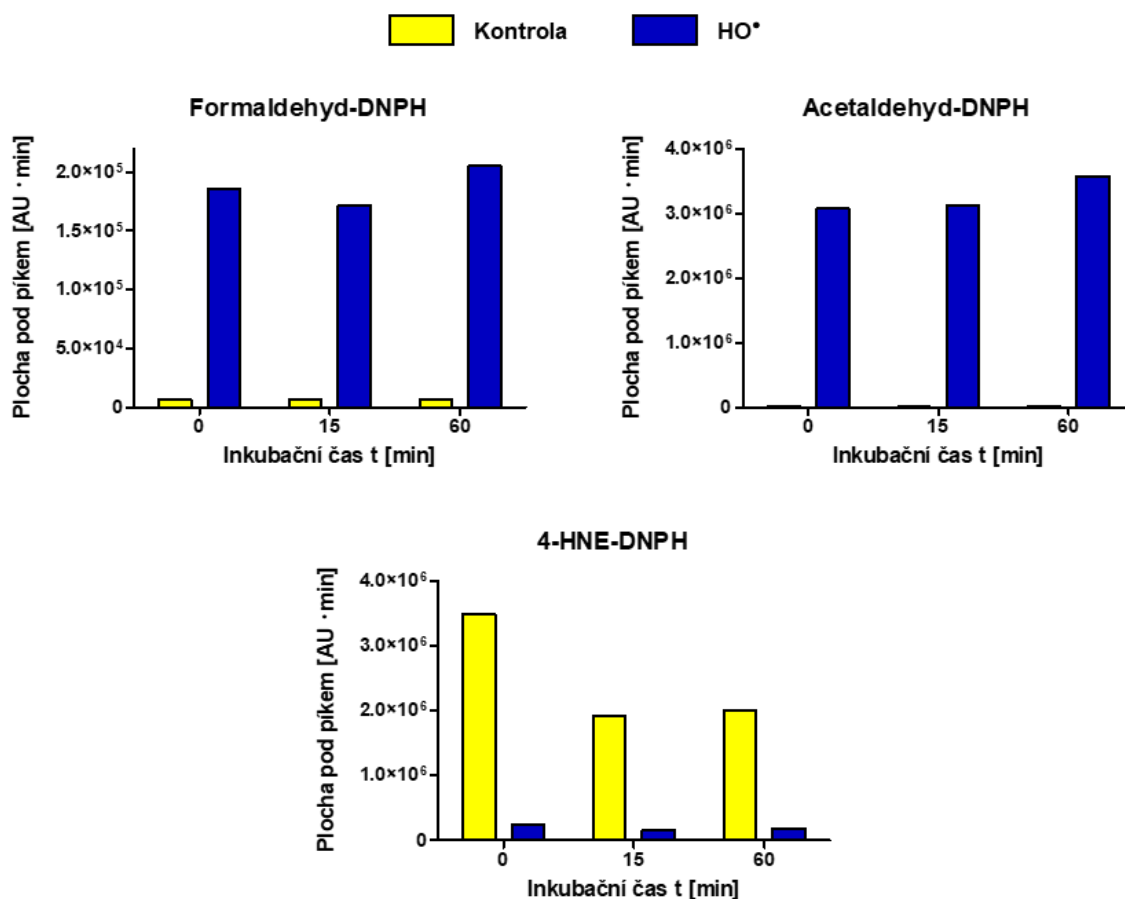


Obr. 17 Kinetické měření vlivu HO• na tvorbu MDA-DNPH v rakovinných buňkách (n=3, ± SD), výsledky z QDa. Signifikantní rozdíly mezi kontrolou a ošetřením stanovené pomocí analýzy variance jednocestná ANOVA s Tukey testem jsou označeny hvězdičkami: \*\*\* P < 0,001. Rozdíly byly potvrzeny pomocí t-testu.

## 4.4 Vliv hydroxylového radikálu na stabilitu standardu

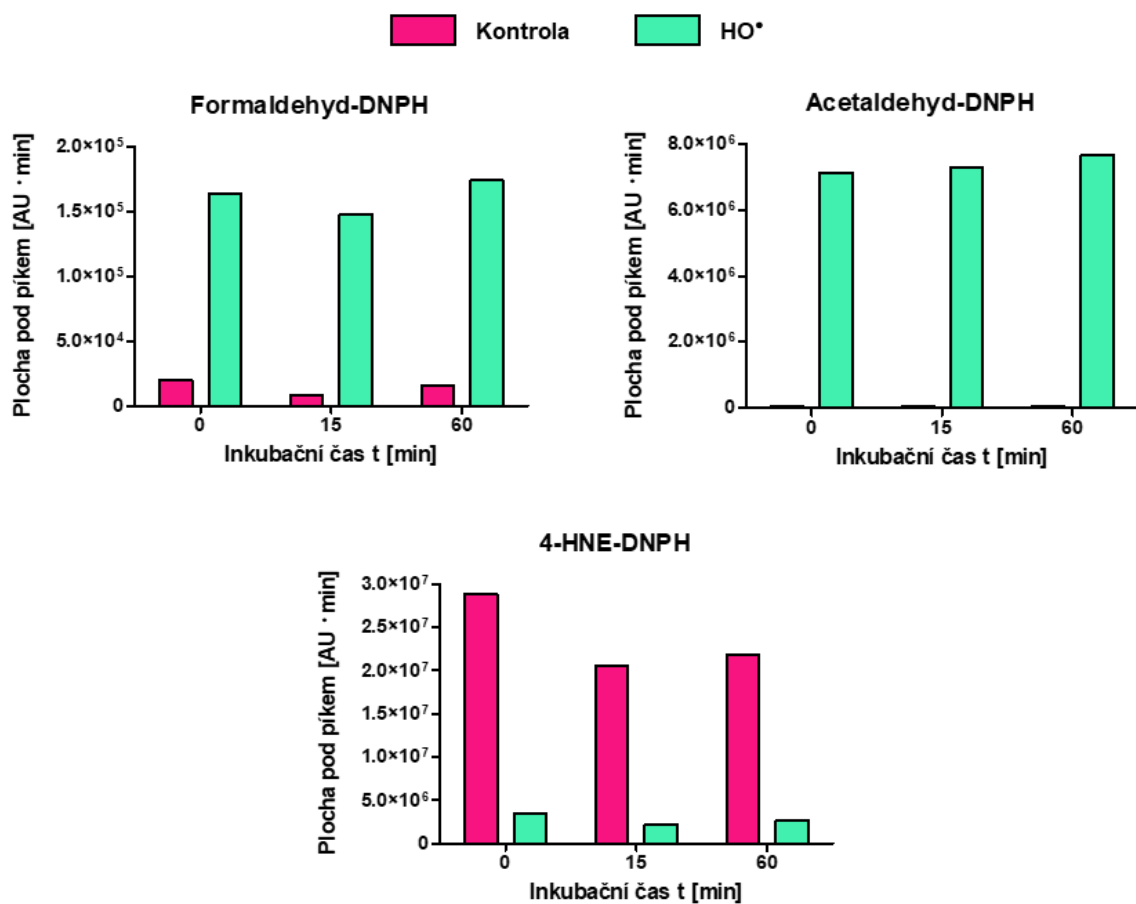
### 4-hydroxynonenalu

Na základě výsledků HPLC/MS analýzy kyseliny linoleové, kdy její peroxidací vznikal 4-HNE, jehož množství v čase rapidně kleslo (viz kapitola 4.2), byl proveden test stability standardu 4-HNE (Obr. 18 a Obr. 19). Již po 15 min vykazovaly kontrolní vzorky standardu 4-HNE 45% úbytek signálu na PDA a 30% úbytek na QDa, což ukazuje na nestabilitu standardu tohoto aldehydu. V 60. min byly hodnoty srovnatelné s těmi v 15. min a nedocházelo tak k jeho dalšímu rozpadu. Výrazný úbytek 4-HNE-DNPH byl sledován při vystavení standardu 4-HNE působení HO•, a to jak pomocí PDA, tak pomocí QDa detektoru. Pokles 4-HNE-DNPH byl pozorován ihned po vystavení Fentonově reakci, v čase 0 min činil úbytek oproti kontrolnímu vzorku na PDA téměř 95 %, na QDa 90 %. Toto snížení 4-HNE-DNPH bylo po zbytek inkubační doby téměř identické.



Obr. 18 Kinetické měření vlivu HO<sup>•</sup> na tvorbu aldehyd-DNPH aduktů ze standardu 4-HNE (n=1), výsledky z PDA.

V tomto testu stability 4-HNE byly pomocí PDA i QDa detekovány i jednoduché aldehydy (Obr. 18 a Obr. 19). V kontrolních vzorcích standardu 4-HNE byly pomocí PDA detekovány v čase stabilní nízké hladiny formaldehyd-DNPH a acetaldehyd-DNPH. Množství obou DNPH aduktů se však významně zvýšila ihned po inkubaci s HO<sup>•</sup>, což potvrzují oba použité detektory. Množství formaldehyd-DNPH detekovaného na PDA narostlo po ošetření oproti kontrole více než 25x, po 60 min to bylo 30x více než v kontrole. Na QDa byl pozorován ihned po ošetření osminásobný nárůst formaldehyd-DNPH oproti kontrole, po 15 min jej bylo stanoveno skoro 20x více a po 60 min 10x více než v kontrolním vzorku. Acetaldehyd-DNPH vykazoval postupný růst v čase působení HO<sup>•</sup> na PDA i QDa. Pomocí PDA bylo v ošetřených vzorcích detekováno 280x až 380x více acetaldehyd-DNPH než v kontrolních. Pomocí QDa bylo ve vzorcích vystavených působení HO<sup>•</sup> stanoveno 150x až 200x více acetaldehyd-DNPH než v kontrolních. Tímto experimentem bylo prokázáno, že 4-HNE není v prostředí HO<sup>•</sup> stabilní, a dochází k jeho rozpadu na jednodušší aldehydy – formaldehyd a acetaldehyd.



Obr. 19 Kinetické měření vlivu HO• na tvorbu aldehyd-DNPH aduktů ze standardu 4-HNE (n=1), výsledky z QDa

## 5 DISKUZE

Karbyonyly vzniklé lipidovou peroxidací jsou studovány již od 80. let 20. století, kdy se tématu intenzivně věnoval kolektiv Esterbauera. V posledních době se ukazuje, že tyto sekundární produkty hrají významnou roli v patofyziologii mnoha onemocnění (Di Domenico *et al.*, 2017; Nègre-Salvayre *et al.*, 2017; Feng a Stockwell, 2018; Munukutla *et al.*, 2019).

V předkládané práci byla provedena HPLC/MS analýza vzorků kyseliny linoleové a rakovinných buněk linie U937, jež byly vystaveny působení HO<sup>•</sup>. V těchto vzorcích bylo detekováno sedm karbyonylů vznikajících jako sekundární produkty lipidové peroxidace: MDA, formaldehyd, acetaldehyd, aceton, 4-HNE, valeraldehyd a hexanal.

Peroxidace kyseliny linoleové byla v literatuře podrobně popsána a byly detekovány mnohé produkty vznikající při jejím rozkladu. Prvním známým karbyonylovým produktem autooxidace kyseliny linoleové a jejích esterů byl MDA, jehož prekurzorem jsou cyklické endoperoxidy (Pryor *et al.*, 1976). Později byly detekovány acetaldehyd, valeraldehyd a hexanal při teplotním rozkladu LOOH, vznikajících při autooxidaci kyseliny linoleové (Frankel *et al.*, 1981). Při detailním studiu byla detekována kyselina octová, valeraldehyd a hexanal jako rozkladné produkty LOOH, jež vznikají z esterů kyseliny linoleové po fotosensitizační reakci s <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (Frankel *et al.*, 1982). V roce 1991 byla publikována zásadní studie peroxidace kyselin olejové, linoleové, linolenové a arachidonové v peroxidačním systému Fe<sup>2+</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, jež koresponduje s metodikou použitou v předkládané práci. Mezi produkty peroxidace byl vůbec poprvé ve velkém zastoupení detekován formaldehyd, a dále všechny ostatní aldehydy detekované i v předkládané práci (acetaldehyd, aceton, valeraldehyd, hexanal, MDA, 4-HNE). V této publikaci byly jednoduché nasycené aldehydy (formaldehyd, acetaldehyd) detekovány jako cystaminové deriváty pomocí GC-MS (Tamura *et al.*, 1991), na rozdíl od DNPH derivátů pomocí HPLC-MS v předkládané práci. Většina publikovaných klinických prací se zabývá detekcí a kvantifikací MDA a 4-HNE (Tsikas *et al.*, 2017; Barrera *et al.*, 2018; Gęgotek a Skrzydlewska, 2019), ale pozornost již byla věnována i dalším aldehydům, s kratším i delším řetězcem (Berdyshev, 2011).

V literatuře bylo popsáno, že u nádorových buněk je obecně vyšší koncentrace ROS ve srovnání se zdravými buňkami, např. u buněk chronické lymfocytární leukemie (Zhou *et al.*, 2003), nebo vyšší míra oxidovaných bazí v DNA např. u nemalobuněčného karcinomu plic (Tsao *et al.*, 2007) či karcinomů prostaty (Kumar *et al.*, 2008).

Na základě těchto pozorování a také jednoduché práce se suspenzními buněčnými kulturami byly v předkládané práci jako biologický systém lipidové peroxidace zvoleny buňky linie U937. U nich byly v daném časovém rozmezí detekovány výše uvedené karbonyly jako sekundární produkty peroxidace PUFA.

Konkrétně na buňkách linie U937 bylo již dříve provedeno několik analýz týkajících se lipidové peroxidace, stanovení její míry a vlivu na viabilitu buněk. Na základě působení  $^1\text{O}_2$  na buňky devíti leukemických linií, včetně U937, bylo zjištěno, že míra peroxidace lipidů se u jednotlivých buněčných linií liší v závislosti na obsahu PUFA, proteinů a permeabilitě jejich membrán (Schafer a Buettner, 1999). Při vystavení buněk linie U937 působení  $\text{LOO}^\bullet$  byla detekována bazální hladina MDA v koncentraci  $575 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Dále bylo zjištěno, že působením  $\text{LOO}^\bullet$  trvajícím 12 h, dochází ke vzniku proteinových hydroperoxidů, což byl první případ jejich detekce v buňkách po působení ROS. V této studii hladina MDA vzrůstala až po působení delším než 12 h (Gieseg *et al.*, 2000). Při další analýze lipidové peroxidace na buněčné linii byly potvrzeny zvýšené hladiny MDA a 4-HNE proteinových aduktů, což potvrdilo jejich tvorbu a reakci s proteiny *in vivo* (Yang *et al.*, 2004; Muller *et al.*, 2013). Na pracovišti byla na modelu buněk U937 provedena analýza vlivu  $\text{HO}^\bullet$  vzniklého Fentonovou reakcí na biomolekuly. Po působení  $\text{HO}^\bullet$  byl detekován výrazný nárůst MDA, markeru lipidové peroxidace. Současně bylo zjištěno, že oxidačním poškozením biomolekul dochází k tvorbě  $^1\text{O}_2$ , jehož působení dále prohlubuje oxidační poškození (Rác *et al.*, 2015). Kinetická analýza, tedy stanovení minimálně MDA a 4-HNE a jejich změny v čase, zatím provedena nebyla. Existuje však několik studií naznačujících kinetický průběh lipidové peroxidace. Při studiu lipidové peroxidace a poškození na modelu krysích ledvin vyvolaných nitriloacetátem železnatým bylo zjištěno, že k nejintenzivnější tvorbě karbonylových produktů dochází mezi první a 60. min působení (Qi *et al.*, 1999). Taktéž u krysích hepatocytů, v nichž byla lipidová peroxidace iniciována působením t-butyhydroperoxidu, došlo k nejvýraznější změně koncentrace MDA oproti kontrole v 60. min (Rees *et al.*, 1998). Na základě mikroskopického sledování buněk linií HeLa a SAS byl obdobně vizualizován výrazný nárůst imunofluorescence 4-HNE po 1 h působení (Tomita *et al.*, 2019).

Co se týče rozsahu detekovaných karbonylů, ve studii analyzující lipidovou peroxidaci u buněk tabáku *N. tabakum* Bright Yellow-2 (BY-2) vystavených působení  $\text{H}_2\text{O}_2$ , bylo detekováno několik karbonylů korespondujících s karbonyly v předkládané práci (MDA, acetaldehyd, 4-HNE, aceton) (Biswas a Mano, 2015). Nejvýraznější

podobnost však vykazuje práce věnující se studiu peroxidačního stresu buněk *in vitro* prostřednictvím detekce těkavých aldehydů v prostoru nad kultivačním médiem či nad 3D kulturami rakovinných buněk linie CALU-1 odvozené od nemalobuněčného karcinomu plic. Nepřímou elektrochemickou peroxidací lipidů byl v buňkách detekován MDA, butanal, valeraldehyd, hexanal a heptanal. Taktéž byla provedena kinetická analýza, přičemž nejvyšší nárůst koncentrace MDA, valeraldehydu a acetonu byl pozorován po 5 min působení (Shestivska *et al.*, 2017). V případě valeraldehydu byl v předkládané práci zjištěn podobný trend jako v diskutované práci, tedy nejvyšší nárůst byl 5 min po vystavení buněk peroxidaci a poté hladina valeraldehydu rapidně poklesla. V předkládané práci byly největší nárůsty signálu u MDA, acetaldehydu, acetonu a hexanalů pozorovány až po 60 min působení HO• na rakovinné buňky linie U937.

Při srovnání dostupných informací z literatury je možno konstatovat, že předkládaná práce jako jedna z mála studií prokazuje detekci acetaldehydu ve formě DNPH aduktu pomocí HPLC-MS a zároveň také MDA, 4-HNE a dalších karbonylů jako markerů lipidové peroxidace. Rozšíření pole simultánně detekovatelných karbonylových sloučenin pomocí jedné metody (HPLC) a jejich kvantifikace může přispět ke zpřesnění stanovované míry lipidové peroxidace v různých biologických vzorcích. V praxi je např. žádoucí popis míry oxidačního stresu prostřednictvím monitoringu hladin formaldehydu a MDA po ischemické reperfuzi srdce (Maboudou *et al.*, 2002). Zvýšená hladina MDA spolu s karbonylovými proteinovými adukty byla nalezena u pacientů s chronickou myeloidní leukemií a zvyšování hladin těchto analytů dokonce ukazuje na progresi onemocnění (Ahmad *et al.*, 2008). Existuje i studie navrhuující využití hexanalů jako markeru peroxidace mateřského mléka (Elisia a Kitts, 2011).

4-HNE je už asi dvě desítky let studovaný, nejdříve jako toxický produkt lipidové peroxidace, později jako signální molekula a spolehlivý marker lipidové peroxidace (Milkovic *et al.*, 2015). 4-HNE je atraktivním analytem pro klinické využití odhalujícím souvislosti mezi genomickou a proteomickou úrovní patologických stavů. Jelikož může být příčinou i markerem mnoha onemocnění jako např. Alzheimerova choroba (Di Domenico *et al.*, 2017), rakovina (Guéraud, 2017), je za využití moderních analytických metod žádoucí, aby byl klinicky stanovován. Z tohoto důvodu měla předkládaná práce za cíl stanovit právě 4-HNE a rozšířit tak paletu stanovovaných karbonylů vzniklých lipidovou peroxidací. Některé práce 4-HNE detekovaly a kvantifikovaly v potravinách a zvířecím krmivu (Douny *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016), některé v tkáňových kulturách, vzorcích tkání/krve pacientů (Gardner *et al.*, 2003; Zarkovic, 2003; Renner

*et al.*, 2005). V předkládané práci byl tento aldehyd detekován poprvé na modelu leukemických buněk linie U937 vystavených lipidové peroxidaci. Zároveň se povedlo detekovat další aldehydy jako např. MDA (Rác *et al.*, 2015), ale i aldehydy které ve studiích buněčné lipidové peroxidace nebývají typicky stanovovány např. formaldehyd, acetaldehyd (Tamura *et al.*, 1991). V předkládané práci byl současně poprvé studován i rozpad 4-HNE.

Přímé působení HO• nebylo u 4-HNE, ani obecně u 4-hydroxyalkenalů, ani 2-alkenalů, zatím studováno. Také není známo, jakým způsobem toto probíhá, i když reaktivní dvojná vazba nabízí v přítomnosti HO• možnost pro reakce (adice nebo abstrakce vodíku). V literatuře byl popsán pouze tepelný rozklad 2-alkenalů a 2,4-alkadienalů (Matthews *et al.*, 1971) v atmosféře vzduchu, která simuluje oxidační prostředí. Bylo zjištěno, že obě skupiny nenasyčených aldehydů se ve vodném prostředí pufru a za přítomnosti vzduchu rychle rozkládají za vzniku formaldehydu a acetaldehydu (což koresponduje s hlavními produkty rozpadu 4-HNE v předkládané práci). Dále byly po tepelném rozkladu detekovány i aldehydy dokládající štěpení dvojných vazeb C=C (propanal, glyoxal) (Zamora *et al.*, 2015). Studie detailně popisuje tepelný rozklad pent-2-enalu, který figuruje i v navrhovaném reakčním schématu (Obr. 20), při němž docházelo ke vzniku formaldehydu, acetaldehydu a glyoxalu, stejným produktům jako v navrhovaném schématu (Obr. 20) (Zamora *et al.*, 2015). Ačkoliv nelze přímo porovnávat působení HO• v předkládané práci a vzdušnou tepelnou oxidaci v literatuře, skutečnost, že dochází ke vzniku korespondujících produktů, podporuje dosud nepublikovanou schopnost HO• oxidačně štěpit 4-HNE i další alkenaly.

Na základě výsledků rozpadu 4-HNE v prostředí HO• v předkládané práci byl navržen mechanismus tohoto štěpení, jenž znázorňuje Obr. 20. Po odtržení vodíkového radikálu se přímo nebo po přeskupení tvoří peroxylový radikál. Tento se v přítomnosti Fe<sup>2+</sup> štěpí na alkoxylový radikál a dochází k rozštěpení uhlíkové vazby β-střihem. V reakcích navrhovaného rozkladu 4-HNE se působením HO• odštěpuje formaldehyd, dále kyselina mravenčí, glyoxal a nakonec acetaldehyd. Navrhovaný mechanismus štěpení 4-HNE vychází z mechanismu, který byl popsán u peroxidace lipidů Porterem a Pryorem v 90. letech (Pryor a Porter, 1990; Porter *et al.*, 1995).

Otázkou zůstává, zdali je samotné 4-HNE více škodlivé pro buňky, než vznikající formaldehyd (jenž je prokazatelně mutagenní (Yu *et al.*, 2015)), acetaldehyd (tvořící imunogenní adukty s MDA a podporující další peroxidaci (Weismann a Binder, 2012)) a glyoxal (také cytotoxický (Shangari a O'Brien, 2004)). Z tohoto důvodu by bylo





## 6 ZÁVĚR

V předkládané diplomové práci byla vypracována literární rešerše na téma lipidové peroxidace, produkce 4-HNE, jeho vlivu na buňky a zdraví. Dále byly vlastnosti 4-HNE porovnány s MDA.

Experimentální část diplomové práce se zabývala detekcí karbonylů pomocí HPLC/MS, k níž byla použita derivatizace DNPH. Na základě HPLC/MS analýzy komerčních standardů karbonylů, jejichž vznik lipidovou peroxidací byl předpokládán, byly zjištěny identifikační parametry jednotlivých karbonyl-DNPH aduktů. Tyto parametry byly poté použity k potvrzení přítomnosti karbonyl-DNPH aduktů ve vzorcích kyseliny linoleové a rakovinných buněk, které byly vystaveny lipidové peroxidaci vyvolané  $\text{HO}^\bullet$ . V předkládané práci byla sledována tvorba těchto karbonylů: MDA, acetaldehyd, formaldehyd, aceton, 4-HNE, valeraldehyd a hexanal. Všechny tyto karbonyly korespondují s literaturou zabývající se lipidovou peroxidací a jejími sekundárními produkty.

Následně byly připraveny vzorky kyseliny linoleové, v nichž byla prostřednictvím Fentonovy reakce produkující  $\text{HO}^\bullet$  vyvolána lipidová peroxidace. Prostřednictvím HPLC/MS analýzy byla v těchto vzorcích kineticky sledována tvorba karbonylů jakožto sekundárních produktů probíhající lipidové peroxidace. Ve vzorcích kyseliny linoleové ošetřených  $\text{HO}^\bullet$  byl oproti kontrolním vzorkům zjištěn nárůst MDA, formaldehydu, acetaldehydu, 4-HNE a hexanal (u MDA a hexanal bez statistické významnosti). V případě MDA a formaldehydu byl nárůst signálu okamžitý a s inkubačním časem konstantní, ale u acetaldehydu, 4-HNE a hexanal docházelo k jejich poklesu v čase. Množství acetaldehydu v ošetřených vzorcích kyseliny linoleové klesalo po celou sledovanou dobu, avšak i po 60 min inkubace byl v ošetřených vzorcích detekován statisticky významný rozdíl oproti kontrole. Hladina 4-HNE vykazovala nárůst ihned po ošetření vzorků, avšak již po 5 min došlo k jejímu poklesu na úroveň v  $\text{HO}^\bullet$  neošetřených vzorcích. Kinetická analýza sekundárních produktů peroxidace kyseliny linoleové vyvolané Fentonovou reakcí nebyla v literatuře popsána.

Kinetická analýza tvorby karbonylů lipidovou peroxidací byla provedena i v biologickém modelu, kterým byla linie rakovinných buněk U937. Po ošetření buněk  $\text{HO}^\bullet$  byl pozorován nárůst všech sledovaných karbonylů. Postupný nárůst signálu po celou inkubační dobu oproti kontrole byl zjištěn u MDA, formaldehydu a acetaldehydu. Množství acetonu vzrostlo signifikantně až po 15 min působení  $\text{HO}^\bullet$ .

V případě valeraldehydu byl nárůst v ošetřených vzorcích pozorován pouze v 5. min působení HO•, poté jeho hladina klesla pod úroveň ve vzorcích kontrolních. Množství 4-HNE narostlo v ošetřených buňkách oproti neošetřeným signifikantně až v 5. min působení HO•, a po zbytek sledované doby bylo konstantní. V literatuře nebyla podobná analýza popsána, ale vzniklé produkty odpovídají některým předchozím pracím (Shestivska *et al.*, 2017).

Na základě výsledku HPLC/MS analýzy vzorků kyseliny linoleové byl navržen experiment zkoumající stabilitu komerčního standardu 4-HNE v prostředí HO•, jež nebyla v literatuře dosud popsána. Již po 15 min byl u kontrolního vzorku 4-HNE pozorován pokles signálu jak na PDA, tak i QDa detektoru, což ukazuje jeho nestabilitu. Bylo zjištěno, že po vystavení standardu 4-HNE vlivu HO• dochází neprodleně k výraznému poklesu signálu 4-HNE, zatímco ihned po ošetření je pozorován mnohonásobný nárůst signálu formaldehydu a acetaldehydu. Z tohoto vyplývá, že 4-HNE je nestabilní a dochází k jeho rozkladu na jednoduché aldehydy a byl navržen i možný mechanismus jeho štěpení v prostředí HO•.

Data získaná v předkládané diplomové práci by mohla být dále využita pro budoucí studie průběhu lipidové peroxidace. Je ovšem nutné ještě optimalizovat detekci pomocí QDa, jež by měl teoreticky být oproti PDA detektoru citlivější, avšak v analyzovaných komplexních vzorcích toho nebylo dosaženo. Také by bylo přínosné karbonyly simultánně detekované v této práci kvantifikovat a zjistit, v jaké míře působí cytotoxicky. Detailnější výzkum by mohl být věnován i v této práci navrženému oxidačnímu rozpadu 4-HNE, jeho průběhu a produktům.

## 7 LITERATURA

- Ahmad R., Tripathi A. K., Tripathi P., Singh S., Singh R., Singh R. K. (2008): Malondialdehyde and protein carbonyl as biomarkers for oxidative stress and disease progression in patients with chronic myeloid leukemia. *In Vivo* **22**, 525-528.
- Alary J., Guéraud F., Cravedi J. - P. (2003): Fate of 4-hydroxynonenal *in vivo*: disposition and metabolic pathways. *Molecular Aspects of Medicine* **24**, 177-187.
- Aldini G., Gamberoni L., Orioli M., Beretta G., Regazzoni L., Maffei Facino R., Carini M. (2006): Mass spectrometric characterization of covalent modification of human serum albumin by 4-hydroxy-trans-2-nonenal. *Journal of Mass Spectrometry* **41**, 1149-1161.
- Argüelles S., García S., Maldonado M., Machado A., Ayala A. (2004): Do the serum oxidative stress biomarkers provide a reasonable index of the general oxidative stress status?. *Biochimica et Biophysica Acta: General Subjects* **1674**, 251-259.
- Argüelles S., Gómez A., Machado A., Ayala A. (2007): A preliminary analysis of within-subject variation in human serum oxidative stress parameters as a function of time. *Rejuvenation Research* **10**, 621-636.
- Argüelles S., Machado A., Ayala A. (2009): Adduct formation of 4-hydroxynonenal and malondialdehyde with elongation factor-2 *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine* **47**, 324-330.
- Ayala A., Muñoz M. F., Argüelles S. (2014): Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2014**:360438.  
<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2014/360438/>.
- Balogh L. M., Atkins W. M. (2011): Interactions of glutathione transferases with 4-hydroxynonenal. *Drug Metabolism Reviews* **43**, 165-178.
- Barrera G., Pizzimenti S., Daga M., Dianzani C., Arcaro A., Cetrangolo G. P., Giordano G., Cucci M. A., Graf M., Gentile F. (2018): Lipid Peroxidation-Derived Aldehydes, 4-Hydroxynonenal and Malondialdehyde in Aging-Related Disorders. *Antioxidants* **7**, pii: E102.  
<https://www.mdpi.com/2076-3921/7/8/102>
- Berdyshev E. V. (2011): Mass spectrometry of fatty aldehydes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1811**, 680-693.
- Bindoli A. (1988): Lipid peroxidation in mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine* **5**, 247-261.
- Biswas M. S., Mano J. (2015): Lipid Peroxide-Derived Short-Chain Carbonyls Mediate Hydrogen Peroxide-Induced and Salt-Induced Programmed Cell Death in Plants. *Plant Physiology* **168**, 885-898.
- Black W., Chen Y., Matsumoto A., Thompson D. C., Lassen N., Pappa A., Vasiliou V. (2012): Molecular mechanisms of ALDH3A1-mediated cellular protection against 4-hydroxy-2-nonenal. *Free Radical Biology and Medicine* **52**, 1937-1944.
- Bodera P., Stankiewicz W., Antkowiak B., Paluch M., Kieliszek J., Sobiech J., Niemcewicz M. (2015): Influence of electromagnetic field (1800 MHz) on lipid peroxidation in brain, blood, liver and kidney in rats. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* **28**, 751-759.
- Bochkov V. N., Oskolkova O. V., Birukov K. G., Levonen A. L., Binder C. J., Stöckl J. (2010): Generation and biological activities of oxidized phospholipids. *Antioxidants & Redox Signaling* **12**, 1009-1059.
- Brash A. R. (1999): Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 23679-23682.
- Brigelius-Flohé R., Maiorino M. (2013): Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1830**, 3289-3303.

- Burczynski M. E., Sridhar G. R., Palackal N. T., Penning T. M. (2001): The reactive oxygen species-and Michael acceptor-inducible human aldo-keto reductase AKR1C1 reduces the alpha,beta-unsaturated aldehyde 4-hydroxy-2-nonenal to 1,4-dihydroxy-2-nonenone. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 2890-2897.
- Busch C. J., Binder C. J. (2017): Malondialdehyde epitopes as mediators of sterile inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids* **1862**, 398-406.
- Cagle B. S., Crawford R. A., Doorn J. A. (2019): Biogenic Aldehyde-Mediated Mechanisms of Toxicity in Neurodegenerative Disease. *Current Opinion in Toxicology* **13**, 16-21.
- Capdevila J. H., Falck J. R., Harris R. C. (2000): Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation: molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. *Journal of Lipid Research* **41**, 163-181.
- Carbone D. L., Doorn J. A., Kiebler Z., Petersen D. R. (2005): Cysteine modification by lipid peroxidation products inhibits protein disulfide isomerase. *Chemical Research in Toxicology* **18**, 1324-1331.
- Carini M., Aldini G., Facino R. M. (2004): Mass spectrometry for detection of 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE) adducts with peptides and proteins. *Mass Spectrometry Reviews* **23**, 281-305.
- Conrad M., Pratt D. A. (2019): The chemical basis of ferroptosis. *Nature Chemical Biology* **15**, 1137-1147.
- Csala M., Kardon T., Legeza B., Lizák B., Mandl J., Margittai É., Puskás F., Száraz P., Szelényi P., Bánhegyi G. (2015): On the role of 4-hydroxynonenal in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta* **1852**, 826-838.
- Culbertson S. M., Porter N. A. (2000): Unsymmetrical Azo Initiators Increase Efficiency of Radical Generation in Aqueous Dispersions, Liposomal Membranes, and Lipoproteins. *Journal of the American Chemical Society* **122**, 4032-4038.
- Curzio M., Torrielli M. V., Giroud J. P., Esterbauer H., Dianzani M. U. (1982): Neutrophil chemotactic responses to aldehydes. *Research communications in chemical pathology and pharmacology* **36**, 463-476.
- D'Souza A., Kurien B. T., Rodgers R., Shenoj J., Kurono S., Matsumoto H., Hensley K., Nath S. K., Scofield R. H. (2008): Detection of catalase as a major protein target of the lipid peroxidation product 4-HNE and the lack of its genetic association as a risk factor in SLE. *BMC Medical Genetics* **9**:62.  
<https://bmcmmedgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2350-9-62>
- Dalleau S., Baradat M., Guéraud F., Huc L. (2013): Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death and Differentiation* **20**, 1615-1630.
- Davies M. J. (2003): Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **305**, 761-770.
- Deng Y., Theken K. N., Lee C. R. (2010): Cytochrome P450 epoxygenases, soluble epoxide hydrolase, and the regulation of cardiovascular inflammation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **48**, 331-341.
- Devos D., Moreau C., Devedjian J. C., Kluza J., Petrault M., Laloux C., Jonneaux A., Ryckewaert G., Garçon G., Rouaix N., Duhamel A., Jissendi P., Dujardin K., Auger F., Ravasi L., Hopes L., Grolez G., Firdaus W., Sablonnière B., Strubi-Vuillaume I., Zahr N., Destée A., Corvol J. C., Pörtl D., Leist M., Rose C., Defebvre L., Marchetti P., Cabantchik Z. I., Bordet R. (2014): Targeting chelatable iron as a therapeutic modality in Parkinson's disease. *Antioxidants & Redox Signaling* **21**, 195-210.
- Di Domenico F., Tramutola A., Butterfield D. A. (2017): Role of 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in the pathogenesis of alzheimer disease and other selected age-related neurodegenerative disorders. *Free Radical Biology and Medicine* **111**, 253-261.
- Doorn J. A., Petersen D. R. (2002): Covalent modification of amino acid nucleophiles by the lipid peroxidation products 4-hydroxy-2-nonenal and 4-oxo-2-nonenal. *Chemical Research in Toxicology* **15**, 1445-1450.

- Douny C., Bayram P., Brose F., Degand G., Scippo M. L. (2016): Development of an LC-MS/MS analytical method for the simultaneous measurement of aldehydes from polyunsaturated fatty acids degradation in animal feed. *Drug Testing and Analysis* **8**, 458-464.
- Duncker D. J., Bache R. J. (2008): Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiological Reviews* **88**, 1009-1086.
- Eaton P., Li J. M., Hearse D. J., Shattock M. J. (1999): Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in ischemic rat heart. *The American Journal of Physiology* **276**, 935-943.
- Eckl P. M. (2003): Genotoxicity of HNE. *Molecular Aspects of Medicine* **24**, 161-165.
- Elisia I., Kitts D. D. (2011): Quantification of hexanal as an index of lipid oxidation in human milk and association with antioxidant components. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **49**, 147-152.
- Eliuk S. M., Renfrow M. B., Shonsey E. M., Barnes S., Kim H. (2007): Active site modifications of the brain isoform of creatine kinase by 4-hydroxy-2-nonenal correlate with reduced enzyme activity: mapping of modified sites by Fourier transform-ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology* **20**, 1260-1268.
- Esterbauer H., Zollner H., Scholz N. (1975): Reaction of glutathione with conjugated carbonyls. *Zeitschrift für Naturforschung. Section C, Biosciences* **30**, 466-473.
- Esterbauer H., Cheeseman K. H., Dianzani M. U., Poli G., Slater T. F. (1982): Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe<sup>2+</sup> in rat liver microsomes. *The Biochemical Journal* **208**, 129-140.
- Esterbauer H., Lang J., Zdravec S., Slater T. F. (1984): Detection of malonaldehyde by high-performance liquid chromatography. *Methods in Enzymology* **105**, 319-328.
- Esterbauer H., Koller E., Snee R. G., Koster J. F. (1986): Possible involvement of the lipid-peroxidation product 4-hydroxynonenal in the formation of fluorescent chromolipids. *The Biochemical Journal* **239**, 405-409.
- Esterbauer H., Zollner H. (1989): Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products. *Free Radical Biology and Medicine* **7**, 197-203.
- Esterbauer H., Cheeseman K. H. (1990): Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology* **186**, 407-421.
- Esterbauer H., Schaur R. J., Zollner H. (1991): Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine* **11**, 81-128.
- Feng H., Stockwell B. R. (2018): Unsolved mysteries: How does lipid peroxidation cause ferroptosis? *PLoS Biology* **16**(5):e2006203.  
<https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.2006203>
- Feng Q., Kumagai T., Torii Y., Nakamura Y., Osawa T., Uchida K. (2001): Anticarcinogenic antioxidants as inhibitors against intracellular oxidative stress. *Free Radical Research* **35**, 779-788.
- Feng Z., Hu W., Tang M. S. (2004): Trans-4-hydroxy-2-nonenal inhibits nucleotide excision repair in human cells: a possible mechanism for lipid peroxidation-induced carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 8598-8602.
- Ferretti U., Ciura J., Ksas B., Rác M., Sedlářová M., Kruk J., Havaux M., Pospíšil P. (2018): Chemical quenching of singlet oxygen by plastoquinols and their oxidation products in Arabidopsis. *The Plant Journal* **95**, 848-861.
- Feussner I., Wasternack C. (2002): The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 275-297.
- Fleurbaey-Morel P., Barrier L., Fauconneau B., Piriou A., Huguet F. (1999): Origin of 4-hydroxynonenal incubation-induced inhibition of dopamine transporter and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> adenosine triphosphate in rat striatal synaptosomes. *Neuroscience Letters* **277**, 91-94.
- Frankel E. N., Neff W. E., Selke E. (1981): Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry: VII. Volatile thermal decomposition products of pure hydroperoxides from autoxidized and photosensitized oxidized methyl oleate, linoleate and linolenate. *Lipids* **16**, 279-285.

- Frankel E. N., Neff W. E., Selke E., Weisleder D. (1982): Photosensitized oxidation of methyl linoleate: Secondary and volatile thermal decomposition products. *Lipids* **17**, 11–18.
- Fruhwrith G. O., Loidl A., Hermetter A. (2007): Oxidized phospholipids: from molecular properties to disease. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Basis of Disease* **1772**, 718–736.
- Gardner H. W. (1989): Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biology and Medicine* **7**, 65–86.
- Gardner H. W., Hamberg M. (1993): Oxygenation of (3Z)-nonenal to (2E)-4-hydroxy-2-nonenal in the broad bean (*Vicia faba L.*). *Journal of Biological Chemistry* **268**, 6971–6977.
- Gardner A., Johansson A., Wibom R., Nennesmo I., von Döbeln U., Hagenfeldt L., Hällström T. (2003): Alterations of mitochondrial function and correlations with personality traits in selected major depressive disorder patients. *Journal of Affective Disorders* **76**, 55–68.
- Geçotek A., Skrzydlewska E. (2019): Biological effect of protein modifications by lipid peroxidation products. *Chemistry and Physics of Lipids* **221**, 46–52.
- Giera M., Lingeman H., Niessen W. M. A. (2012): Recent advancements in the LC- and GC-based analysis of malondialdehyde (MDA): a brief overview. *Chromatographia* **75**, 433–440.
- Gieseg S., Duggan S., Gebicki J. M. (2000): Peroxidation of proteins before lipids in U937 cells exposed to peroxy radicals. *Biochemical Journal* **350**, 215–218.
- Gioacchini A. M., Calonghi N., Boga C., Cappadone C., Masotti L., Roda A., Traldi P. (1999): Determination of 4-hydroxy-2-nonenal at cellular levels by means of electrospray mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **13**, 1573–1579.
- Girotti A. W. (1998): Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipid Research* **39**, 1529–1542.
- Gomes K. M., Campos J. C., Bechara L. R., Queliconi B., Lima V. M., Disatnik M.H., Magno P., Chen C. H., Brum P. C., Kowaltowski A. J., Mochly-Rosen D., Ferreira J. C. (2014): Aldehyde dehydrogenase 2 activation in heart failure restores mitochondrial function and improves ventricular function and remodelling. *Cardiovascular Research* **103**, 498–508.
- Gonen A., Hansen L. F., Turner W. W., Montano E. N., Que X., Rafia A., Chou M. Y., Wiesner P., Tsiantoulas D., Corr M., Van Nieuwenhze M. S., Tsimikas S., Binder C. J., Witztum J. L., Hartvigsen K. (2014): Atheroprotective immunization with malondialdehyde-modified LDL is hapten specific and dependent on advanced MDA adducts: implications for development of an atheroprotective vaccine. *Journal of Lipid Research* **55**, 2137–2155.
- Grootveld M., Atherton M. D., Sheerin A. N., Hawkes J., Blake D. R., Richens T. E., Silwood C. J., Lynch E., Claxson A. W. (1998): *In vivo* absorption, metabolism, and urinary excretion of alpha,beta-unsaturated aldehydes in experimental animals. Relevance to the development of cardiovascular diseases by the dietary ingestion of thermally stressed polyunsaturate-rich culinary oils. *The Journal of Clinical Investigation* **101**, 1210–1218.
- Gros L., Ishchenko A. A., Saparbaev M. (2003): Enzymology of repair of etheno-adducts. *Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **531**, 219–229.
- Guéraud F., Atalay M., Bresgen N., Cipak A., Eckl P. M., Huc L., Jouanin I., Siems W., Uchida K. (2010): Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radical Research* **44**, 1098–1124.
- Guéraud F. (2017): 4-Hydroxynonenal metabolites and adducts in pre-carcinogenic conditions and cancer. *Free Radical Biology and Medicine* **111**, 196–208.
- Halliwell B., Gutteridge J. (2007): *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed., Oxford University Press, New York, U.S.A., 888 stran.
- Hartley D. P., Kroll D. J., Petersen D. R. (1997): Prooxidant-initiated lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes: detection of 4-hydroxynonenal- and malondialdehyde-protein adducts. *Chemical Research in Toxicology* **10**, 895–905.
- Hashimoto M., Sibata T., Wasada H., Toyokuni S., Uchida K. (2003): Structural basis of protein-bound endogenous aldehydes. Chemical and immunochemical characterizations of configurational isomers of a 4-hydroxy-2-nonenal-histidine adduct. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 5044–5051.

- Hu W., Feng Z., Eveleigh J., Iyer G., Pan J., Amin S., Chung F. L., Tang M. S. (2002): The major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, preferentially forms DNA adducts at codon 249 of human p53 gene, a unique mutational hotspot in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* **23**, 1781-1789.
- Chen Q., Esterbauer H., Jürgens G. (1992): Studies on epitopes on low-density lipoprotein modified by 4-hydroxynonenal. Biochemical characterization and determination. *The Biochemical Journal* **288**, 249-254.
- Cheng J., Wang F., Yu D. F., Wu P. F., Chen J. G. (2011): The cytotoxic mechanism of malondialdehyde and protective effect of carnosine via protein cross-linking/mitochondrial dysfunction/reactive oxygen species/MAPK pathway in neurons. *European Journal of Pharmacology* **650**, 184-194.
- Choudhury S., Pan J., Amin S., Chung F. - L., Roy R. (2004): Repair kinetics of trans-4-Hydroxynonenal-induced cyclic 1,N<sup>2</sup>-propanodeoxyguanine DNA adducts by human cell nuclear extracts. *Biochemistry* **43**, 7514-7521.
- Isom A. L., Barnes S., Wilson L., Kirk M., Coward L., Darley-Usmar V. (2004): Modification of Cytochrome c by 4-hydroxy- 2-nonenal: evidence for histidine, lysine, and arginine-aldehyde adducts. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **15**, 1136-1147.
- Itakura K., Oya-Ito T., Osawa T., Yamada S., Toyokuni S., Shibata N., Kobayashi M., Uchida K. (2000): Detection of lipofuscin-like fluorophore in oxidized human low-density lipoprotein. 4-hydroxy-2-nonenal as a potential source of fluorescent chromophore. *FEBS Letters* **473**, 249-253.
- Ivanov I., Heydeck D., Hofheinz K., Roffeis J., O'Donnell V. B., Kuhn H., Walther M. (2010): Molecular enzymology of lipoxygenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **503**, 161-174.
- Kaikkonen J., Tuomainen T. P., Nyyssönen K., Morrow J. D., Salonen J. T (2004): C18 hydroxy fatty acids as markers of lipid peroxidation *ex vivo* and *in vivo*. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* **64**, 457-468.
- Kansanen E., Kuosmanen S. M., Leinonen H., Levonen A. L. (2013): The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biology* **1**, 45-49.
- Kinnunen P. K. J., Kaarniranta K., Mahalka A. K. (2012): Protein-oxidized phospholipid interactions in cellular signaling for cell death: from biophysics to clinical correlations. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1818**, 2446-2455.
- Klil-Drori A. J., Ariel A. (2013): 15-Lipoxygenases in cancer: a double-edged sword? *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* **106**, 16-22.
- Kong D., Kotraiah V. (2012): Modulation of aldehyde dehydrogenase activity affects (±)-4-hydroxy-2E-nonenal (HNE) toxicity and HNE-protein adduct levels in PC12 cells. *Journal of Molecular Neuroscience* **47**, 595-603.
- Kuehl F. A. Jr., Egan R. W. (1980): Prostaglandins, arachidonic acid, and inflammation. *Science* **210**, 978-984.
- Kumar B., Koul S., Khandrika L., Meacham R. B., Koul H. K. (2008): Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. *Cancer Research* **68**, 1777-1785.
- Lee J., Kosaras B., Del Signore S. J., Cormier K., McKee A., Ratan R. R., Kowall N. W., Ryu H. (2011): Modulation of lipid peroxidation and mitochondrial function improves neuropathology in Huntington's disease mice. *Acta Neuropathologica* **121**, 487-498.
- Li C. J., Nanji A. A., Siakotos A. N., Lin R. C. (1997): Acetaldehyde-modified and 4-hydroxynonenal-modified proteins in the livers of rats with alcoholic liver disease. *Hepatology* **26**, 650-657.
- Liu Z., Minkler P. E., Sayre L. M. (2003): Mass spectroscopic characterization of protein modification by 4-hydroxy-2-(E)-nonenal and 4-oxo-2-(E)-nonenal. *Chemical Research in Toxicology* **16**, 901-911.
- Loidl-Stahlhofen A., Hannemann K., Spiteller G. (1994): Generation of alpha-hydroxyaldehydic compounds in the course of lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1213**, 140-148.



- Maboudou P., Mathieu D., Bachelet H., Wiart J. F., Lhermitte M. (2002): Detection of oxidative stress. Interest of GC-MS for malondialdehyde and formaldehyde monitoring. *Biomedical Chromatography* **16**, 199-202.
- Mali V. R., Palaniyandi S. S. (2014): Regulation and therapeutic strategies of 4-hydroxy-2-nonenal metabolism in heart disease. *Free Radical Research* **48**, 251-263.
- Marnett L. J., Rowlinson S. W., Goodwin D. C., Kalgutkar A. S., Lanzo C. A. (1999): Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 22903-22906.
- Marra F., DeFranco R., Grappone C., Parola M., Milani S., Leonarduzzi G., Pastacaldi S., Wenzel U. O., Pinzani M., Dianzani M. U., Laffi G., Gentilini P. (1999): Expression of monocyte chemotactic protein-1 precedes monocyte recruitment in a rat model of acute liver injury, and is modulated by vitamin E. *Journal of Investigative Medicine* **47**, 66-75.
- Matthews R. F., Scanlan R. A., Libbey L. M. (1971): Autoxidation products of 2,4-decadienal. *Journal of the American Oil Chemists Society* **48**, 745-747.
- McElhanon K. E., Bose C., Sharma R., Wu L., Awasthi Y. C., Singh S. P. (2013): *Gsta4* null mouse embryonic fibroblasts exhibit enhanced sensitivity to oxidants: role of 4-hydroxynonenal in oxidant toxicity. *Open Journal of Apoptosis* **2**(1).  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3864047/>
- Mehta K., Patel V. B. (2019): Measurement of 4-Hydroxynonenal (4-HNE) Protein Adducts by ELISA. *Methods in Molecular Biology* **1990**, 43-52.
- Méndez D., Hernáez M. L., Kamali A. N., Díez A., Puyet A., Bautista J. M. (2012): Differential carbonylation of cytoskeletal proteins in blood group O erythrocytes: potential role in protection against severe malaria. *Infection, Genetics and Evolution* **12**, 1780-1787.
- Milkovic L., Cipak Gasparovic A., Zarkovic N. (2015): Overview on major lipid peroxidation bioactive factor 4-hydroxynonenal as pluripotent growth-regulating factor. *Free Radical Research* **49**, 850-860.
- Minko I. G., Kozekov I. D., Harris T. M., Rizzo C. J., Lloyd R. S., Stone M. P. (2009): Chemistry and biology of DNA containing 1,N2-deoxyguanosine adducts of the  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes acrolein, crotonaldehyde, and 4-hydroxynonenal. *Chemical Research in Toxicology* **22**, 759-778.
- Miyamoto S., Ronsein G. E., Prado F. M., Uemi M., Corrêa T. C., Toma I. N., Bertolucci A., Oliveira M. C., Motta F. D., Medeiros M. H., Mascio P. D. (2007): Biological hydroperoxides and singlet molecular oxygen generation. *IUBMB Life* **59**, 322-331.
- Muller C., Bandemer J., Vindis C., Camaré C., Mucher E., Guéraud F., Larroque-Cardoso P., Bernis C., Auge N., Salvayre R., Negre-Salvayre A. (2013): Protein disulfide isomerase modification and inhibition contribute to ER stress and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins. *Antioxidants and Redox Signaling* **18**, 731-742.
- Munukutla S., Pan G., Palaniyandi S. S. (2019): Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) 2 in Diabetic Heart Diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1193**, 155-174.
- Nadkarni D. V., Sayre L. M. (1995): Structural definition of early lysine and histidine adduction chemistry of 4-hydroxynonenal. *Chemical Research in Toxicology* **8**, 284-291.
- Nair J., Barbin A., Velic I., Bartsch H. (1999): Etheno DNA-base adducts from endogenous reactive species. *Mutation Research* **424**, 59-69.
- Nair J., Gansauge F., Beger H., Dolara P., Winde G., Bartsch H. (2006): Increased etheno-DNA adducts in affected tissues of patients suffering from Crohn's disease, ulcerative colitis, and chronic pancreatitis. *Antioxidants and Redox Signaling* **8**, 1003-1010.
- Nair J., Srivatanakul P., Haas C., Jedpiyawongse A., Khuhaprema T., Seitz H. K., Bartsch H. (2010): High urinary excretion of lipid peroxidation-derived DNA damage in patients with cancer-prone liver diseases. *Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **683**, 23-28.
- Nakamura J., Shimomoto T., Collins L. B., Holley D. W., Zhang Z., Barbee J. M., Sharma V., Tian X., Kondo T., Uchida K., Yi X., Perkins D. O., Willis M. S., Gold A., Bultman S. J. (2017): Evidence that endogenous formaldehyde produces immunogenic and atherogenic adduct epitopes. *Scientific Reports* **7**(1):10787.  
<https://www.nature.com/articles/s41598-017-11289-8>

- Nègre-Salvayre A., Coatrieux C., Ingueneau C., Salvayre R. (2008): Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *British Journal of Pharmacology* **153**, 6–20.
- Nègre-Salvayre A., Garoby-Salom S., Swiader A., Rouahi M., Pucelle M., Salvayre R. (2017): Proatherogenic effects of 4-hydroxynonenal. *Free Radical Biology and Medicine* **111**, 127–139.
- Nikkari T., Malo-Ranta U., Hiltunen T., Jaakkola O., Yld-Herttuala S. (1995): Monitoring of lipoprotein oxidation by gas chromatographic analysis of hydroxy fatty acids. *Journal of Lipid Research* **36**, 200–207.
- Page S., Fischer C., Baumgartner B., Haas M., Kreusel U., Loidl G., Hayn M., Ziegler-Heitbrock H. W., Neumeier D., Brand K. (1999): 4-Hydroxynonenal prevents NF-kappaB activation and tumor necrosis factor expression by inhibiting IkappaB phosphorylation and subsequent proteolysis. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 11611–11618.
- Palinski W., Ylä-Herttuala S., Rosenfeld M. E., Butler S. W., Socher S. A., Parthasarathy S., Curtiss L. K., Witztum J. L. (1990): Antisera and monoclonal antibodies specific for epitopes generated during oxidative modification of low density lipoprotein. *Arteriosclerosis* **10**, 325–335.
- Parola M., Robino G., Marra F., Pinzani M., Bellomo G., Leonarduzzi G., Chiarugi P., Camandola S., Poli G., Waeg G., Gentilini P., Dianzani M. U. (1998): HNE interacts directly with JNK isoforms in human hepatic stellate cells. *The Journal of Clinical Investigation* **102**, 1942–1950.
- Parola M., Robino G. (2001): Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *Journal of Hepatology* **35**, 297–306.
- Penke B., Paragi G., Gera J., Berkecz R., Kovács Z., Crul T., Vigh L. (2018): The Role of Lipids and Membranes in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: A Comprehensive View. *Current Alzheimer Research* **15**, 1191–1212.
- Pizzimenti S., Barrera G., Dianzani M. U., Brüsselbach S. (1999): Inhibition of D1, D2, and A-cyclin expression in HL-60 cells by the lipid peroxydation product 4-hydroxynonenal. *Free Radical Biology and Medicine* **26**, 1578–1586.
- Poli G., Schaur R. J. (2000): 4-Hydroxynonenal in the pathomechanisms of oxidative stress. *IUBMB Life* **50**, 315–321.
- Porter N. A., Caldwell S. E., Mills K. A. (1995): Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* **30**, 277–290.
- Pospíšil P., Yamamoto Y. (2017): Damage to photosystem II by lipid peroxidation products. *Biochimica et Biophysica Acta: General Subjects* **1861**, 457–466.
- Praticò D., Sung S. (2004): Lipid peroxidation and oxidative imbalance: early functional events in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease* **6**, 171–175.
- Pryor W. A., Stanley J. P., Blair E. (1976): Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids* **11**, 370–379.
- Pryor W. A. (1989): On the detection of lipid hydroperoxides in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine* **7**, 177–178.
- 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.
- PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (12. 3. 2020)
- Qi W., Reiter R. J., Tan D. X., Manchester L. C., Kim S. J., Garcia J. J. (1999): Inhibitory effects of melatonin on ferric nitrilotriacetate-induced lipid peroxidation and oxidative DNA damage in the rat kidney. *Toxicology* **139**, 81–91.
- Rác M., Křupka M., Binder S., Sedlářová M., Matušková Z., Raška M., Pospíšil P. (2015): Oxidative damage of U937 human leukemic cells caused by hydroxyl radical results in singlet oxygen formation. *PLoS One* **10**:e0116958.  
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0116958>.

- Rauniyar N., Prokai L. (2009): Detection and identification of 4-hydroxy-2-nonenal Schiff-base adducts along with products of Michael addition using data-dependent neutral loss-driven MS3 acquisition: method evaluation through an *in vitro* study on cytochrome c oxidase modifications. *Proteomics* **9**, 5188-5193.
- Rauniyar N., Prokai L. (2011): Isotope-coded dimethyl tagging for differential quantification of posttranslational protein carbonylation by 4-hydroxy-2-nonenal, an end-product of lipid peroxidation. *Journal of Mass Spectrometry* **46**, 976-985.
- Reed T., Perluigi M., Sultana R., Pierce W. M., Klein J. B., Turner D. M., Coccia R., Markesbery W. R., Butterfield D. A. (2008) Redox proteomic identification of 4-hydroxy-2-nonenal-modified brain proteins in amnesic mild cognitive impairment: insight into the role of lipid peroxidation in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* **30**, 107-120.
- Reed T. T., Pierce W. M., Markesbery W. R., Butterfield D. A. (2009): Proteomic identification of HNE-bound proteins in early Alzheimer disease: Insights into the role of lipid peroxidation in the progression of AD. *Brain Research* **1274**, 66-76.
- Rees J. F., de Wergifosse B., Noiset O., Dubuisson M., Janssens B., Thompson E. M. (1998): The origins of marine bioluminescence: turning oxygen defence mechanisms into deep-sea communication tools. *Journal of Experimental Biology* **201**, 1211-1221.
- Renner A., Sagstetter M. R., Harms H., Lange V., Götz M. E., Elert O. (2005): Formation of 4-hydroxy-2-nonenal protein adducts in the ischemic rat heart after transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **24**, 730-736.
- Rossi M. A., Di Mauro C., Dianzani M. U. (1993): Action of lipid peroxidation products on phosphoinositide specific phospholipase C. *Molecular Aspects of Medicine* **14**, 273-279.
- Sanders G. S., Gallup G. G., Heinsen H., Hof P. R., Schmitz C. (2002): Cognitive deficits, schizophrenia, and the anterior cingulate cortex. *Trends in Cognitive Sciences* **6**, 190-192.
- Satoh K., Yamada S., Koike Y., Igarashi Y., Toyokuni S., Kumano T., Takahata T., Hayakari M., Tsuchida S., Uchida K. (1999): A 1-hour enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of acrolein- and hydroxynonenal-modified proteins by epitope-bound casein matrix method. *Analytical Biochemistry* **270**, 323-328.
- Sayre L. M., Lin D., Yuan Q., Zhu X., Tang X. (2006): Protein adducts generated from products of lipid oxidation: focus on HNE and ONE. *Drug Metabolism Reviews* **38**, 651-675.
- Selley M. L. (1997): Determination of the lipid peroxidation product (E)-4-hydroxy-2-nonenal in clinical samples by gas chromatography--negative-ion chemical ionisation mass spectrometry of the O-pentafluorobenzyl oxime. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications* **691**, 263-268.
- Shangari N., O'Brien P. J. (2004): The cytotoxic mechanism of glyoxal involves oxidative stress. *Biochemical Pharmacology* **68**, 1433-1442.
- Shestivska V., Rutter A. V., Sulé-Suso J., Smith D., Španěl P. (2017): Evaluation of peroxidative stress of cancer cells *in vitro* by real-time quantification of volatile aldehydes in culture headspace. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **31**, 1344-1352.
- Schafer F. Q., Buettner G. R. (1999): Singlet oxygen toxicity is cell line-dependent: a study of lipid peroxidation in nine leukemia cell lines. *Photochemistry and Photobiology* **70**, 858-867.
- Schaur R. J., Dussing G., Kink E., Schauenstein E., Posch W., Kukovetz E., Egger G. (1994): The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal is formed by-and is able to attract-rat neutrophils *in vivo*. *Free Radical Research* **20**, 365-373.
- Schaur R.J. (2003): Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Molecular Aspects of Medicine* **24**, 149-159.
- Schneider C., Tallman K. A., Porter N. A., Brash A. R. (2001): Two distinct pathways of formation of 4-hydroxynonenal. Mechanisms of nonenzymatic transformation of the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic acid to 4-hydroxyalkenals. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 20831-20838.
- Schneider C., Pratt D. A., Porter N. A., Brash A. R. (2007): Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis. *Chemistry and Biology* **14**, 473-488.

- Siems W., Grune T. (2003): Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal. *Molecular Aspects of Medicine* **24**,167-175.
- Smith W. L., Murphy R. C. (2002): The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxygenase pathways. In: *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. 4th ed. (Vance D. E., Vance J. E., eds.), Elsevier Science, Amsterdam, Netherlands, 341-371.
- Spector A. A., Fang X., Snyder G. D., Weintraub N. L. (2004): Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Progress in Lipid Research* **43**, 55-90.
- Spickett C. M. (2013): The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: Advances in chemistry and analysis. *Redox Biology* **1**, 145-52.
- Stadtman E. R., Berlett B. S. (1997): Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chemical Research in Toxicology* **10**, 485-494.
- Steinbrecher U. P., Fisher M., Witztum J. L., Curtiss L. K. (1984): Immunogenicity of homologous low density lipoprotein after methylation, ethylation, acetylation, or carbamylation: generation of antibodies specific for derivatized lysine. *Journal of Lipid Research* **25**, 1109-1116.
- Steinbrenner H., Sies H. (2009): Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta: General Subjects* **1790**, 1478–1485.
- Suarna C., Dean R. T., Southwell-Keeley P. T., Moore D. E., Stocker R. (1997): Separation and characterization of cholesteryl oxo- and hydroxy-linoleate isolated from human atherosclerotic plaque. *Free Radical Research* **27**, 397–408.
- Subramaniam R., Roediger F., Jordan B., Mattson M. P., Keller J. N., Waeg G., Butterfield D. A. (1997): The lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-trans-nonenal, alters the conformation of cortical synaptosomal membrane proteins. *Journal of Neurochemistry* **69**, 1161-1169.
- Suzuki T., Takemura H., Noiri E., Nosaka K., Toda A., Taniguchi S., Uchida K., Fujita T., Kimura S., Nakao A. (2001): Puromycin aminonucleoside induces apoptosis and increases HNE in cultured glomerular epithelial cells. *Free Radical Biology and Medicine* **31**, 615-623.
- Tamura H., Kitta K., Shibamoto T. (1991): Formation of reactive aldehydes from fatty acids in a Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **39**, 439-442.
- Takamura H., Gardner H. W. (1996): Oxygenation of (3Z)-alkenal to (2E)-4-hydroxy-2-alkenal in soybean seed (*Glycine max L.*). *Biochimica et Biophysica Acta* **1303**, 83-91.
- The Human Metabolome Database: <https://hmdb.ca/> (12. 3. 2020)
- Tomita K., Takashi Y., Ouchi Y., Kuwahara Y., Igarashi K., Nagasawa T., Nabika H., Kurimasa A., Fukumoto M., Nishitani Y., Sato T. (2019): Lipid peroxidation increases hydrogen peroxide permeability leading to cell death in cancer cell lines that lack mtDNA. *Cancer Science* **110**, 2856-2866.
- Tsai L., Szweda P. A., Vinogradova O., Szweda L. I. (1998): Structural characterization and immunochemical detection of a fluorophore derived from 4-hydroxy-2-nonenal and lysine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 7975-7980.
- Tsao S. M., Yin M. C., Liu W. H. (2007): Oxidant stress and B vitamins status in patients with non-small cell lung cancer. *Nutrition and Cancer* **59**, 8-13.
- Tsikas D., Rothmann S., Schneider J. Y., Gutzki F. M., Beckmann B., Frölich J. C. (2017): Simultaneous GC-MS/MS measurement of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal in human plasma: Effects of long-term L-arginine administration. *Analytical Biochemistry* **524**, 31-44.
- Uchida K., Stadtman E. R. (1992): Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 4544–4548.
- Uchida K., Szweda L. I., Chae H. Z., Stadtman E. R. (1993): Immunochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in oxidized hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 8742-8746.

- Uchida K., Osawa T., Hiai H., Toyokuni S. (1995): 4-Hydroxy-2-nonenal-trapping ELISA: direct evidence for the release of a cytotoxic aldehyde from oxidized low density lipoproteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **212**, 1068-1073.
- Uchida K., Shiraishi M., Naito Y., Torii Y., Nakamura Y., Osawa T. (1999): Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 2234-2242.
- Uchida K. (2003): 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Progress in Lipid Research* **42**, 318-343.
- US Public Health Service: [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1593.2.aspx?geo\\_country=cz&fbclid=IwAR1-U9vp6-Md0lgbXYyMZb8K0EIqSlreOsJpur6hn91uIn1G8OZl8GShKBk#generalinformation](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1593.2.aspx?geo_country=cz&fbclid=IwAR1-U9vp6-Md0lgbXYyMZb8K0EIqSlreOsJpur6hn91uIn1G8OZl8GShKBk#generalinformation) (6. 2. 2020)
- Valentine J. S. (2002): Do oxidatively modified proteins cause ALS? *Free Radical Biology and Medicine* **33**, 1314-1320.
- van Kuijk F. J., Siakotos A. N., Fong L. G., Stephens R. J., Thomas D. W. (1995): Quantitative measurement of 4-hydroxyalkenals in oxidized low-density lipoprotein by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **224**, 420-424.
- Viita H., Pacholska A., Ahmad F., Tietäväinen J., Naarala J., Hyvärinen A., Wirth T., Ylä-Herttuala S. (2012): 15-Lipoxygenase-1 induces lipid peroxidation and apoptosis, and improves survival in rat malignant glioma. *In Vivo* **26**, 1-8.
- Wang L., Csallany A. S., Kerr B. J., Shurson G. C., Chen C. (2016): Kinetics of Forming Aldehydes in Frying Oils and Their Distribution in French Fries Revealed by LC-MS-Based Chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **64**, 3881-3889.
- Wang G., Wang J., Fan X., Ansari G. A., Khan M. F. (2012): Protein adducts of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal contribute to trichloroethene-mediated autoimmunity via activating Th17 cells: dose- and time-response studies in female MRL+/+ mice. *Toxicology* **292**, 113-122.
- Weismann D., Binder C. J. (2012): The innate immune response to products of phospholipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes* **1818**, 2465-2475.
- Wilson R., Smith R., Wilson P., Shepherd M. J., Riemersma R. A. (1997): Quantitative gas chromatography-mass spectrometry isomer-specific measurement of hydroxy fatty acids in biological samples and food as a marker of lipid peroxidation. *Analytical Biochemistry* **248**, 76-85.
- Xiang W., Schlachetzki J. C., Helling S., Bussmann J. C., Berlinghof M., Schäffer T. E., Marcus K., Winkler J., Klucken J., Becker C. M. (2013): Oxidative stress-induced posttranslational modifications of alpha-synuclein: specific modification of alpha-synuclein by 4-hydroxy-2-nonenal increases dopaminergic toxicity. *Molecular and Cellular Neuroscience* **54**, 71-83.
- Yamada T., Place N., Kosterina N., Ostberg T., Zhang S. J., Grundtman C., Erlandsson-Harris H., Lundberg I. E., Glenmark B., Bruton J. D., Westerblad H. (2009): Impaired myofibrillar function in the soleus muscle of mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis and Rheumatism* **60**, 3280-3289.
- Yan L. J., Forster M. J. (2011): Chemical probes for analysis of carbonylated proteins: a review. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **879**, 1308-1315.
- Yang J. H., Yang E. S., Park J. W. (2004): Inactivation of NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase by lipid peroxidation products. *Free Radical Research* **38**, 241-249.
- Yin H., Xu L., Porter N. A. (2011): Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chemical Reviews* **111**, 5944-5972.
- Yin H., Zhu M. (2012): Free radical oxidation of cardiolipin: chemical mechanisms, detection and implication in apoptosis, mitochondrial dysfunction and human diseases. *Free Radical Research* **46**, 959-974.

- Yu R., Lai Y., Hartwell H. J., Moeller B. C., Doyle-Eisele M., Kracko D., Bodnar W. M., Starr T. B., Swenberg J. A. (2015): Formation, Accumulation, and Hydrolysis of Endogenous and Exogenous Formaldehyde-Induced DNA Damage. *Toxicological Sciences* **146**, 170-182.
- Zamora R., Navarro J. L., Aguilar I., Hidalgo F. J. (2015): Lipid-derived aldehyde degradation under thermal conditions. *Food Chemistry* **174**, 89-96.
- Zanardi E., Jagersma C. G., Ghidini S., Chizzolini R. (2002): Solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the evaluation of 4-hydroxy-2-nonenal in pork products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 5268-5272.
- Zanetti D., Poli G., Vizio B., Zingaro B., Chiarpotto E., Biasi F. (2003): 4-hydroxynonenal and transforming growth factor-beta1 expression in colon cancer. *Molecular Aspects of Medicine* **24**, 273-280.
- Zarkovic N. (2003): 4-hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Molecular Aspects of Medicine* **24**, 281-291.
- Zarkovic N., Cipak A., Jaganjac M., Borovic S., Zarkovic K. (2013): Pathophysiological relevance of aldehydic protein modifications. *Journal of Proteomics* **92**, 239-247.
- Zhao Y., Zhao B. (2013): Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2013**:316523.  
<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2013/316523/>
- Zhao Y., Miriyala S., Miao L., Mitov M., Schnell D., Dhar S. K., Cai J., Klein J. B., Sultana R., Butterfield D. A., Vore M., Batinic-Haberle I., Bondada S., St Clair D. K. (2014): Redox proteomic identification of HNE-bound mitochondrial proteins in cardiac tissues reveals a systemic effect on energy metabolism after doxorubicin treatment. *Free Radical Biology and Medicine* **72**, 55-65.
- Zhou Y., Hileman E. O., Plunkett W., Keating M. J., Huang P. (2003): Free radical stress in chronic lymphocytic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents. *Blood* **101**, 4098-4104.
- Zhu X., Tang X., Anderson V. E., Sayre L. M. (2009): Mass spectrometric characterization of protein modification by the products of nonenzymatic oxidation of linoleic acid. *Chemical Research in Toxicology* **22**, 1386-1397.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

$^1\text{O}_2$	singletní kyslík
9-HPODE	kyselina 9-hydroperoxyoktadekadienová
13-HPODE	kyselina 13-hydroperoxyoktadekadienová
15-HPETE	kyselina 15-hydroxyeicosatetraenová
4-HPNE	4-hydroperoxy-2E-nonenal
4-HNE	4-hydroxynon-2-enal
$\alpha$ -syn	$\alpha$ synuklein
AKR	aldoketoreduktasa
ALDH	aldehyddehydrogenasa
ALS	amyotrofická laterální skleróza
COX	cyklooxygenasa
DHN	1,4-dihydroxy-2-nonen
DNPH	2,4-dinitrofenylhydrazin
GPX	glutathionperoxidasa
GS-HNE	glutathionyl-HNE
GSH	glutathion
GST	glutathion S-transferasa
$\text{H}_2\text{O}_2$	peroxid vodíku
HNA	kyselina 4-hydroxy-2-nonenová
$\text{HO}^\bullet$	hydroxylový radikál
$\text{L}^\bullet$	lipidový uhlíkový radikál
LDL	lipoproteiny s nízkou hustotou

LO <sup>•</sup>	lipidový alkoxylový radikál
LOO <sup>•</sup>	lipidový peroxylový radikál
LOOH	lipidový hydroperoxid
LOX	lipoxygenasa
M	přechodný kov
MAA	malondialdehyd-acetaldehydový adukt
MAPK	mitogenem aktivovaná protein kinasa
MDA	malondialdehyd
MES	2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina
NRF2	jaderný faktor odvozený od erytrocytů
OHFA	monohydroxy mastná kyselina
PGH <sub>2</sub>	prostaglandin H <sub>2</sub>
PUFA	polynenasycená mastná kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
TBA	thiobarbiturová kyselina
TEP	1,1,3,3-tetraetoxypropan
TNF $\alpha$	tumor-nekrotizující faktor $\alpha$