

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie



Interakce elektrofilních ligandů s nízkomolekulárními thioley

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Bc. Martina Bednářová

Studijní obor: Bioorganická chemie a chemická biologie

Vedoucí práce: Mgr. Martina Zatloukalová, Ph. D.

Olomouc 2022

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité zdroje a literaturu. Práce ani její část nebyla předložena k získání stejného či jiného akademického titulu.

Zároveň souhlasím se zpřístupněním mé závěrečné práce v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Podpis

Podíl autorky a poděkování

Za pomoc s vypracováním a zpřístupnění prostor a materiálů k vytvoření diplomové práce chci tímto poděkovat vedoucí mé práce, Mgr. Martině Zatloukalové, Ph.D. Děkuji členům výzkumného týmu na Ústavu lékařské chemie a biochemie, panu prof. Janu Vackovi za cenné konzultace při sepisování diplomové práce, panu Mgr. Davidu Novákovi a paní laborantce Zitě Školařové za spolupráci a přátelskou atmosféru. Projektům GACR 19-21237Y a IGA_LF_2022_025 děkuji za finanční podporu. Poděkování také patří panu Mgr. Lukáši Jedinákovi, Ph.D. za poskytnutí vzorků nitrovaných mastných kyselin.

Bibliografická informace

Jméno a příjmení autora: Martina Bednářová

Název práce: Interakce elektrofilních ligandů s nízkomolekulárními thiolý

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Katedra organické chemie (experimenty byly provedeny na Ústavu lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta)

Vedoucí práce: Mgr. Martina Zatloukalová, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2022

Abstrakt:

Posttranslační modifikace (PTM) a obecně oxidační modifikace proteinů se podílí na regulaci metabolismu, růstu, diferenciaci a imunitní reakce buňky. Do modifikací navozených elektrofilními ligandy (nebo i léčivy) jsou nejčastěji zapojeny thiolý regulačních proteinů. Ostatní (především bazické) aminokyselinové zbytky jsou taktéž modifikovány, přičemž mechanismus těchto modifikací doposud nebyl zcela popsán. Diplomová práce je zaměřena na charakterizaci vybraných elektrofilů (nitroalkenů) a jejich interakci s nízkomolekulárními thiolý, cysteinem a glutationem. K uvedenému jsem využila spektrofotometrickou Ellmanovu metodu. Výsledky prokázaly interakci nitroalkenů s thiolý v závislosti na stavu thiolové skupiny. Samotná aminokyselina cystein nereaguje s nitroalkeny, což potvrzuje, že nitroalkeny jsou specificky reagující signální látky. Získané výsledky mohou být dále využity pro studium reaktivity, stability a biodostupnosti nitroalkenů.

Klíčová slova: nitroalkeny, nitroolejová kyselina, glutation, Ellmanova metoda, posttranslační modifikace

Počet stran: 72

Počet příloh: 28 grafů, 14 stran

Jazyk: český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Martina Bednarova

Title: Interaction of electrophilic ligands with low molecular weight thiols

Type of thesis: Diploma's

Department: Department of Organic Chemistry (the experiments were realized at the Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine)

Advisor: Mgr. Martina Zatloukalova, Ph.D.

The year of presentation: 2022

Abstract:

Post-translational modification (PTM) and, in general, oxidation modifications of proteins are involved in the regulation of cell metabolism, growth, differentiation and immune response. Thiols of regulatory proteins are most often involved in modification induced by electrophilic ligands (or even drugs). Other (especially basic) amino acid residues are also modified, and the mechanism of these modifications has not been fully described. The diploma thesis is focused on the characterization of selected electrophiles (nitroalkenes) and their interaction with low molecular weight thiols, cysteine and glutathione. The Ellman method has been used for this. The results showed the interaction of nitroalkenes with thiols depending on the state of the thiol group. The amino acid cysteine does not react with nitroalkenes, confirming that nitroalkenes are specific reactive signal agents. The obtained results can be used to study the reactivity, stability and bioavailability of nitroalkenes.

Keywords: nitroalkenes, nitrooleic acid, glutathione, Ellman method, posttranslational modification

Number of pages: 72

Number of appendixes: 28 graphs, 14 pages

Language: Czech

Seznam zkratek

ARE	Antioxidant Response Elements - elementy antioxidační odpovědi
CPSA	Chronopotentiometric Stripping Analysis - Chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza
DNA	Deoxyribonucleic Acid - deoxyribonukleová kyselina
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
GPx	Glutathion peroxidáza
GSH	Redukovaný glutathion
GSSG	Oxidovaný glutathion
GST	Glutathion-S-transferáza
HNE	4-hydroxy-2-nonenal
Keap1	Kelch-like ECH-associated Protein 1 - proteinový chaperon, negativní regulátor transkripčního faktoru Nrf2
LA	Lipoic Acid - lipoová kyselina
LMW	Low Molecular Weight - nízkomolekulární (např. LMW antioxidanty)
MAG	monoacylglycerol
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - laserová desorpce/ionizace za účasti matrice
MBPs	Metal Binding Proteins - protein vázající kovy
MDA	Malondialdehyd
MK	Mastné kyseliny
NAC	<i>N</i> -acetyl- <i>L</i> -cystein
NADPH	Nikotinamid adenindinukleotid fosfát
NF- κ B	Nukleární factor κ B - specifická skupina transkripčních faktorů, ovlivňující genovou expresi

NO ₂ MK	Nitrované mastné kyseliny
NO ₂ MAG	Nitro Monoacyl Glycerol - nitromonoolein, glycerol ester kyseliny nitroolejové
NO ₂ OA	Nitrooleic Acid - nitroolejová kyselina
Nrf2	Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2 - proteinový transkripční faktor regulující expresi genů cytoprotektivních enzymů
OA	Oleic Acid - olejová kyselina
PPARs	Peroxisome Proliferator-activated Receptors - receptory aktivované proliferátorem peroxisomu, transkripční faktory
RONS	Reactive Oxygen and Nitrogen Species - reaktivní kyslíkové a dusíkové formy
SOD	Superoxid dismutáza
TNB	5-thio-2-nitrobenzoová kyselina
T-REX	Targetable Reactive Electrophiles and Oxidants - cílené reaktivní elektrofilny a oxidanty
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxin reduktáza

Obsah

1. Úvod	9
2. Cíle práce.....	11
3. Teoretická část.....	12
3.1. Oxidačně-redukční homeostáza	12
3.2. Antioxidanty.....	13
3.2.1. Enzymové antioxidanty	13
3.2.2. Neenzymové antioxidanty - přímé.....	15
3.2.3. Neenzymové antioxidanty - bifunkční.....	20
3.2.4. Neenzymové antioxidanty - nepřímé	21
3.3. Biologicky aktivní elektrofilý	23
3.3.1. Charakteristika	23
3.3.2. Endogenní elektrofilý a jejich vazebné cíle	24
3.3.3. Laboratorně používané elektrofilý	28
3.3.4. Nitrované mastné kyseliny.....	29
3.4. Metody pro studium thiolů a elektrofilních léčiv.....	36
3.4.1. Elektrochemie	36
3.4.2. Chromatografie	38
3.4.3. Spektrometrie.....	38
3.4.4. Elektroforetické přístupy	40
3.5. Studie biologické aktivity elektrofilů.....	40
4. Experimentální část	42
4.1. Materiál a chemikálie.....	42
4.1.1. Chemikálie	42
4.1.2. Roztoky	42
4.1.3. Přístrojové vybavení	43
4.2. Metody	44
4.2.1. Ellmanova reakce.....	44
5. Výsledky.....	49
5.1. L-cystein.....	49
5.2. Glutation.....	51
6. Diskuse a závěr.....	55
7. Seznam citací.....	63
7. Přílohy	73

1. Úvod

Zatímco lidský genom zahrnuje zhruba 20 000 - 25 000 genů, celkový počet proteinů v lidském proteomu se odhaduje na více než jeden milion. ¹ Za takové zvýšení proteomické diverzity mohou posttranslační modifikace (PTM), chemické úpravy proteinů po jejich nasyntetizování ribozomem. PTM hrají klíčovou roli ve funkční proteomice. Dávají proteinům nové vlastnosti, regulují aktivitu, lokalizaci a interakci s jinými buněčnými molekulami, stabilizují konformace proteinů, přispívají k imunitnímu rozpoznávání apod. ²

Častými modifikacemi proteinů jsou např. fosforylace, glykosylace, N-acetylace, metylace či ubikvitinylace. Lze mezi ně však zařadit i modifikaci mastnými kyselinami a jejich deriváty. Mastné kyseliny s krátkým, středně dlouhým a dlouhým řetězcem jsou připojeny ke stovkám proteinů a regulují intracelulární transport, subcelulární lokalizaci, protein-protein a protein-lipid interakce. ²

Neenzymatickou oxidací polynenasycených mastných kyselin oxidem dusnatým a příbuznými reaktivními formami dusíku vznikají tzv. nitrované mastné kyseliny. Nitrované mastné kyseliny mají elektrofilní charakter a mohou za určitých podmínek reagovat s nukleofily jako je glutathion a specifické aminokyselinové zbytky proteinů a peptidů. ³

Účinek elektrofilních látek v buňce závisí na celkovém stavu buňky. Buněčná homeostáza je udržována nepřetržitou signalizací pro produkci elektrofilů a nukleofilů a snaží se udržet přirozený nukleofilní tonus. Jestliže je homeostáza narušena (např. nadměrnou tvorbou reaktivních kyslíkových a dusíkových forem), mohou být poškozeny buněčné struktury a v extrémních případech navodit buněčnou smrt. Záleží tedy zejména na rovnováze mezi oxidanty a antioxidanty, ale také na signalizačním působení a rovnoměrné syntéze elektrofilů a nukleofilů. ⁴

Nitrované mastné kyseliny (např. kyselina nitroolejová, konjugovaná kyselina nitrolinolová) vykazují cytoprotektivní a protizánětlivé vlastnosti *in vivo* jako projev modulace řady intracelulárních signálních drah. ⁵ Míra signalizace závisí na koncentraci volných nitrovaných mastných kyselin, jelikož bývají často zabudované do buněčných membrán, vázané na transportní proteiny nebo aminokyselinové zbytky nízkomolekulárních látek jako je glutathion.

V diplomové práci se zabývám vazbou nitrovaných mastných kyselin na nízkomolekulární thioly. Zkoumám interakci kyseliny nitroolejové a odvozeného glycerol esteru, tzv. nitromonooleinu, s cysteinem. Cystein je aminokyselina, jejíž zbytky se často vyskytují v aktivních místech proteinů, mají oxidačně-redukční aktivitu a jsou důležitým cílem PTM. Dále zkoumám interakci zmíněných nitroalkenů s glutathionem, hojně se vyskytujícím peptidem v buňkách eukaryot. Interakce vybraných elektrofilních nitroalkenů s nízkomolekulárními thioly (cystein, glutathion) jsou sledovány pomocí spektrofotometrické metody založené na detekci volných -SH skupin nukleofilů za různých reakčních podmínek, jelikož reaktivita cysteinylových zbytků je závislá na prostředí, ve kterém se vyskytují. Diplomová práce částečně navazuje na bakalářskou práci, ve které jsem studovala interakce lidského sérového albuminu s nitroolejovou kyselinou.

2. Cíle práce

1. Literární rešerše zaměřená na antioxidanty a biologicky aktivní elektrofilny se zřetelem na charakterizaci nitrovaných derivátů nenasycených mastných kyselin, zakončená výčtem metod vhodných pro studium těchto látek.
2. Optimalizace Ellmanovy spektrofotometrické metody pro detekci volných -SH skupin.
3. Spektrofotometrická analýza interakcí L-cysteinu a glutathionu s kyselinou nitroolejovou a glycerolesterem kyseliny nitroolejové, sledování závislosti reaktivity těchto látek na pH prostředí.
4. Popis principu použité metody, vysvětlení naměřených dat, diskuse o vlivu reakčních podmínek a reaktivitě nitroalkenů.

3. Teoretická část

3.1. Oxidačně-redukční homeostáza

Oxidačně-redukční a radikálové reakce jsou součástí spleteného systému, jehož cílem je buněčná stabilita (homeostáza). Zahrnují reakce metabolismu, biotransformace léčiv nebo regulace genové exprese.⁶ Vzhledem k přítomnosti kyslíku se při reakcích mohou uplatňovat mechanismy produkující vysoce reaktivní molekuly s oxidačními účinky, nebo přímo volné radikály (molekuly s jedním nepárovým elektronem). Vznikají však i látky s redukčními vlastnostmi. Charakterizuje je vysoká elektron-donorní kapacita a uvádí se jako nízkomolekulární (LMW) antioxidanty. Pro buněčnou homeostázu je důležitá rovnováha mezi „prooxidačními“ a antioxidačními látkami. Narušení rovnováhy může buňku přimět ke spuštění obranných a imunitních mechanismů (zánětlivé reakce, destrukce buněčných struktur apod.).⁴

Stresové odpovědi organismu nemůžeme vždy považovat za negativní jev. Určitá míra oxidačního stresu je za specifických okolností organismu prospěšná, nemluvě o aplikaci oxidačních procesů ve výzkumu zánětlivých mechanismů a řadě patologických procesů (ateroskleróza, neurodegenerativní choroby a další.)⁶

Kromě LMW antioxidantů a oxidačních činidel zasahují do oxidačně-redukční rovnováhy také enzymy, receptory a signální proteiny. Dynamické změny v rovnováze nastávají vlivem katalytického účinku enzymů, díky kterému lze za krátký čas produkovat velké množství látek, nebo naopak lze rychle eliminovat velký počet oxidačních forem a volných radikálů. Pokud tedy reakci mezi antioxidantem a reaktivní oxidovanou molekulou katalyzuje specifický enzym, vzniká tak opakující se katalytický cyklus, který efektivně reguluje množství reaktivních substancí. Z toho vyplývá, že systém LMW antioxidantů/prooxidantů spolu s enzymy, signálními proteiny a receptory prezentují komplementární buněčnou komunikaci.⁴

LMW antioxidanty i prooxidační látky mohou být endogenního i exogenního původu. Působení exogenních látek obecně závisí na jejich vazebných cílech v organismu a do kterých biotransformačních procesů jsou zapojeny.⁷

Jako meziprodukty metabolismu cukrů a lipidů v organismu vznikají vysoce reaktivní elektrofilní molekuly, které mají v buněčné homeostáze významnou roli. Kromě nejznámějšího glykoaldehydu, 4-hydroxy-2-nonenalu nebo methylglyoxalu jsou to také elektrofilní deriváty mastných kyselin.^{8, 9} Jejich pozitivní účinek spočívá v posttranslační modifikaci proteinů¹⁰, nicméně negativní vliv těchto látek se může projevit spuštěním procesů stárnutí. Existuje tedy spojitost mezi schopností elektrofilů regulovat specifické signální dráhy a schopností spouštět destruktivní procesy.

3.2. Antioxidanty

Buněčná ochrana proti reaktivním kyslíkovým formám a toxicitě elektrofilů je tvořena dvěma typy LMW antioxidantů - přímé antioxidanty, které jsou oxidačně-redukčně aktivní, a nepřímé antioxidanty, které mohou nebo nemusí být oxidačně-redukčně aktivní. Nepřímé antioxidanty aktivují dráhu Keap1/Nrf2/ARE (viz Aktivace Nrf2/Keap1), což vede k expresi genů cytoprotektivních proteinů s katalytickými účinky (známé jako enzymy fáze II). Vzájemná spojitost mezi těmito ochrannými systémy je zřejmá, jelikož některé cytoprotektivní proteiny se účastní syntézy a/nebo regenerace přímých antioxidantů, zatímco některé přímé antioxidanty jsou potřebné pro katalytickou funkci proteinů. Řada ochranných molekul, často izolovaných z rostlinného zdroje (např. sulforafan, kurkumin), může kromě regulace syntézy cytoprotektivních proteinů přímo vychytávat reaktivní formy kyslíku a dusíku a lze je označit za bifunkční.¹¹

3.2.1. Enzymové antioxidanty

a) Superoxid dismutázy (SOD)

SOD katalyzují diproporcionační reakci superoxidového aniontu ($O_2^{\cdot-}$) za vzniku peroxidu vodíku a molekuly kyslíku. Existuje několik izoform SOD, které se liší povahou aktivního centra. U člověka najdeme tři formy - cytozolickou Cu, Zn-SOD, mitochondriální Mn-SOD a extracelulární SOD. Neutralizaci $O_2^{\cdot-}$ provádí postupnými oxidačními a redukčními reakcemi iontů přechodných kovů ve svém aktivním místě.¹²

b) Kataláza

Kataláza je první antioxidační enzym, který byl charakterizován, a katalyzuje přeměnu peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Skládá se ze čtyř podjednotek, z nichž každá obsahuje hem a NADPH. Nachází se především v peroxizomu aerobních buněk, největší aktivitu má v játrech a erythrocytech. Určité množství se ale nachází ve všech tkáních.¹³

c) Glutathion peroxidáza (GPx)

GPx katalyzuje oxidaci kofaktoru glutathionu (GSH), přičemž se redukuje peroxid vodíku nebo lipidové peroxidy. Může tedy fungovat jako opravný enzym při zvýšené peroxidaci lipidů. Existují dvě formy tohoto enzymu. Jedna je závislá na selenu, druhá není. Tento rozdíl vyplývá z počtu podjednotek, mechanismu katalýzy a vazby selenu na aktivní centrum enzymu. Selen-dependentní GPx redukuje peroxidy tvorbou selenolu (SeOH) ve spojení s tripeptidem glutathionem. Metabolismus glutathionu je jedním z nejdůležitějších antioxidačních obranných mechanismů přítomných v buňkách (viz Neenzymatické antioxidy - přímé - glutation).¹⁴

d) Glutathion-S-transferáza (GST)

GST rozkládá hydroperoxidy lipidů a katalyzuje konjugaci GSH s cizorodými látkami. Navázáním na GSH se substráty stávají více rozpustnými ve vodě, jsou transportovány do žluče a dále metabolizovány. Příklady substrátů jsou např. chloroform, aflatoxin, organické nitráty nebo analgetikum paracetamol. Některé izoformy GST slouží v buňce jako proteinové nosiče pro hem, bilirubin, steroidní hormony a další biologicky aktivní látky.^{15, 16}

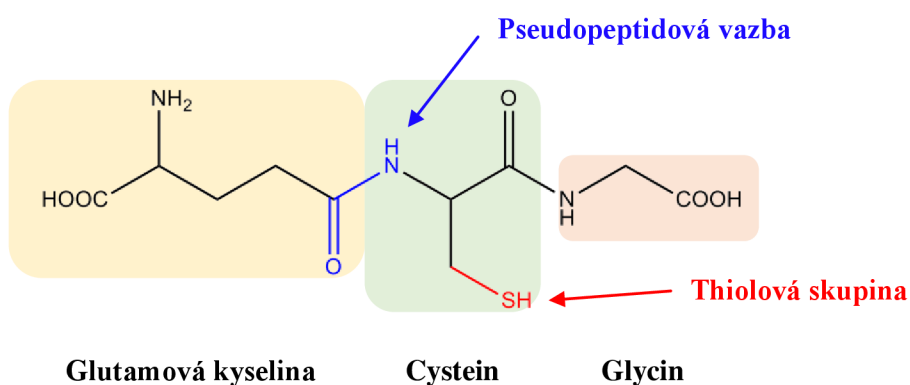
3.2.2. Neenzymové antioxidanty - přímé

Za přímé antioxidanty považujeme látky, které mohou podléhat oxidačně-redukčním reakcím a redukovat reaktivní kyslíkové a dusíkové meziprodukty. Je potřeba je doplňovat konzumací potravin, nebo regenerovat.¹¹

a) Glutathion

Hlavním zástupcem LMW antioxidantů je glutathion. Je přítomný ve všech rostlinných a živočišných buňkách a je produkován zejména v játrech.¹⁷ Ve vysokých koncentracích (1-10 mmol/l) je přítomný v cytoplazmě, mitochondriích a jádře. Nízké koncentrace GSH (do 2 mmol/l) se objevují v endoplazmatickém retikulu.¹⁸ Vyskytuje se v organismu především ve dvou formách, redukovaný (GSH) a oxidovaný (GSSG), a za běžného stavu tvoří GSH 98 % celkového množství.¹⁹

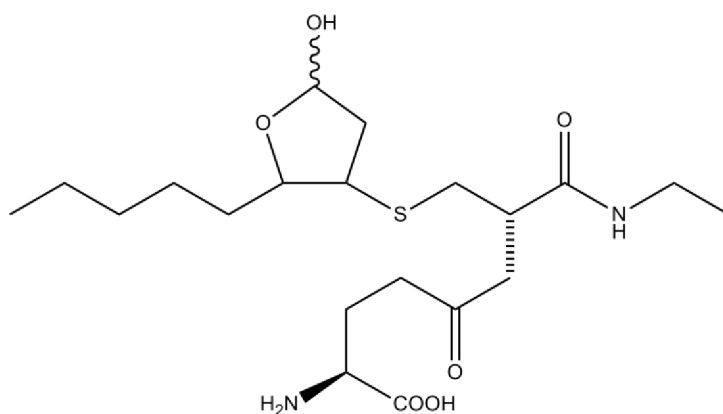
Struktura GSH se skládá ze tří aminokyselin - glycinu, cysteinu a glutamové kyseliny. Jako antioxidant působí glutathion díky dvěma specifickým místům ve struktuře (Struktura 1). Je to tzv. pseudopeptidová vazba mezi aminoskupinou cysteinu a α -karboxylovou skupinou glutamátu, která chrání před aminopeptidázami, a thiolová skupina na cysteinylovém zbytku, která může bránit oxidaci thiolových skupin jiných proteinů, může komplexovat ionty kovů a zapojovat se do oxidačních reakcí za vzniku disulfidu.²⁰ Příkladem takové oxidační reakce je redukce peroxidu vodíku pomocí GSH za vzniku molekuly vody a GSSG, katalyzovaná GPx (viz Enzymatické endogenní antioxidanty).¹⁷



Struktura 1: Glutathion

Kromě obrany organismu proti RONS se glutathion podílí na detoxifikaci elektrofilních xenobiotik a na metabolismu prostaglandinů a leukotrienů. Umožňuje transport aminokyselin a absorpci mikronutrientů ze střeva (hlavně železo a selen).¹⁸

Konjugace glutathionu s mnoha xenobiotickými sloučeninami napomáhá eliminaci těchto sloučenin, jelikož umožňuje jejich sekreci z buňky. Takové adukty mohou být transportovány přes membránové transportéry, např. „multidrug rezistentní“ proteiny. K interakci může dojít neenzymaticky (např. interakce GSH s chinonem nebo menadionem), ale většinou probíhá rychlejší enzymaticky katalyzovanou Michaelovou adicí. Typicky takto GSH eliminuje 4-hydroxy-2-nonenal (HNE, viz Produkty peroxidace lipidů) a další podobné elektrofilu. Konjugát (Michaelův produkt) se může přeskupit za vzniku stabilnějšího cyklického poloacetalu (struktura 2).²¹



Struktura 2: Produkt reakce HNE a GSH ve formě poloacetalu.

Glutathion regeneruje také jiné oxidované antioxidanty, např. vitamin C a E²², a zapojuje se do opravných procesů molekul proteinů, nukleových kyselin a lipidů, poškozených peroxidací.²³

b) *N*-acetyl-*L*-cystein (NAC)

Antioxidační schopnosti dlouho dostupného bezpečného léku NAC spočívají v jeho snadné deacetylaci na *L*-cystein, substrát pro syntézu GSH. Udržuje tak dostatečnou hladinu GSH především v játrech. Podobně jako mnoho dalších thiolů má chelatační účinky a redukuje množství ROS. Podává se zejména pacientům při otravě paracetamolem nebo acetaminofenem.²⁴

c) Thioredoxin (Trx)

Thioredoxinový systém je systém proteinů s oxidoreduktázovou aktivitou a vyskytuje se ve všech prokaryotních i eukaryotních buňkách. Skládá se z thioredoxinu, NADPH a thioredoxin reduktázy (TrxR). Trx je malý 12kD protein, který obsahuje tzv. redox-aktivní místo, Cys-Pro-Gly-Cys. Po zapojení do oxidačně-redukčních reakcí s jinými proteiny mohou dvě sousední -SH skupiny Cys zbytků vytvořit disulfidický můstek. TrxR je homodimer, který za použití NADPH jako donoru elektronů katalyzuje redukci aktivního místa Trx, čímž jej regeneruje. Thioredoxin peroxidáza využívá Trx jako donora vodíku při redukci H_2O_2 a alkyldydroperoxidů. (schéma 3).^{25, 26}

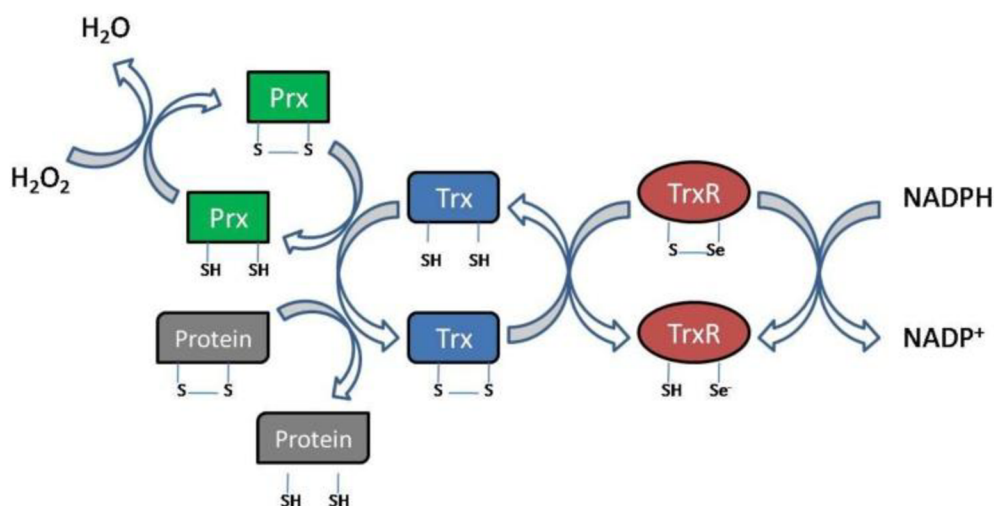


Schéma 1: Mechanismus působení thioredoxinového systému²⁷

d) Koenzym Q₁₀

Koenzym Q₁₀ se obecně podílí na transportu elektronů v dýchacím řetězci v mitochondriích a na transportu elektronů mimo mitochondrie.²⁸ Do oxidačně-redukčních reakcí dehydrogenáz nebo cytochromů se zapojují pouze redukovaná forma (ubichinol, $CoQ_{10}H_2$) a ubisemichinonový radikál ($CoQ_{10}H$). Ubichinol umožňuje vazbu vodíku na volné radikály, čímž z něj vzniká $CoQ_{10}H$. Ten vykazuje antioxidační vlastnosti, může reagovat s dalšími radikály a volným kyslíkem.²⁹ Také oxidovaný α -tokoferol (vitamin E) může být redukován pomocí ubichinolu. Redukovaná forma tokoferolu pak také vykazuje antioxidační schopnosti.

Na regeneraci ubichinolů z jejich oxidovaných forem se podílí tři cytoprotektivní enzymy - NAD(P)H chinon dehydrogenáza 1 (NQO1), TrxR a glutation reduktáza.³⁰

e) Vitaminy

Vitamin C neboli kyselina L-askorbová eliminuje RONS a redukuje ionty tranzitních kovů u specifických biosyntetických enzymů. Je nezbytný pro biosyntézu kolagenu, karnitinu, neurotransmiterů a neuroendokrinních peptidů. Pomáhá při vývoji kostí a chrupavek, je důležitý pro růst a obnovu pojivových tkání, pro metabolismus tuků a odolnost vůči infekcím (podpora imunitní odpovědi organismu).³¹

Vitamin E neboli α -tokoferol je lipofilní antioxidant lokalizovaný v buněčných membránách. Zde chrání polynenasycené mastné kyseliny membránových fosfolipidů před peroxidací a inhibuje peroxidaci lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL). Společně s nenasycenými mastnými kyselinami se také vyskytuje v potravinách, zejména v rostlinných olejích. Jako typický antioxidant také neutralizuje kyslíkové radikály.³¹

f) Proteiny vázající kovy (MBPs - „Metal-binding Proteins“)

MBPs jsou skupina látek s nejvyšší antioxidační kapacitou v krevní plazmě.³² Patří mezi ně albumin, ceruloplazmin, metalothionein, ferritin, myoglobin, transferrin a laktoferrin. Jejich antioxidační aktivita spočívá především ve schopnosti vázat ionty kovů (např. Cu^{2+} a Fe^{2+}). Tyto ionty jsou hlavními prekurzory vzniku ROS, jelikož interagují s peroxidem vodíku tzv. Fentonovou reakcí (schéma 2).³³ Vazbou iontů na proteiny je tedy kontrolováno množství volných iontů vstupujících do této reakce.³⁴

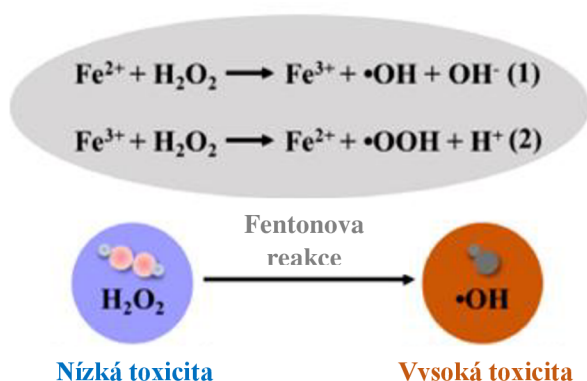


Schéma 2: Fentonova reakce³⁵

Albumin je narozdíl od ostatních zmíněných MBPs multifunkční antioxidační protein. Jeho koncentrace se za normálního stavu pohybuje mezi 35 až 50 g/l a tvoří 60 % celkového obsahu proteinů v plazmě. ³⁶ Dvě třetiny molekul albuminu se vyskytují v redukované formě, mají tedy volnou -SH skupinu na cysteinylovém zbytku Cys-34. Tato forma se nazývá mercaptalbumin. ³⁷ Cys-34 v krevní plazmě zaujímá důležitou roli „vychytávače“ volných radikálů a roli nukleofilního centra. ³⁸ Reakcí s peroxynitritem nebo peroxidem vodíku se Cys-34 oxiduje a vznikne sulfenová kyselina (HSA-SOH), meziproduct, který se podle stupně oxidačního stresu může buď zpětně redukovat na mercaptalbumin nebo ireverzibilně oxidovat na další formy kyselin. Reakcí s nízkomolekulárními thioly (glutathion, cystein) může také vytvořit disulfid (HSA-S-S-R, schéma 3). ³⁹ Albumin obsahuje kromě Cys-34 také šest methioninových zbytků, které mohou být oxidovány. ⁴⁰ Celkem se podílí Cys a Met zbytky albuminu na více než 70 % aktivity ve vychytávání volných radikálů v séru. ⁴¹

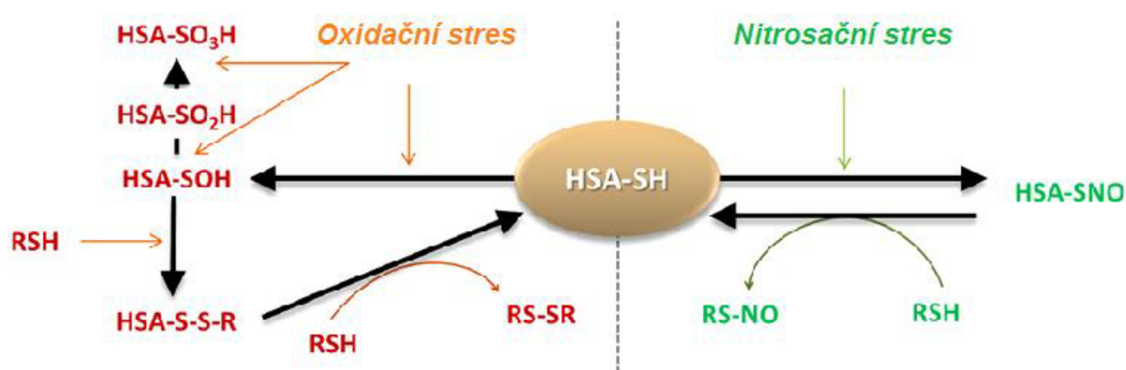


Schéma 3: Přeměny albuminu při oxidačním stresu ³³

Antioxidační kapacita albuminu spočívá především ve schopnosti vázat různorodé ligandy. Kromě iontů kovů váže také bilirubin, čímž se inhibuje peroxidace lipidů. ⁴² Má vysokou afinitu k mastným kyselinám s dlouhým řetězcem a k nenasyceným mastným kyselinám, které mohou v plazmě snadno podléhat oxidaci. ³⁸ Podobně chrání buňky vazbou homocysteinu, produktu katabolismu metioninu. Hladina volného homocysteinu v plazmě je považována za jeden z faktorů aterosklerózy. ⁴³

g) Kyselina močová (UA)

Narozdíl od ostatních savců člověk netransformuje kyselinu močovou na tzv. allantoin⁴⁴, proto je její množství v krvi dostatečné pro významné antioxidační účinky jako vychytávání ROS (např. peroxyinitrit, hydroxylový radikál, singletový kyslík, lipidové peroxidy)⁴⁵ nebo tvorba stabilních komplexů s ionty železa a mědi.⁴⁶ Kromě toho chrání antioxidační enzymy SOD1 a SOD3.⁴⁴ Známa je role UA při intenzivní fyzické zátěži, kdy je zvýšena její produkce a chrání tak organismus před oxidačním stresem.⁴⁷

Nízké hladiny UA mohou být považovány jako rizikový faktor demence nebo Parkinsonovy choroby, jelikož UA má neuroprotektivní účinky.⁴⁸ Naopak zvýšená hladina UA může mít opačné, oxidační účinky, a některé studie ji považují za faktor zánětlivých procesů⁴⁹ a selhání srdce⁵⁰.

h) Karotenoidy

Karotenoidy jsou antioxidační látky rozpustné v tucích, jejichž struktura má základní isoprenoidní skelet. Jsou to zejména vychytávače singletového kyslíku, ale podávají se spíše jako prevence proti peroxidaci lipidů. Nejdůležitějšími zástupci jsou α - a β -karoten.⁵¹

3.2.3. Neenzymové antioxidanty - bifunkční

a) Flavonoidy

Flavonoidy jsou rostlinné sekundární metabolity s protizánětlivými, antimikrobiálními, antitrombotickými, antialergickými, protirakovinnými a antioxidačními vlastnostmi.⁵² Jako antioxidanty typicky chelatují ionty železa a dalších kovů, a vychytávají RONS (zejména peroxyinitrit vlivem jejich 3',4'-katecholového uspořádání a volné 3-hydroxylové skupiny ve struktuře⁵³). Mimoto indukují detoxikační enzymy fáze II (NAD(P)H-chinon reduktáza, glutathion S-transferáza a UDP-glukuronosyl transferáza).⁵⁴ Aktivují také GPx, SOD a katalázu.⁵⁵ ⁵⁶ Podobně také inhibují různé oxidázy (xantin oxidáza, NADH oxidáza, cyklooxygenáza, lipoxygenáza).⁵⁷

Kromě mono- a dihydroxyflavonoidů se vyskytují v této skupině i zástupci s vyšším počtem hydroxylových skupin. Takoví mohou mít oxidační účinky a mechanismem Fentonovy reakce mohou produkovat hydroxylové radikály.⁵³ Oxidační a antioxidační vlastnosti flavonoidů jsou však velmi závislé na jejich celkové koncentraci. Hlavním zástupcem této skupiny je kvercetin.

b) Kyselina α -lipoová (LA)

Kyselina lipoová se většinou tkání pomocí NADH a NADPH přeměňuje na kyselinu dihydrolipoovou (DHLLA), která má ještě lepší antioxidační účinky než LA. Neutralizuje volné radikály, regeneruje vitamin C a má chelatační schopnosti, kterými napomáhá degradaci nahromaděných toxinů a pravděpodobně stabilizuje lysozomy chelatací železa. Jako kofaktor pyruvátdehydrogenázy a α -ketoglutarátdehydrogenázy chrání tyto enzymy před vlivem oxidačního stresu, což souvisí s celkovou funkcí LA jako stimulantu aktivity enzymů oxidativní fosforylace a buněčného dýchání.²⁵

c) Melatonin

N-acetyl-5-methoxytryptamin, triviálně melatonin, je hlavní produkt sekrece mozkové epifyzy a má nesčetné množství pozitivních účinků pro organismus. Jedná se o antioxidant volných radikálů a imunomodulační činidlo. Experimentálně bylo zjištěno, že zvyšuje hladiny intracelulárního GSH. Stimuluje řadu antioxidačních enzymů včetně SOD, GPx a katalázy, a inhibuje prooxidační enzymy, syntázu oxidu dusnatého, xanthinoxidázu a lipoxygenázu. Stabilizací buněčných membrán pomáhá buňkám odolávat oxidačnímu poškození. Pravděpodobně také aktivuje elektronový transportní řetězec, čímž snižuje únik elektronů a tvorbu ROS. Vlivem všech těchto účinků je melatonin potenciálním prostředkem pro léčbu různých neurodegenerativních poruch, které mají základ v oxidačním poškození buněčných struktur.⁵⁸

3.2.4. Neenzymové antioxidanty - nepřímé

Typickými nízkomolekulárními nepřímými antioxidanty jsou induktory exprese genů cytoprotektivních proteinů. Narozdíl od přímých antioxidantů mohou, ale nemusí být oxidačně-redukčně aktivní, a jejich antioxidační účinky spočívají v regulaci a signálním působení. Exprimované enzymy jsou katalyticky aktivní a nejsou spotřebovávány při oxidačně-redukčních reakcích. Často katalyzují právě chemické reakce, při kterých dochází k detoxifikaci cílové sloučeniny.³⁰

a) Minerály

Některé minerální látky lze považovat za nepřímé antioxidanty, jelikož mají úlohu stabilizace antioxidantních enzymů a jsou potřebné pro jejich správnou funkci.

Zinek aktivuje či stabilizuje přes 300 enzymů a více než 2000 transkripčních faktorů se zapojuje do genové exprese proteinů závislých na zinku.⁵⁹

Měď je nezbytná pro správnou funkci enzymů rodiny SOD. Podílí se na tvorbě enzymů, proteinů a mozkových neurotransmiterů (stimuluje nervový systém), a hraje roli při protiinfekčních a protizánětlivých reakcích.⁵²

Ve stopovém množství organismus potřebuje také selen. Základní molekula, ve které se selen v těle vyskytuje, je selenocystein, považovaný za 21. aminokyselinu (AK) a základní AK zbytek selenoproteinů a selenoenzymů. Z výše zmíněných jsou to např. enzymy rodiny GPx nebo TrxR.⁶⁰

b) Sulforafan

Sulforafan ((R)-1-isothiokyno-4-methyl-sulfonylbutan) je rostlinný nepřímý antioxidant, známý především jako součást zeleniny (brokolice, zelí, květák, kapusta). Vzniká aktivací prekurzoru glukorafaninu myrosinázi, rodinou enzymů, jež hrají roli při obranných reakcích rostlin (schéma 4). V celistvém stavu rostliny je prekurzor od enzymů prostorově oddělen, proto dochází k aktivaci jen tehdy, když je rostlina poraněna. Sulforafan je typickým příkladem nepřímého antioxidantu, který reguluje signální dráhu Nrf2/Keap1.¹¹

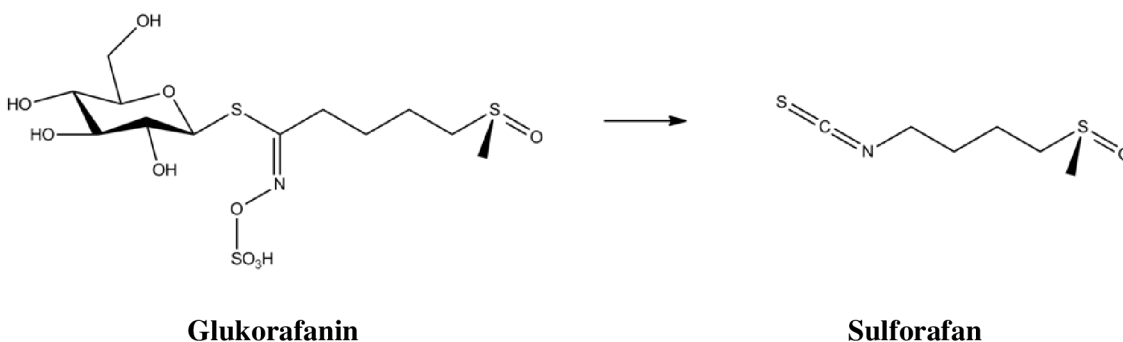


Schéma 4: Přeměna glukorafaninu na sulforafan

c) Michaelovy akceptory

Elektrofilní látky, které mají na dvojně vazbě elektron-deficitní centrum vytvořené vlivem sousedící funkční skupiny s elektronegativním prvkem, jsou schopné reagovat s thioley mechanismem Michaelovy adice. Říkají se jim proto Michaelovy akceptory. Chaperonový protein Keap1 obsahuje ve své struktuře 25 cysteinylových zbytků a 9 z nich je vysoce reaktivních. Interakcí s těmito AK zbytky Michaelovy akceptory spouští signální dráhu Nrf2/Keap1/ARE. Jsou tedy induktory exprese ochranných enzymů fáze II a nepřímo zvyšují antioxidační kapacitu buňky. Příkladem biologicky významných Michaelových akceptorů jsou cinnamáty (deriváty kyseliny skořicové), chalkony, kurkuminoidy nebo kumariny.⁶¹

3.3. Biologicky aktivní elektrofilny

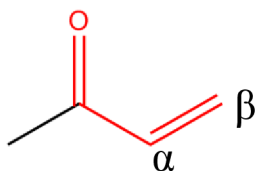
3.3.1. Charakteristika

Biologicky aktivní elektrofilny vznikají během regulovaných metabolických procesů nebo během patologických procesů jako vedlejší produkty oxidace. Při oxidačním stresu a jejich zvýšené produkci mohou změnit buněčné funkce přímo prostřednictvím modulace signálních cest nebo nepřímo modifikací buněčných makromolekul. Proto přispívají k rozvoji neurodegenerativních chorob, rakoviny, aterosklerózy, Alzheimerovy choroby, chronického zánětu. Nicméně, v regulovaném množství mohou příznivě ovlivnit některé buněčné pochody, jak již bylo vysvětleno.⁶²

Biologicky aktivními elektrofilny se rozumí látky, které mohou mít různou strukturu, ale sdílí jednu vlastnost - obsahují elektron-deficitní centrum na atomu uhlíku vlivem posunu elektronové hustoty k elektronegativnějšímu prvku (např. karbonylový kyslík, dusík vázané funkční skupiny). To může přijmout elektrony od elektronově bohatých molekul - nukleofilů. Nukleofily mohou být kationty (Hg^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+}), polarizované neutrální molekuly (obsahují volné elektronové páry), polarizovatelné neutrální molekuly (Cl_2 , Br_2), oxidační činidla a některé Lewisovy kyseliny.⁶³

3.3.2. Endogenní elektrofilní látky a jejich vazebné cíle

Velkou skupinou elektrofilních látek, z nichž se značný počet přirozeně vyskytuje v buňkách, jsou mastné kyseliny (MK) obsahující α , β - nenasycenou karbonylovou skupinu (struktura 3).



Struktura 3: Funkční skupina α , β - nenasycených karbonylových sloučenin.

Reaktivita této skupiny závisí na povaze sousedících atomů. Pokud je na β -uhlíku vázán alespoň jeden atom vodíku, je elektrofilním centrem a může reagovat s nukleofilními skupinami, jako je např. -SH skupina. Tyto látky jsou převážně produkty neenzymatické oxidace MK, ale také sekundární metabolity, produkty metabolismu hemu a další.⁶³

a) Produkty peroxidace lipidů

Klíčovým krokem peroxidace lipidů je rozklad polynenasycených MK na malé reaktivní fragmenty se strukturou aldehydu (2-alkenaly, 4-hydroxy-2-alkenaly, ketoaldehydy). Významnými zástupci těchto fragmentů jsou malondialdehyd (MDA)⁶⁴ a 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) (schéma 5).⁶⁵

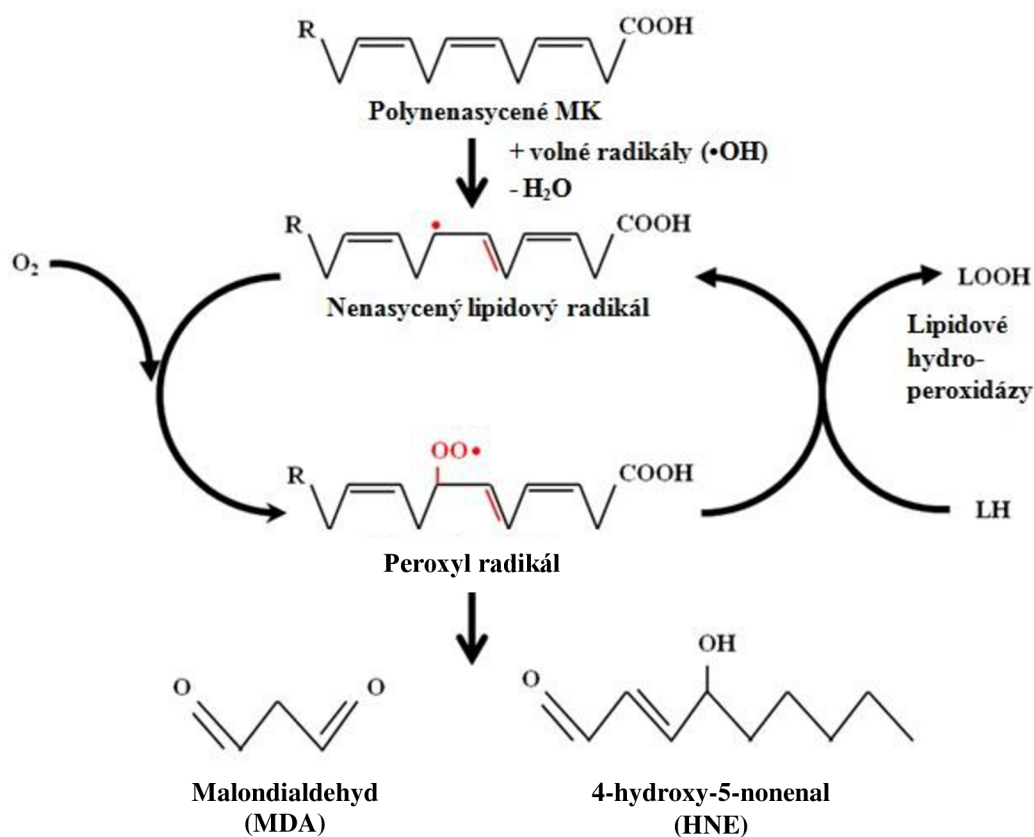


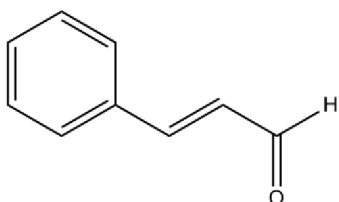
Schéma 5: Vznik meziproduktů MDA a HNE oxidací nenasycených MK. ⁶⁶

Malondialdehyd vzniká peroxidací polynenasycených MK a při syntéze prostaglandinů. V neutrálním roztoku se vyskytuje ve formě nereaktivního enolátu, při nižším pH ve formě β-hydroxyakroleinu, který tvoří adukty s proteiny a DNA. Detekce MDA se tradičně používala jako indikátor peroxidace lipidů. Primárně reaguje s ε-aminoskupinami lysinových zbytků proteinů a způsobuje tak cross-linking. Může tvořit adukty s DNA, u lidí zejména v játrech bez zjevného způsobení onemocnění. ⁶⁷

4-hydroxy-2-nonenal je hlavní aldehyd produkovaný peroxidací ω6-nenasycených MK jako je kyselina linoleová a arachidonová. ⁶⁸ Má elektrofilní centrum na uhlíku C3 a může tvořit tzv. Michaelovy adukty s thiolovou skupinou cysteinylových, s imidazolovou skupinou histidinových, a s α-aminoskupinou lysinových zbytků proteinů. ⁶⁹ Často také tvoří Schiffovy báze přes C1 atom a může reagovat s thiolem kyseliny lipoové. Některé mitochondriální proteiny jsou tímto způsobem inaktivovány - acyltransferázy, 2-oxo-glutarát dehydrogenázový a pyruvát dehydrogenázový komplex, glycin dekarboxyláza. ^{70, 71} Peroxidací ω3-nenasycených MK vzniká podobný produkt - 4-hydroxy-2-hexenal (HHE). ⁶⁹

b) α , β -nenasycené aldehydy

Cinnamaldehyd (struktura 4) a kyselina skořicová jsou zástupci α , β -nenasycených aldehydů a známá potravinová aditiva díky jejich skořicové vůni. Mají protizánětlivé, antifungální a antibakteriální účinky. Cinnamaldehyd přednostně reaguje s cysteiny mechanismem Michaelovy adice nebo tvoří iminy. Mírně inhibuje thioredoxin reductázu a indukuje faktor Nrf2 (viz Nrf2/Keap1 signalizační dráha) ⁷², a také podléhá Michaelově adici na některé reaktivní cysteiny TRPA1 (člen rodiny iontových kanálů TRP- „Transient Receptor Potential“), čímž aktivuje transdukcí signálu. ⁷³ Deriváty peptidyl-cinnamaldehydu účinkují jako reverzibilní inhibitory tyrozin fosfatáz, přičemž interakce spočívá ve tvorbě iminu se zbytkem argininu a následuje Michaelova adice na zbytek cysteinu. ⁷⁴

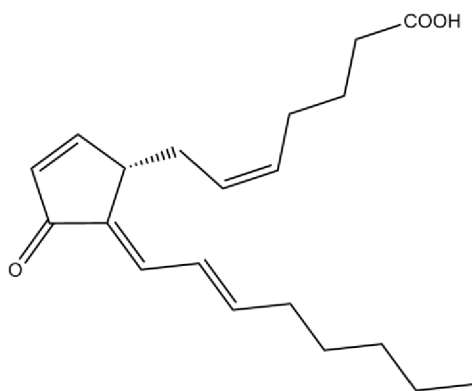


Struktura 4: Cinnamaldehyd

c) α , β -nenasycené ketony

Seskviterpen zerumbon je příkladem látky produkované tropickými rostlinami, která má protizánětlivé účinky. V eukaryotických buňkách indukuje expresi detoxikačních genů a potlačuje expresi prozánětlivých genů. Kovalentní modifikací cysteinylových zbytků na proteinu Keap1 obdobně jako zmíněný cinnamaldehyd aktivuje signální dráhu Nrf2. ⁷⁵

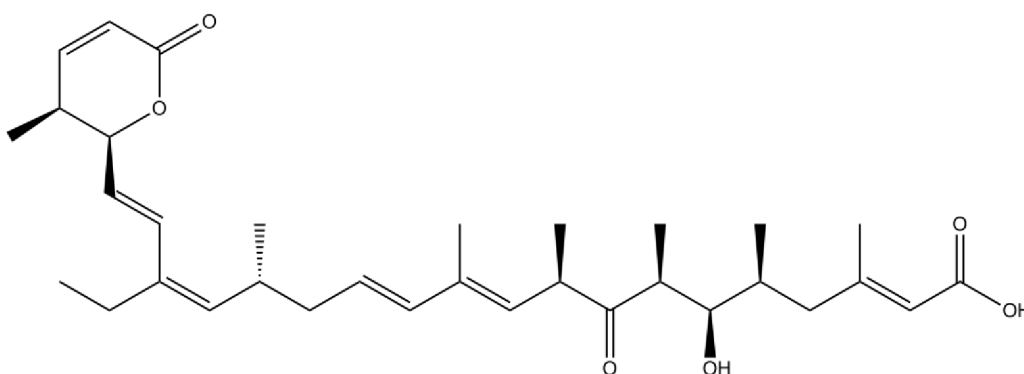
Intracelulární dehydratací prostaglandinu D₂ vzniká elektrofilní 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin (struktura 5), jehož Michaelovy adukty s thiolovými skupinami glutationu a cysteinylových zbytků spouští zánětlivé buněčné procesy. ⁷⁶



Struktura 5: 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin

d) α , β -nenasycené δ -laktony

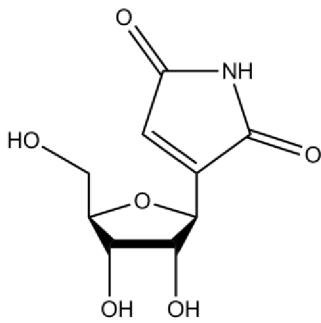
Zástupcem této skupiny nenasycených elektrofilních sloučenin je leptomycin B (struktura 6). Dlouhý alifatický řetězec leptomycinu B je zakončený δ -laktonovým kruhem. Je schopný tvořit komplexy s jadernými proteiny a CRM1, což je receptor přenosu signálů z jádra do cytoplazmy. Selektivní vazbou jeho α , β -nenasycené δ -laktonové skupiny na Cys529 proteinu CRM1 inhibuje jaderný export.⁷⁷ Původně byl považován za antifungální látku⁷⁸, dnes je známý zejména pro antiproliferační účinky.



Struktura 6: Leptomycin B

e) Maleimidy

Maleimid je elektrofil, který se často používá v bioorganické chemii ke značení proteinů díky jeho specifické reakci s thioley (viz Laboratorně používané elektrofil). Přirozeným derivátem je např. antibiotikum showdomycin (struktura 7), izolovaný ze *Streptomyces showdoensis*.⁷⁹ Je strukturně podobný uridinu a pseudouridinu a inhibuje některé enzymy zapojené do metabolismu uridinu v *in vitro* podmínkách.⁸⁰ Zároveň jsou jeho cíli enzymy zapojené do biosyntézy buněčné stěny.⁸¹



Struktura 7: Showdomycin

f) Vinylsulfony

Elektrofilní vinylsulfonová skupina významně inhibuje cysteinové proteázy. Chová se jako Michaelův akceptor a váže se kovalentně na cysteinylové zbytky příslušných proteáz.⁸² Proto se peptidické vinyl sulfony hojně aplikují ve studiu proteáz nebo jako nástroje ke studiu rodiny deubikvitinačních enzymů.⁸³ Přírodní vinylsulfonový produkt methyldambullin byl izolován z rostlin rostoucích na Srí Lance a prokázaly se jeho antiparazitické účinky.^{84, 85}

3.3.3. Laboratorně používané elektrofilní

a) Jodacetamidy

Jodacetamidy mají vysokou afinitu ke všem thiolům a tvoří tak thioethery. V případě absence volné thioskupiny reagují také se zbytky metioninu, histidinu nebo tyrozinu. Dokáží reagovat i s alifatickými aminy, ale pouze za vysokého pH, jelikož aminy jsou v pH pod 8,0 protonovány a jsou tedy značně nereaktivní. Jodacetamidy jsou nestabilní na světle.⁸⁶

b) Maleimidy

Název maleimid je složen z kyseliny maleinové a imidu. Je to nenasycený imid, který se hojně využívá pro selektivní modifikace cysteinylových zbytků.⁸⁷ Reakce mezi thiolem a maleimidem dává thiosukcinimidové produkty a je to typický příklad Michaelovy adice (schéma 6).

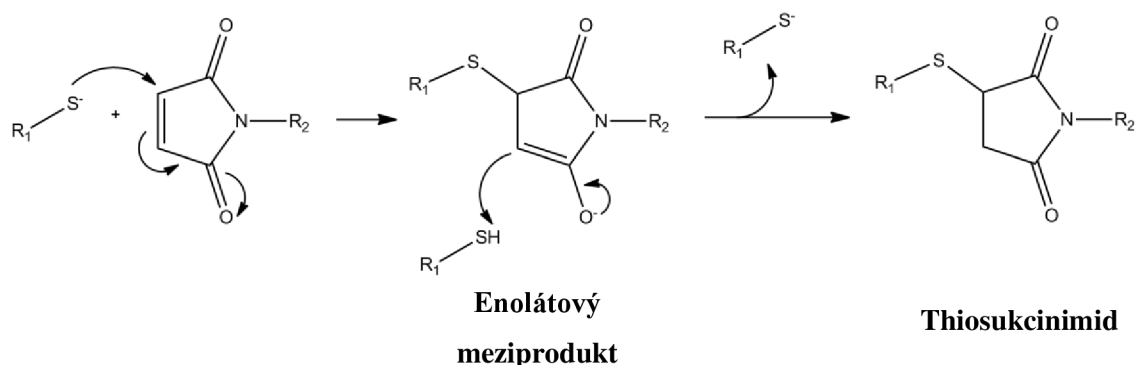


Schéma 6: Mechanismus Michaelovy adice thiolové skupiny proteinu na maleimid.

Reakce je velmi rychlá a produkty jsou dostatečně stabilní pro jejich využití z hlediska biokonjugačních studií. Často se používají deriváty maleimidu (R_1 - alkyl, aryl) jako *N*-ethylmaleimid, a jejich fluorescenční či chromoforické analogy.⁸⁶ Narozdíl od jodacetamidů maleimidy nereagují s methioninem, histidinem nebo tyrozinem. Nicméně, maleimid dokáže reagovat také s primárními aminoskupinami a selektivita závisí na reakčních podmínkách, zejména na pH. V rozmezí hodnot pH od 6,5 do 7,5 je reakce maximálně selektivní pro thioly. V pH 7,0 je reakční rychlost maleimidu s thioly stále asi 1 000krát větší než s aminy. V pH nad 7,5 ale primární aminy a thioly reagují s maleimidem kompetitivně.⁸⁷ Maleimid je ve vodném roztoku nestabilní, může dojít k hydrolyze (otevření kruhu).

3.3.4. Nitrované mastné kyseliny

Nitrované mastné kyseliny (NO_2 -FAs) jsou endogenní látky produkované během interakcí nenasycených MK s RONS. Nitrace MK může probíhat různými mechanismy, závěrem reakce je ale vždy adice radikálu oxidu dusíku na dvojnou vazbu, přičemž mohou vzniknout různé regio- a stereoizomery.⁸⁸ NO_2 -FAs mají značně elektrofilní charakter, díky kterému interagují s mnoha biologickými nukleofilními cíli a jsou to významné signální molekuly.

3.3.4.1. Mechanismus nitrace nenasycených MK

Nitrace mastných kyselin vychází z reakcí radikálu oxidu dusnatého $\bullet\text{NO}$, oxidů dusíku odvozených od $\bullet\text{NO}$ (např. $\bullet\text{NO}_2$), peroxyinitritu ONOO^- a kyslíkových mediátorů ($\text{O}_2\bullet^-$, H_2O_2 a lipidové peroxy radikály $\text{LOO}\bullet$). Postup, jakým dojde k výsledné nitraci MK, závisí na mnoha faktorech - koncentrace zmíněných RONS a vazebných cílů, koncentrace katalyzátorů a činidel redukujících RONS, hydrofobní/hydrofilní podmínky.⁸⁹ Tyto faktory také odrážejí stav buněčného metabolismu a zánětlivý stav a v konečném důsledku řídí rozsah oxidace, nitrosace a nitrace cílových molekul.⁵

Peroxyinitrit ONOO^- - kromě reakcí s thioley ochotně reaguje v tkáních s oxidem uhličitým CO_2 za vzniku ONOOCO_2^- a v zánětlivém prostředí se dále tvoří radikály $\bullet\text{NO}_2$, $\bullet\text{OH}$ a $\bullet\text{CO}_3^-$, které podporují nitraci MK.⁹⁰

Peroxidázy - katalyzují redukci H_2O_2 a organických peroxidů, následně oxidují organické sloučeniny, anorganické anionty a halogenidy. Pomocí peroxidáz, hemových proteinů a tranzitních kovů (Fentonova reakce) se oxiduje NO_2^- na $\bullet\text{NO}_2$.⁹¹

Protonizace NO_2^- - dusitanový anion NO_2^- je běžným metabolitem $\bullet\text{NO}$ a v kyselém prostředí může být protonizován za vzniku kyseliny dusité HNO_2 (k tomu dochází např. v trávicím traktu, lysozomech nebo endozomech). Následné reakce HNO_2 ve vodném prostředí tvoří radikály a ionty indukující adiční nitraci biomolekul.⁵

Aerobní reakce $\bullet\text{NO}$ - přestože má oxid dusnatý jeden nepárový elektron, zachovává si vlastnosti malé nenabitě molekuly a koncentruje se spíše v lipofilním prostředí, kde může reagovat s molekulovým kyslíkem O_2 . Tento efekt znásobuje tvorbu sekundárních reaktivních forem z $\bullet\text{NO}$ pomocí O_2 , včetně $\bullet\text{NO}_2$. Zvyšuje se tak možnost nitrace nenasycených MK.⁹²

V prvním kroku nitrace dojde k rychlé reverzibilní adici $\cdot\text{NO}_2$ na dvojnou vazbu, vznikne β -nitroalkyl radikál. V lipofilním prostředí, kde je vysoká koncentrace $\cdot\text{NO}$ a dalších oxidů dusíku, mohou reakce pokračovat za tvorby nitrovaných derivátů. V hydrofilním prostředí však převládá pomalé, ale ireverzibilní odštěpení allylového atomu vodíku pomocí $\cdot\text{NO}_2$ a následující peroxidační reakce (schéma 7).⁹³ Za podmínek, kdy je obsah kyslíku nízký (ischemie, anoxie), se upřednostňují nitrační reakce.

Co se týče stereochemie produktů, nitroskupina se primárně váže na dvojnou vazbu v *cis*-konfiguraci, pouze malé procento nitračních reakcí dává *trans*-izomery.⁵

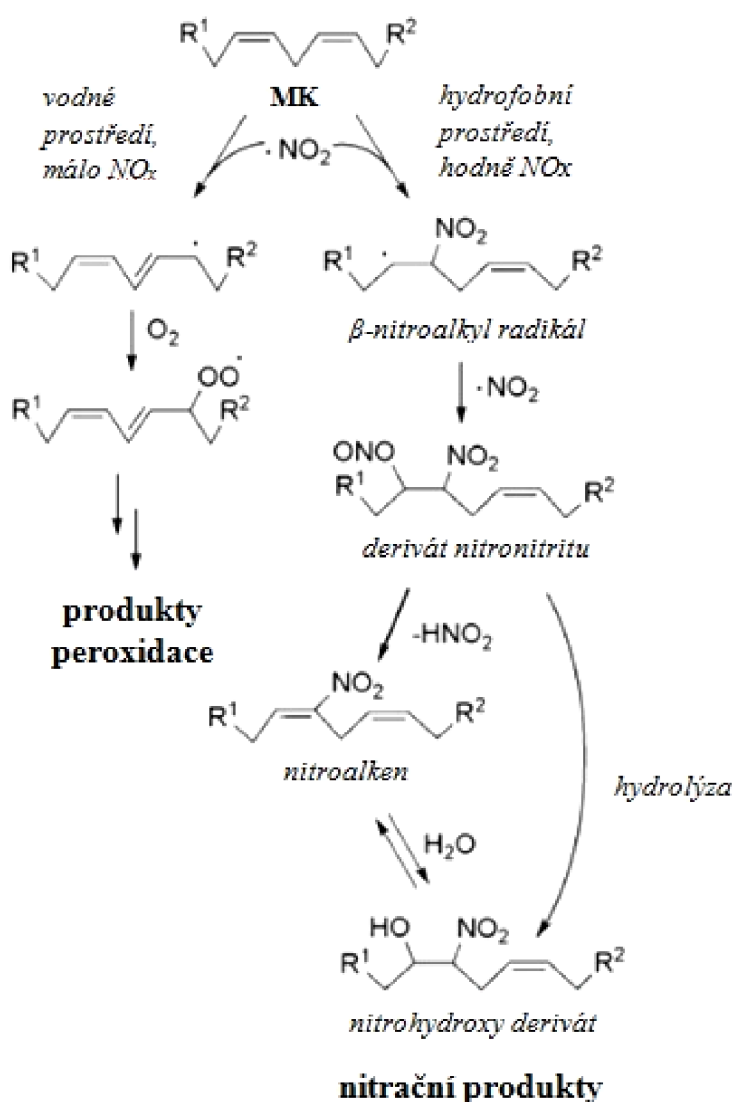


Schéma 7: Mechanismus nitrace a oxidace mastných kyselin v hydrofilním a hydrofobním prostředí.⁵

Nitrační reakce mohou také nastat v průběhu peroxidace lipidů. Modifikují se pak meziprodukty konjugovaných dienů, které vznikají enzymatickou či neenzymatickou peroxidací kyseliny linolové.⁵

3.3.4.2. Reaktivita NO₂-FAs

Analýzy syntetických nitro derivátů olejové, linolové a arachidonové kyseliny dokazují, že tyto deriváty mají jedinečnou reaktivitu ovlivňující buněčné signální pochody. Účinkují různými mechanismy, závislými i nezávislými na receptoru, a míra regulace závisí na jejich koncentraci v hydrofobním či vodném prostředí buňky.⁵

Elektrofilní reakce s vodou - nitroalkeny jsou schopné reagovat mechanismem Michaelovy konjugační adice s hydroxidovými anionty, které se v malém množství vždy vyskytují ve vodném prostředí při fyziologickém pH. Nitroalkeny a nitrohydroxyderiváty se současně vyskytují přirozeně v srdeční tkáni, v krvi nebo moči. Nitrohydroxyderiváty se vlivem vysoké polaritě hydroxylové skupiny chovají podobně jako nasycené MK.⁵

Hydrolyza a uvolnění •NO - nastává v případě, že organické nitroderiváty reagují mechanismem Neffovy reakce. Za neutrálních hydrofilních podmínek současný výskyt nitroalkenů a nitrohydroxyderivátů umožňuje vznik aniontu R₂-C⁽⁻⁾-NO₂. Následující protonizační a deprotonizační děje vedou k nitrosoderivátu a k uvolnění •NO pomocí redukčních činidel (např. askorbát). Uvolnění je snadné díky slabé C-N vazbě nitrosoderivátu a stabilizaci vzniklého uhlíkového radikálu dvojnou vazbou a -OH skupinou. Uhlíkový radikál může být následně redukován různými redukčními mechanismy a vzniká konjugovaný keton, finální produkt.⁸⁸ Nitroderiváty MK jsou ale hydrofobní povahy a v hydrofilním prostředí se často stabilizují (tvorba micel), proto k uvolnění •NO z jejich molekul v řadě případů nemusí docházet.⁵

Tvorba aduktů s proteinovými thioley a histidinovými zbytky - nitroalkeny velice rychle reagují s thioláty (-S⁻) na molekulách GSH a cysteinu mechanismem Michaelovy adice. K molekulám GSH mají daleko větší afinitu než elektrofilní lipidy nebo peroxid vodíku. Důležitá vlastnost aduktů NO₂-FAs s proteiny je jejich reverzibilita v kontextu buněčné signalizace. Adukty jsou klinicky detegovány a reprezentují redox-senzitivní mechanismus regulace distribuce a funkce proteinů.⁵

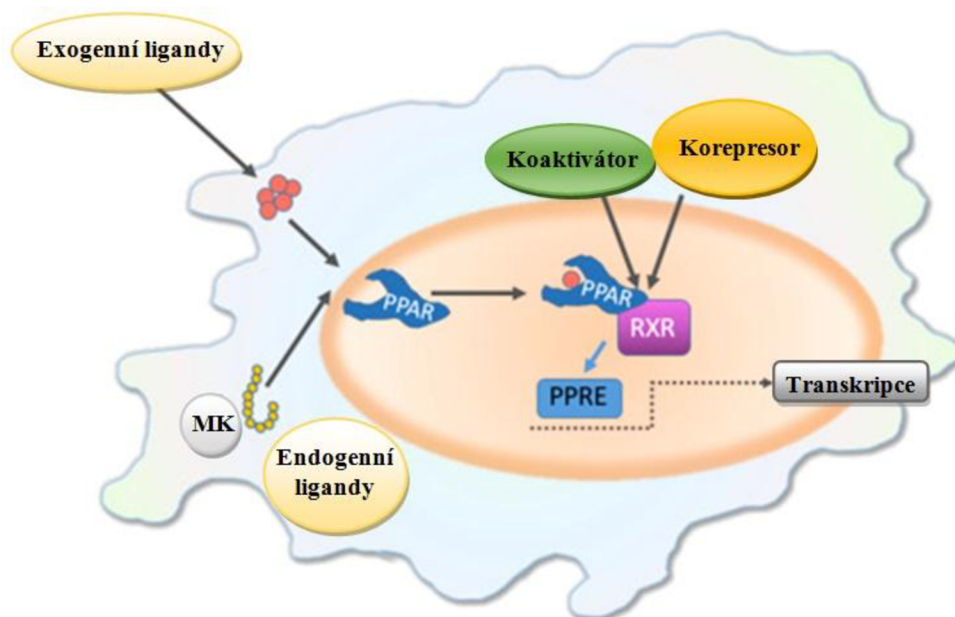
Hydrofobní stabilizace - nitroalkeny jsou vysoce stabilní v polyethylenglykolech, alkoholech a dalších méně polárních rozpouštědlech. Po umístění do neiontových detergentních micel nebo do lipozomů se stabilizují, je tak bráněno uvolňování $\bullet\text{NO}$ pomocí Neffovy reakce a elektrofilním reakcím s thioley. ⁹⁴ Nitroalkeny, které se vyskytují v buněčné membráně ve formě komplexních lipidů a lipoproteinů, jsou tedy ve stabilizované formě, kterou lze mobilizovat a působením esteráz a fosfolipáz typu A2 aktivovat pro následné signalizační působení. ⁸⁸

3.3.4.3. Signální působení $\text{NO}_2\text{-FAs}$

Inhibice zánětlivých funkcí buňky - $\text{NO}_2\text{-FAs}$ inhibují funkce neutrofilů (leukocytů) a krevních destiček mechanismy nezávislými na cGMP (cyklický guanosin monofosfát). V aktivovaných neutrofilech kyselina linoleová (LNO_2) inhibuje produkci $\text{O}_2\bullet^-$, transport vápníku a expresi CD11b nezávisle na $\bullet\text{NO}$. Expozice neutrofilů a krevních destiček LNO_2 také způsobuje zvýšení hladiny cAMP, ⁹⁵ což může způsobit inhibici trombinem indukované agregace (tu však zpětně obnovují inhibitory adenylát cyklázy). ⁵

Inhibice NF- κB - elektrofilní látky přispívají k transkripční regulaci zánětu pomocí posttranslační modifikace NF- κB . NF- κB je proteinový komplex o pěti podjednotkách (p50, p52, p65, p100 a p105). Zejména dimer p50 a p65 podporuje expresi genů podílejících se na přežití buněk a progresi zánětu. $\text{NO}_2\text{-FAs}$, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 a rostlinné seskviterpenové laktony jsou elektrofilny, které potlačují transaktivaci proteinového komplexu NF- κB . $\text{NO}_2\text{-FAs}$ vykazují inhibiční účinek tím, že alkylují podjednotku p65 a tím jí zabraňují vázat se na promotorovou oblast genů souvisejících se zánětem. ⁵

Aktivace PPAR - PPARs („peroxisome proliferator-activated receptors“) je skupina jaderných proteinových receptorů, které fungují jako transkripční faktory. ⁹⁶ Mají tři různé izoformy (α , β/δ , γ) a přispívají k regulaci metabolismu tuků, adipogenezi, glykemie a zánětlivých reakcí. ⁵ Po vazbě lipofilních ligandů tvoří PPAR heterodimer s retinoidním X receptorem (RXR), váže se na specifické regiony DNA (PPREs - „peroxisome proliferator hormone response elements“) a reguluje transkripci cílového genu (schéma 8). $\text{NO}_2\text{-FAs}$ se ve velké míře váží na izoformu PPAR γ . ⁹⁷



*Schéma 8: Regulace transkripce pomocí PPARs*⁹⁷

Aktivace Nrf2/Keap1/ARE - adukt proteinu Keap1 a elektrofilního derivátu mastné kyseliny je jedním z příkladů PTM proteinů regulující důležitou signální dráhu buňky. Nrf2 je transkripční faktor, který je ve stavu homeostázy vázán na protein Keap1, ten funguje jako adaptor pro Cullin 3 (Cul3), ligázu vedoucí Nrf2 k ubikvitinaci a následné proteasomální degradaci. Tato degradace probíhá poměrně rychle, poločas existence Nrf2 v buňce je přibližně 20 minut, a proto je obtížné jej za běžných podmínek detegovat. Nicméně, za podmínek oxidačního či elektrofilního stresu se elektrofilní ligand aduje na Keap1 a komplex Nrf2/Keap1 je rozštěpen, což vede ke snížené degradaci Nrf2 a jeho akumulaci v buňce. Vyšší koncentrace usnadňuje jeho transport do jádra, kde heterodimerizuje s Maf proteinem (Maf = „musculo-aponeurotic fibrosarcoma protein“) a váže se na elementy antioxidační odpovědi (ARE). Výsledný komplex iniciuje transkripci velké skupiny cytoprotektivních genů (schéma 9).⁹⁸

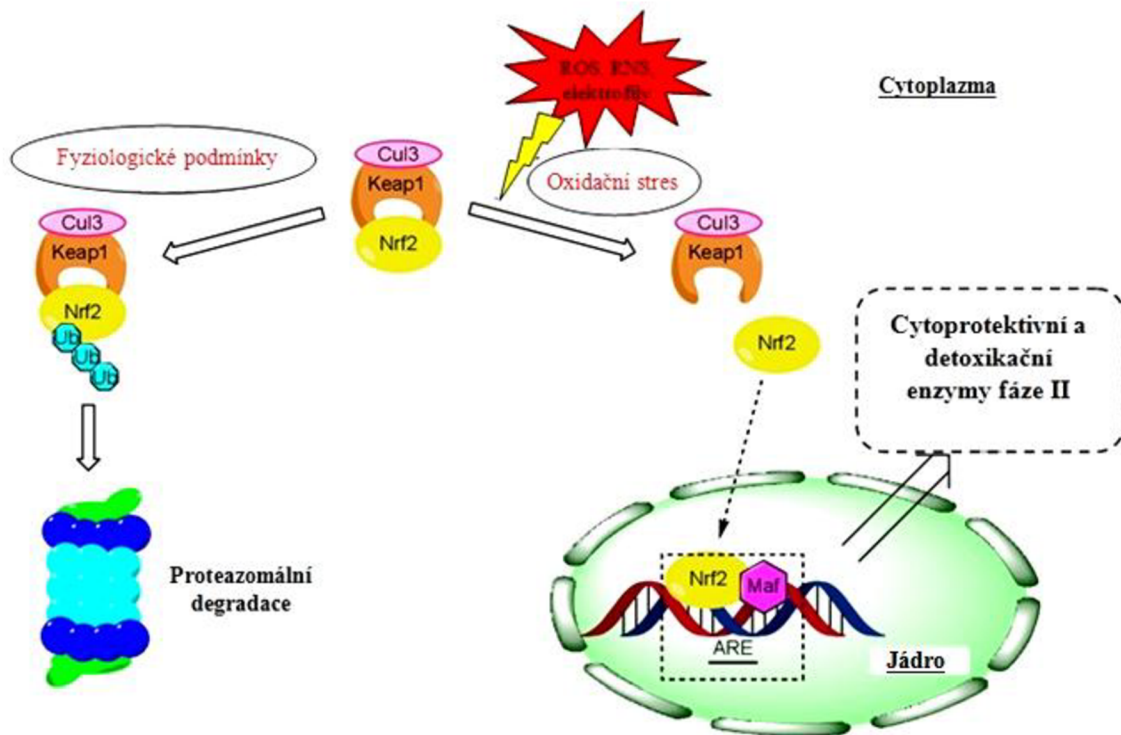


Schéma 9: Role komplexu Nrf2/Keap1 v buňce za fyziologických podmínek a při oxidačním stresu.⁹⁹

Příklady některých enzymů exprimovaných pomocí Nrf2:

NAD(P)H:chinon oxidoreduktáza 1 (Nqo1)¹⁰⁰, hem oxygenáza-1 (HO-1)¹⁰¹, glutamát-cystein ligáza (Gcl)⁹⁸, glutathion-S-transferáza⁹⁸, mikrozomální epoxid hydroláza (Eh-1)¹⁰², sulfiredoxin 1¹⁰³.

3.4. Metody pro studium thiolů a elektrofilních léčiv

3.4.1. Elektrochemie

Elektrochemická analýza je vhodná pro sledování interakcí biomakromolekul (DNA, proteinů, polysacharidů) s nízkomolekulárními ligandy (léčiva, inhibitory enzymů apod.). K interakci mezi biopolymerem a ligandem může dojít buď přímo na povrchu pracovní elektrody, kdy je elektroda nejprve modifikována biopolymerem a následně ponořena do roztoku s ligandem, nebo ještě před analýzou přímo v roztoku. V případě prvního postupu hrozí riziko strukturní změny biopolymeru po adsorpci na povrch elektrody ještě před tím, než dojde k interakci s ligandem.¹⁰⁴

Použití elektrochemie u peptidů a proteinů závisí na obsahu elektrochemicky aktivních AK zbytků ve struktuře daných molekul. Pro tyto účely jsou hlavní cystein, thyrosin a tryptofan. Pokud není potřeba značení, využívá se zejména rtuťových a uhlíkových elektrod. Ke rtuťovým elektrodám mají vysokou afinitu sirné aminokyseliny, které na jejím povrchu tvoří elektrochemicky redukovatelnou Hg-S vazbu.¹⁰⁵ U moderních chronopotenciometrických metod lze měřit tzv. katalytický pík (pík H), který souvisí s katalytickým vylučováním vodíku a lze jej využít při sledování změn struktury proteinů (viz CPSA).¹⁰⁶

Na strukturní změny v proteinech a jejich komplexech může mít vliv čas, po který jsou adsorbované proteiny vystaveny vlivu elektrického pole. Protein může po určitém čase denaturovat nebo se mohou komplexy proteinu s DNA nebo dalším proteinem rozpadat.^{107, 108} Elektrochemické postupy musí být těmto nepříznivým vlivům přizpůsobeny.

a) Cyklická voltametrie (CV)

Výchozí metodou pro všechny elektrochemické experimenty je cyklická voltametrie. Poskytuje řadu informací - koncentraci zkoumané látky, termodynamické vlastnosti oxidačně-redukčních procesů, informace o kinetice přenosu elektronů nebo o adsorpčně-desorpčním chování studovaných molekul. Velký význam má obecně při studiu reverzibility oxidačně-redukčních procesů.¹⁰⁹

Je to potenciostatická metoda, měří tedy proud I procházející pracovní elektrodou v závislosti na aplikovaném potenciálu E . Určitá hodnota vkládaného potenciálu způsobí elektrochemickou přeměnu (oxidaci či redukci) v roztoku a zaznamenají se změny proudu. K růstu proudu dochází jen do té doby, dokud úbytek analytu v okolí elektrody je kompenzován difúzí z roztoku. Poté klesá a následně se elektroda polarizuje v opačném směru a měří se druhá větev cyklického voltamogramu.¹¹⁰

Příkladem použití cyklické voltametrie je odlišení nativního a denaturovaného hovězího sérového albuminu (BSA) na modifikované rtuťové kapkové elektrodě (HMDE).¹¹¹

Metoda byla také využita pro stanovení antioxidační kapacity v plazmě, tedy stanovení nízkomolekulárních antioxidantů na základě jejich redukčních schopností.¹¹²

b) Chronopotenciometrická analýza s konstantním proudem (CPSA)

Tato metoda patří mezi galvanostatické techniky, které spočívají v měření změny potenciálu v čase po aplikaci konstantního proudu na pracovní elektrodu. Vložený proud určuje tok náboje přes rozhraní elektroda/roztok. V průběhu elektrochemické přeměny pozorujeme zpomalení změny potenciálu E v čase a po proběhnutí reakce se potenciál rychle přesune na hodnotu, při které dochází k jinému oxidačně-redukčnímu procesu. Pro snadnější hodnocení dat se vytváří závislost $(dE/dt)^{-1}$ na potenciálu pracovní elektrody E . Má velké výhody při analýze proteinů - dobré rozlišení píků, možnost provádět analýzy za přítomnosti kyslíku, měření v negativních potenciálech.¹¹³

Metoda byla využita např. při analýze oxidačně-redukčních vlastností lidského sérového albuminu a jeho vazby s nitroolejovou kyselinou ($\text{NO}_2\text{-OA}$), zástupcem nitroderivátů nenasycených MK. Nitroskupina kyseliny podléhá elektrochemické redukci, která se v grafu projeví jako redukční pík při určitém negativním potenciálu. Sledováním závislosti výšky píku na poměru koncentrací $\text{NO}_2\text{-OA:HSA}$ byl zjištěn poměr, v jakém tyto dvě látky spolu reagují.¹¹⁴

3.4.2. Chromatografie

Obecně se chromatografie používá pro zjištění přítomnosti a koncentrace složek směsi, případně jejich separaci na základě distribuce mezi stacionární a mobilní fází. Často používanou chromatografickou technikou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC/MS).

Vysokoúčinné kapalinové chromatografie lze typicky využít při detekci nízkomolekulárních thiolů (cystein, homocystein, homocystin, GSH). Po chemické redukci oxidovaných thiolů lze kvantifikovat také obsah redukovaných a oxidovaných thiolů, nebo celkový obsah thiolů ve vzorku.¹¹⁵

3.4.3. Spektrometrie

a) Hmotnostní spektrometrie

Měření interakcí na základě molekulové hmotnosti je moderní a často používaný přístup. Metody a podmínky hmotnostní spektrometrie (MS) se dále vyvíjí a zdokonalují, lze tak měřit molekulové hmotnosti komplexů bez narušení nekovalentních interakcí. Hmotnostní spektrometrie umožňuje tedy identifikovat vznik daného komplexu.¹¹⁶

Jedním z příkladů detekce pomocí hmotnostní spektrometrie je měření reakce thiol-blokujících elektrofilů jodacetamidu, N-ethylmaleimidu a methylmethanthiosulfonátu s kyselinou sulfonovou a dimedonem. Na základě hmotnostních spekter byla zkoumána náchylnost vzniklých produktů k redukci činidly DTT nebo kyselinou askorbovou.¹¹⁷

Na syntetickém dekaeptidu a na plazmatickém glykoproteinu (von Willebrandův faktor) bylo dokázáno, že lze využít MS k identifikaci polohy volných thiolových skupin. Využilo se značení pomocí maleimid-PEO2-biotinu (MPB), následně bylo provedeno proteolytické štěpení, purifikaci značených peptidů a MALDI hmotnostní spektrometrickou analýzu. Tato metoda je obecně vhodná pro velké proteiny, které poskytují vysoce komplexní hmotnostní spektra po štěpení na peptidy, bez potřeby dalšího obohacení vzorku. Lze jej použít i pro směsi proteinů, jelikož je spojená s elektroforetickou separací (viz Elektroforetické přístupy).¹¹⁸

b) UV-VIS spektrofotometrie

Existují spektrofotometrické přístupy, které využívají značek nebo sond, které jsou specifické pro interakci s danou aminokyselinou nebo spíše s danou funkční skupinou. Pro analýzu thiolových skupin proteinů je typický tzv. Ellmanův reagent (5,5'-dithio-bis(2-nitro)benzoová kyselina, DTNB). Obsahuje disulfidický můstek a po reakci s -SH skupinou se redukuje na thionitrobenzoovou kyselinu (TNB), která absorbuje světlo o vlnové délce 412 nm (schéma 10). Měřením absorbance lze tedy stanovit množství volných thiolových skupin ve vzorku.

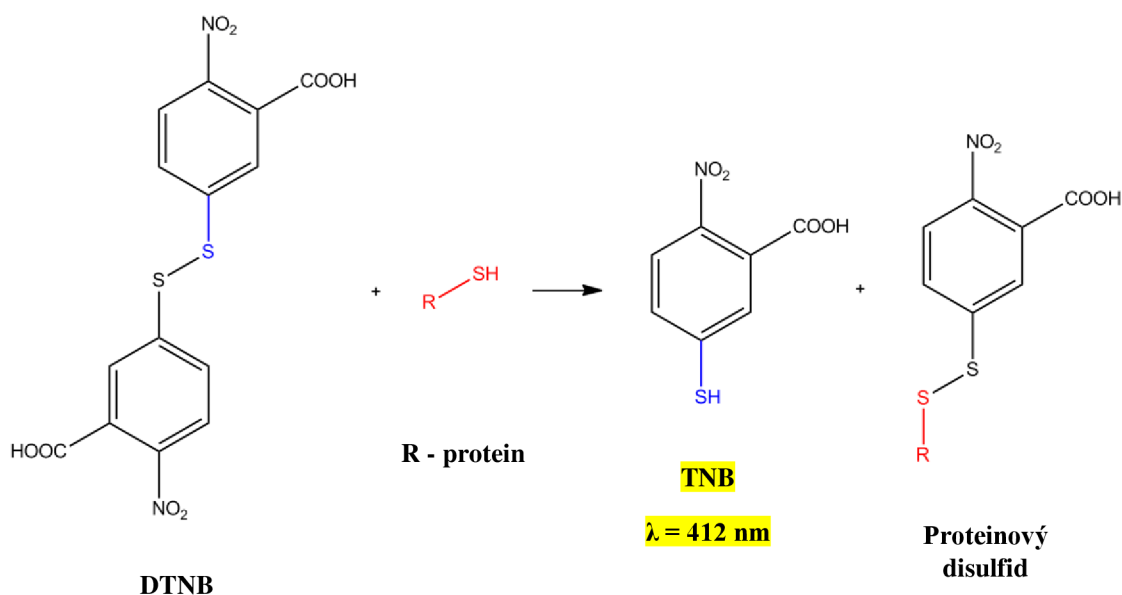


Schéma 10: Detekce thiolových skupin s využitím redukce Ellmanova reagentu

Kombinací UV-VIS spektrofotometrie a voltametrické techniky lze například studovat poměr thiol-kov v metaloproteinech Zn₇-metallothionein a Fpg protein, který obsahuje tzv. zinkový prst. Pro testování obsahu thiolů byl použit zmíněný Ellmanův reagent, a také 4,4'-dithiodipyridin (DTDP), který má obdobnou funkci. Ionty kovů byly stanoveny pomocí tenkovrstvé elektrochemické průtokové cely obsahující rtuťovou filmovou elektrodu (NCMFE).¹¹⁹

3.4.4. Elektroforetické přístupy

Tento soubor separačních metod dělí látky na základě jejich rozdílné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli. Podmínky elektroforézy pak upřesňují dělení vzhledem k velikosti molekul, velikosti náboje, molekulové hmotnosti apod.

Pro měření posttranslačních modifikací proteinových thiolů byla použita gelová 2D elektroforéza po značení maleimidovými barvivami na separaci proteinů. Jako vzorky byly použity buňky plicního epitelu a zkoumán byl redoxní stav cysteinových thiolů na jednotlivých proteinech.¹²⁰

Dalším příkladem využití elektroforetických metod je analýza nízkomolekulárních thiolů vázaných na lidský sérový albumin. K izolaci a čištění albuminu posloužila SDS-PAGE (elektroforéza na polykrylamidovém gelu s využitím dodecylsulfátu sodného) a k detekci a kvantifikaci všech pěti thiolů (cystein, homocystein, cysteinylglycin, glutamylcystein a glutation) se využilo citlivé metody, kapilární elektroforézy (CE). Díky citlivosti CE se podařilo změřit všechny thiole z pouze 3 µg albuminu.¹²¹

3.5. Studie biologické aktivity elektrofilů

a) T-REX

V roce 2014 Evropská léková agentura schválila léčivo s názvem Tecfidera, které se podává pacientům s roztroušenou sklerózou, neurdegenerativním onemocněním postihujícím miliony lidí po celém světě. Choroba postihuje myelinovou vrstvu, která funguje jako ochranná izolace nervových vláken.¹²²

Aktivní složkou tohoto léku je dimethylfumarát. U této sloučeniny se předpokládá, že moduluje imunitní systém, a působí tak jako protizánětlivé léčivo, které zmírňuje příznak roztroušené sklerózy. Dimethylfumarát však patří do třídy reaktivních elektrofilů, což je třída sloučenin, která není pro tvorbu léků dostatečně prozkoumaná. Hlavním problémem je, že reaktivní elektrofilů často interagují i s jinými biologickými cíli, než je ten zamýšlený, a mohou vykazovat nežádoucí až toxické účinky.¹²²

Vznik techniky zvané T-REX - „Targetable Reactive Electrophiles and Oxidants“, v překladu Cílené reaktivní elektrofilů a oxidanty, znamenal významný průlom ve studiu účinků reaktivních elektrofilů v těle. Technika byla publikovaná v roce 2016 a spočívá v uvolnění specifického elektrofilu do cílového proteinu, důsledky interakce se pozorují v prostoru a čase v živých buňkách. Byla použita k systematickému zkoumání interakcí elektrofilního dimethylfumarátu v léku Tecfidera a toho, jak tyto interakce vyvolávají imunomodulační účinky léku.¹²²

Vědci se zaměřili zejména na protein Keap1, známý supresor rakoviny a metastáz a potenciální vazebný cíl pro dimethylfumarát. Cílením tohoto proteinu reaktivními elektrofilů se zjistilo, že některé z nich spouští signální dráhu, vedoucí k apoptóze neutrofilů a makrofágů. Pomocí metody T-REX se takto přišlo také na cílení proteinů, o kterých se dříve v souvislosti s lékem Tecfidera neuvažovalo. Po odstranění těchto proteinů vědci zjistili, že protizánětlivé účinky Tecfidery byly tímto také odstraněny.¹²²

b) „Cysteamine assay“ - hodnocení bioaktivních elektrofilů

Projekt s názvem „Cysteamine assay“ studuje reaktivitu tří elektrofilních aktivátorů Nrf2 signální dráhy - nitroolejové kyseliny, 4-hydroxy-2-nonenalu a sulforafanu - s thiolovou skupinou a aminoskupinou cysteaminu (2-aminoethanthiolu). Za použití elektrochemických, fotometrických a spektrometrických technik byla zkoumána kinetika těchto reakcí a reaktivita daných látek s -SH skupinou cysteaminu klesá v pořadí: 4-hydroxy-2-nonenal > nitroolejová kyselina > sulforafan. Nicméně, aktivace genové exprese závislé na Nrf2 v buňkách klesala v opačném pořadí: sulforafan > nitroolejová kyselina > 4-hydroxy-2-nonenal. Výsledky jsou užitečné pro další studium reaktivity těchto látek na molekulární úrovni.¹²³

4. Experimentální část

4.1. Materiál a chemikálie

4.1.1. Chemikálie

Většina chemikálií (včetně vzorků L-cysteinu, cystinu, GSH a GSSG) byla pořízena od firmy Merck (Darmstadt, Germany) a BioRad Laboratories (Hercules, CA, USA). Ekvimolární směs izomerů NO₂-OA (9-NO₂-OA a 10-NO₂-OA) v podobě methanolových zásobních roztoků nám poskytla laboratoř Bruce Freemana (University of Pittsburgh, USA). NO₂MAG (10-nitromonoacyl glycerol) byl syntetizován a zprostředkován výzkumnou skupinou pana doktora Lukáše Jedináka (Katedra organické chemie, PřF UP, Olomouc, ČR). Čistota látek v roztocích je vyšší než 98 %. Kyselina olejová (OA) byla zakoupena od firmy Merck KGaA (Darmstadt, Germany) a monoacylglycerol (MAG, monoolein) od firmy Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA). Všechny roztoky byly připraveny s použitím Milli-Q vody (18,2 MΩ * cm⁻¹), Millipore, Bedford, MA, USA.

Další použité chemikálie:

Heptahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Na₂HPO₄ · 7H₂O), monohydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (NaH₂PO₄ · H₂O), hydrogenuhličitan amonný (NH₄HCO₃), tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina (DTNB), trihydrát octanu sodného (CH₃COONa · 3H₂O), methanol (CH₃OH), kyselina octová (CH₃COOH), kyselina fosforečná (H₃PO₄), kyselina trihydrogenboritá (H₃BO₃), hydroxid sodný (NaOH), metanol (CH₃OH) deionizovaná voda (dd H₂O).

4.1.2. Roztoky

4.1.2.1. Pufry pro spektrofotometrická měření

Fosfátové pufry: 0,1 M Na₂HPO₄ · 7H₂O + 0,1 M NaH₂PO₄ · H₂O

Britton-Robinsonův pufř: 0,04 M H₃PO₄ + 0,04 M CH₃COOH + 0,04 M H₃BO₃ + 0,1 M NaOH

4.1.2.2. Zásobní roztoky

50 mM octan sodný - 1,57 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ doplněno dd H_2O do 200 ml

Roztok DTNB - na 5 ml 50 mM octanu sodného se rozpustí 3,96 g DTNB (vždy čerstvý)

1 M Tris/HCl pH 8,0 - 24,23 g Tris, konc. HCl na úpravu pH, doplněno dd H_2O do 200 ml

Cystin - $c = 1 \text{ mg/ml}$ ($c_M = 4,16 \text{ mmol/l}$)

L-cystein - $c = 1 \text{ mg/ml}$ ($c_M = 8,25 \text{ mmol/l}$)

GSSG - $c = 1 \text{ mg/ml}$ ($c_M = 1,63 \text{ mmol/l}$)

GSH - $c = 1 \text{ mg/ml}$ ($c_M = 3,25 \text{ mmol/l}$)

Maleimid - $0,5 \text{ mg/ml}$ ($c_M = 5,15 \text{ mmol/l}$)

OA - $c_M = 5 \text{ mmol/l}$

NO₂OA - $c_M = 4,95 \text{ mmol/l}$

MAG - $c_M = 2,93 \text{ mmol/l}$

NO₂MAG - $c_M = 3,28 \text{ mmol/l}$

4.1.3. **Přístrojové vybavení**

pH metr: HI 2211 pH/ORP (HANNA instruments, IT)

analytické váhy: AX 105 Delta-Range, Mettler-Toledo (Greifensee, Švýcarsko)

centrifuga: Eppendorf minispin (Eppendorf, Německo)

magnetická míchačka: IKA RH basic KT/C (Slabo, Česká republika)

termomixér: Termomixer Comfort (Eppendorf, Německo)

spektrofotometr Infinite M200 Pro (Tecan, Švýcarsko)

automatické pipety

4.2. Metody

4.2.1. Ellmanova reakce

Ke spektrofotometrickému stanovení obsahu volných thiolových skupin jsem využila 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinu (DTNB), tzv. Ellmanovo činidlo. DTNB se v přítomnosti reaktivní thiolové skupiny či thiolátu přeměňuje na 5-thio-2-nitrobenzoovou kyselinu (TNB), která absorbuje viditelné světlo při 412 nm (schéma 10). Čím vyšší hodnotu absorbance při vlnové délce 412 nm pozorujeme, tím více volných thiolových skupin detegujeme ve vzorku. Pokles absorbance nám ukazuje vazbu elektrofilu na zkoumanou thiolovou skupinu nukleofilu.

a) Stanovení závislosti absorbance aduktů na koncentraci ligandu

Na začátku jsem změřila absorbance vzorků samotných nízkomolekulárních thiolů (L-cysteinu, cystinu, GSH, GSSG). Dále jsem je nechala interagovat se specifickou sondou maleimidem, pak s elektrofilu (NO_2OA , NO_2MAG) a jejich parentními molekulami (OA, MAG). Výsledky jsou zpracovány do grafů (viz Přílohy).

V následujících tabulkách (tab. 1 - tab. 5) jsou vypsány potřebné objemy odebírané ze zásobních roztoků pro vytvoření vzorků. Každý vzorek byl připraven ve dvou pufrech o pH nižším a o pH vyšším než je hodnota pK_A zkoumané thiolové skupiny, a to vždy do objemu 1000 μl . Mohla jsem tak sledovat, zda je interakce s ligandy závislá na pH, tedy na stavu -SH skupiny (rozdíly v absorbanci).

Tab. 1: Cystin - koncentrační řada

c_{cystin} ($\mu\text{mol/l}$)	V_{cystin} (μl)	$V_{\text{celk.}}$ (μl)
0	0	1000
5	1,2	
10	2,4	
15	3,61	
25	6,01	
50	12,02	
100	24,04	

Tab. 2: Cystein - koncentrační řada

c_{cystein} ($\mu\text{mol/l}$)	V_{cystein} (μl)	$V_{\text{celk.}}$ (μl)
0	0	1000
5	1,21	
10	2,42	
15	3,63	
25	6,053	
50	12,11	
100	24,21	

Tab. 3: GSSG - koncentrační řada

c_{GSSG} ($\mu\text{mol/l}$)	V_{GSSG} (μl)	$V_{\text{celk.}}$ (μl)
0	0	1000
5	3,07	
10	6,13	
15	9,20	
25	15,34	
50	30,67	
100	61,35	

Tab. 4: GSH - koncentrační řada

c_{GSH} ($\mu\text{mol/l}$)	V_{GSH} (μl)	$V_{\text{celk.}}$ (μl)
0	0	1000
5	1,54	
10	3,08	
15	4,62	
25	7,69	
50	15,38	
100	30,77	

Tab. 5: Ligandy - potřebné koncentrace a objemy pro inkubaci s thioley

c_{ligand} ($\mu\text{mol/l}$)	V_{maleimid} (μl)	V_{OA} (μl)	$V_{\text{NO}_2\text{OA}}$ (μl)	V_{MAG} (μl)	$V_{\text{NO}_2\text{MAG}}$ (μl)	$V_{\text{celk.}}$ (μl)
5	0,97	1	1,01	1,7	1,52	1000
10	1,94	2	2,02	3,4	3,04	
20	3,88	-	-	-	-	
25	4,855	5	5,05	8,5	7,6	
50	9,7	10	10,1	17	15,2	

b) Kinetická měření - stanovení závislosti absorbance na čase

Pomocí Ellmanova činidla lze také studovat, jak je vazba elektrofilu na thiolovou skupinu nukleofilu stabilní v čase.

V průběhu jedné hodiny jsem měřila vzorky GSSG a GSH s jednotlivými ligandy a sledovala, zda se mění hodnoty absorbance. V následujících tabulkách jsou vypsány koncentrace a objemy v jednotlivých vzorcích. Byly opět vytvořeny dvě sady vzorků doplněné puftrem o pH vyšším a nižším než je pK_A -SH skupiny glutationu.

Měření absorbance jsem provedla v časech 5, 15, 30 a 60 minut od přípravy vzorků.

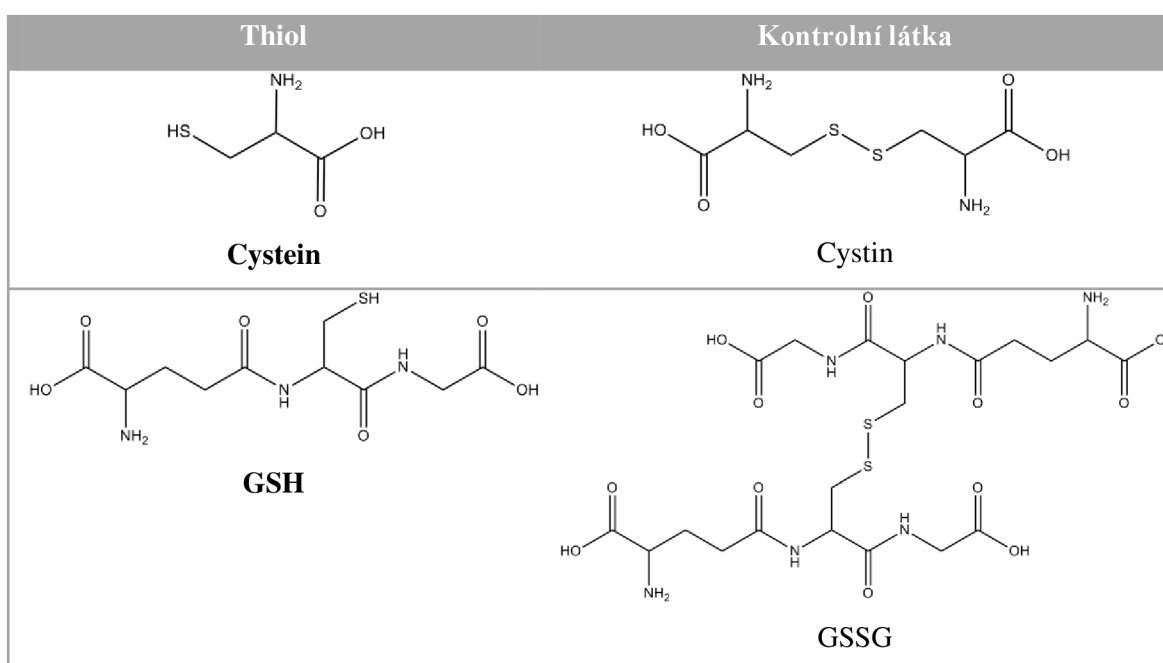
Tab. 6: Koncentrace a objemy thiolů a ligandů na inkubaci

$c_{\text{GSSG/GSH}}$ ($\mu\text{mol/l}$)	$V_{\text{GSSG/GSH}}$ (μl)	c_{ligand} ($\mu\text{mol/l}$)	V_{maleimid} (μl)	V_{OA} (μl)	$V_{\text{NO}_2\text{OA}}$ (μl)	V_{MA} G (μl)	$V_{\text{NO}_2\text{MAG}}$ (μl)	$V_{\text{celk.}}$ (μl)
50/50	30,67 /15,38	12,5	2,43	2,5	2,525	4,25	3,8	1000
		25	4,86	5	5,05	8,5	7,6	
		50	9,72	10	10,1	17	15,2	

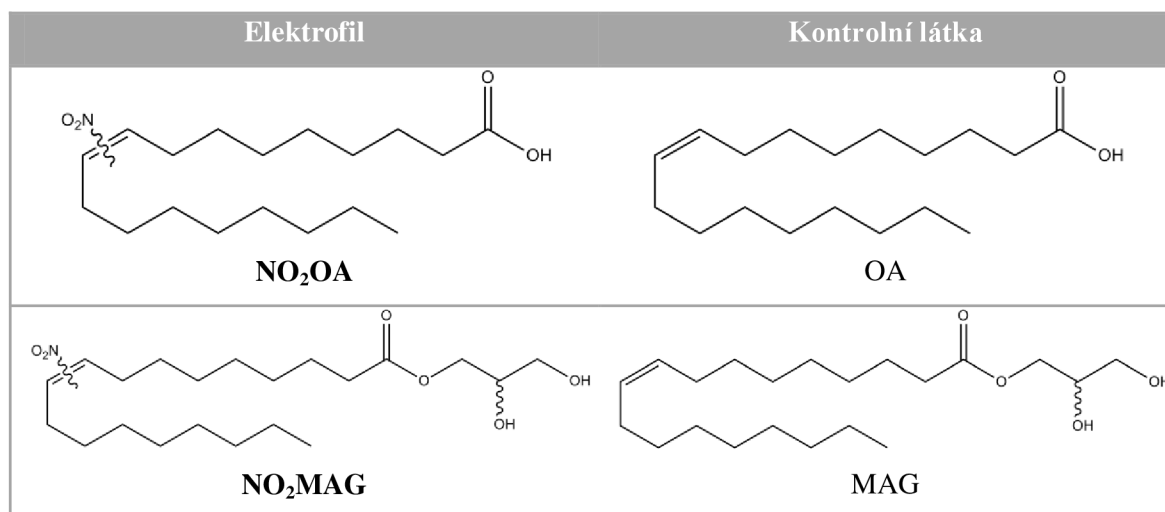
Každý vzorek pro spektrofotometrické stanovení obsahoval: 200 μl vzorku, 200 μl 1M Tris-Cl pH 8, 100 μl DTNB. Vzorky byly měřeny v tripletu na mikrotitrační destičce, do každé jamky jsem nanasla 80 μl směsi. Od výsledné absorbance byla vždy odečtena absorbance blanku (200 μl pufru, 200 μl 1M Tris-Cl pH 8, 100 μl DTNB) a vypočteny směrodatné odchylky, jež jsou zaznamenány do grafů (viz Přílohy).

V následujících tabulkách můžeme vidět struktury jednotlivých zkoumaných nukleofilů (tab. 7), elektrofilních nitroalkenů (tab. 8) a jejich kontrol.

Tab. 7: Struktury zkoumaných nízkomolekulárních thiolů



Tab. 8: Struktury zkoumaných elektrofilních ntroakenů a jejich kontrol



5. Výsledky

Výsledky ukazují interakci vybraných nízkomolekulárních thiolů (cystein, GSH) s elektrofilními nitroalkeny (NO₂OA, NO₂MAG). Jako kontroly byly vybrány jejich parentní molekuly (OA, MAG). Pro studium interakcí byla zvolena Ellmanova spektrofotometrická metoda, založená na detekci volných -SH skupin (viz 4.2.1.). Grafická vyjádření výsledků jsou k dispozici v přílohách.

5.1. L-cystein

Pro optimalizaci spektrofotometrické metody s použitím Ellmanova činidla jsem nejprve provedla měření absorbance samotného cysteinu v 0,1M Na-fosfátovém pufru o pH 7,4 (graf č. 1). Jako pozitivní kontrola byl vybrán maleimid. Maleimid reaguje specificky s -SH skupinami nukleofilů mechanismem Michaelovy adice (schéma 11) a je vhodný pro optimalizaci Ellmanovy metody, tedy detekci volných thiolových skupin v roztoku. Z grafu je zřejmá lineární závislost absorbance na koncentraci volných thiolových skupin cysteinu (graf č. 1). Cystin jakožto dimer cysteinu obsahuje místo volné thiolové skupiny disulfidický můstek, neumožňuje tvorbu TNB, absorbance je tedy minimální.

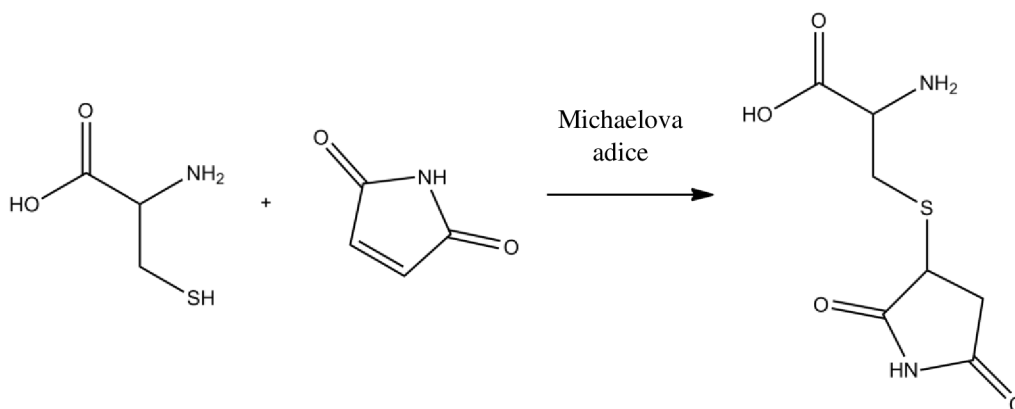


Schéma 11: Michaelova adice maleimidu na cystein

Totožné měření jsem provedla v mírně zásaditém 0,1M Na-fosfátovém pufru (pH 8,5). Za těchto podmínek se thiolová skupina cysteinu nacházela v deprotonizovaném stavu, jelikož pH pufru 8,5 je vyšší než hodnota pK_A thiolové skupiny cysteinu, pohybující se kolem 8,0-8,3¹²⁴ (graf č. 2). Bylo ukázáno, že se změnou pH prostředí nedošlo k výrazným změnám absorbance. Porovnání můžeme vidět v grafu č. 3, kde je vynesena koncentrační řada cysteinu (v rozmezí 5-100 μmol/l) s 50μM maleimidem jak v pH 7,4, tak v pH 8,5., Rozdíly absorbancí jsou minimální.

Následovalo měření vzorků cysteinu s kyselinou olejovou. Jelikož OA neobsahuje ve své struktuře elektron-akceptorové místo, byla použita jako negativní kontrola. V grafu č. 4 vidíme, že s rostoucí koncentrací OA v obou zvolených pH prostředí nedochází ke změně hodnot absorpčních Ellmanovy reakce v přítomnosti cysteinu.

Předpokladem měření interakce cysteinu s kyselinou nitroolejovou (schéma 12) byl pokles absorbance vlivem snížení počtu volných thiolových skupin. V grafu č. 5 jsem vynesla závislost koncentrační řady cysteinu (v rozmezí 5-100 $\mu\text{mol/l}$) na 50 μM NO_2OA . Bylo ukázáno, že pro Michaelovu adici NO_2OA na cystein je nezbytné, aby byla thiolová skupina ve formě thiolátu ($-\text{S}^-$), tedy přístupnější pro Michaelův akceptor. V grafu č. 5 pozorujeme mírný pokles absorbance související s interakcí NO_2OA a cysteinu při pH 8,5.

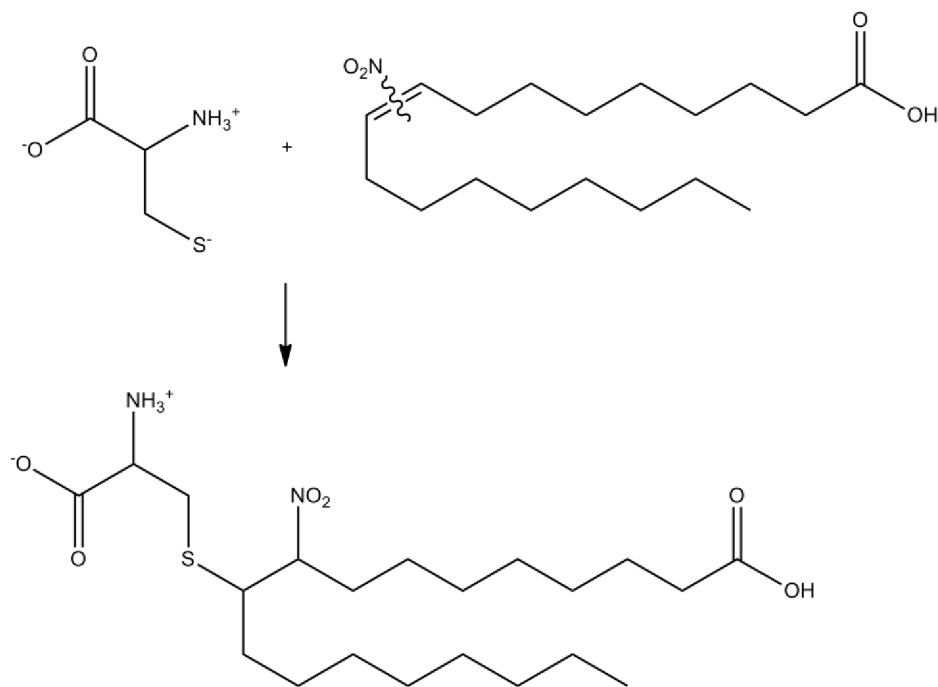


Schéma 12: Michaelova adice NO_2OA na cystein

Dále zkoumanou elektrofilní molekulou byl glycerolester kyseliny nitroolejové (NO_2MAG). Jako negativní kontrolu pro NO_2MAG jsem vybrala opět její parentní molekulu, MAG. Grafy č. 6 a 7 jsou tvořené stejně jako předešlé grafy č. 4 a 5.

5.2. Glutathion

a) Závislost absorbance na koncentraci ligandu

Nejprve jsem ověřila linearitu Ellmanovy spektrofotometrické reakce pro redukovaný (GSH) a oxidovaný (GSSG) glutathion (graf č. 8). Podobně jako u cysteinu bylo také potřeba provést kontrolní měření GSH s maleimidem (schéma 13). Grafy č. 8 a 9 znázorňují snižující se hodnoty absorbance vzorků s rostoucí koncentrací maleimidu, a to v pH 7,4 (graf č. 8) i v pH 9,5 (graf č. 9) v porovnání se samotným GSH. V grafu č. 9 si můžeme všimnout, že v zásaditém pH (pH 9,5) je glutathion plně saturován maleimidem. Viditelné je snížení absorbance u vzorku v koncentračním poměru 2:1 (GSH:maleimid) na méně než polovinu absorbance GSH. Graf č. 10 ukazuje porovnání výsledků GSH (10-100 $\mu\text{mol/l}$) s 50 μM maleimidem v pH 7,4 a 9,5.

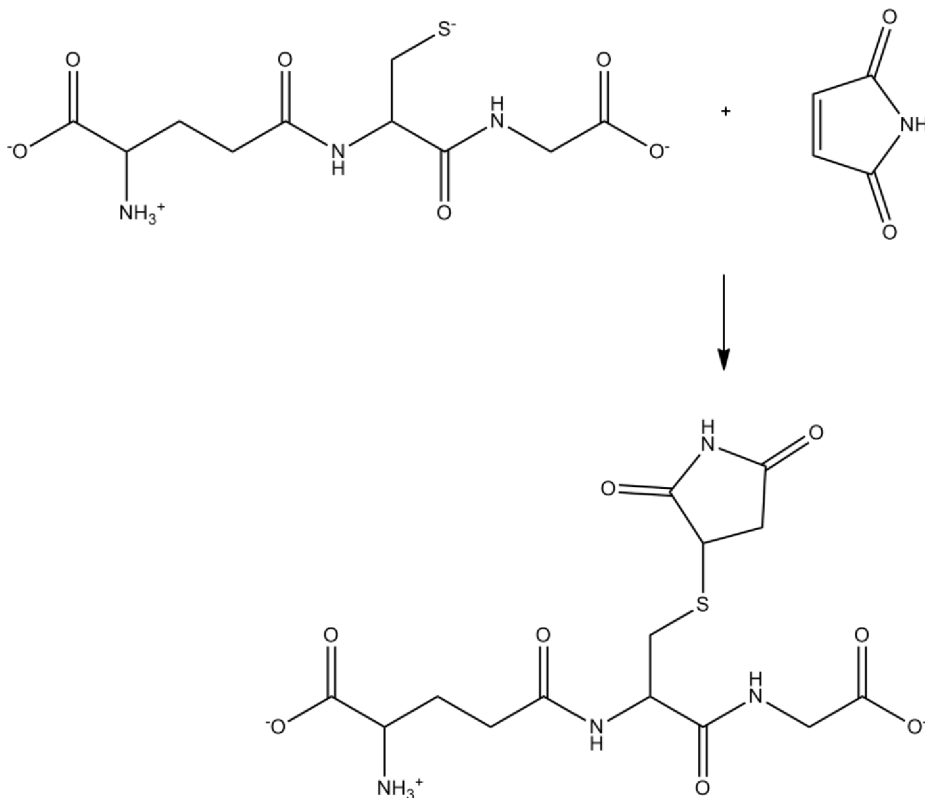


Schéma 13: Michaelova adice maleimidu na glutathion

Podobně jsem provedla měření s vybranými elektrofilními nitroalkeny (NO_2OA , NO_2MAG) a negativními kontrolami (OA, MAG).

Předpokladem pro měření GSH s OA byly minimální změny absorbance, což se prokázalo při měření v pH 7,4 (graf č. 11). K mírným změnám dochází při pH 9,5. Takové pH vytváří prostředí, ve kterém jsou pravděpodobně všechny thiolové skupiny ve formě thiolátu, jelikož pK_A thiolové skupiny GSH je okolo 9,1.¹²⁵ Jak je popsáno výše, OA není elektrofilní molekulou a s GSH tedy nereaguje. Pozorované změny absorbancí mohou nastat v důsledku amfifilního charakteru studovaných ligandů, souvisejícího s tzv. kritickou micelární koncentrací (CMC). Vysvětlení tohoto jevu se věnuji v diskusi.

Ke změnám absorbance Ellmanovy reakce při pH 7,4 téměř nedocházelo ani při měření GSH s NO_2OA (graf č. 13, schéma 14), v tomto pH se thiolová skupina GSH vyskytuje v méně reaktivním protonizovaném stavu. V pH 9,5 při koncentračním poměru 1:1 (GSH: NO_2OA) hodnota absorbance Ellmanovy reakce klesla na poloviční hodnotu v porovnání se samotným GSH (graf č. 14). Usuzuji z toho, dochází k saturaci zhruba poloviny molekul GSH.

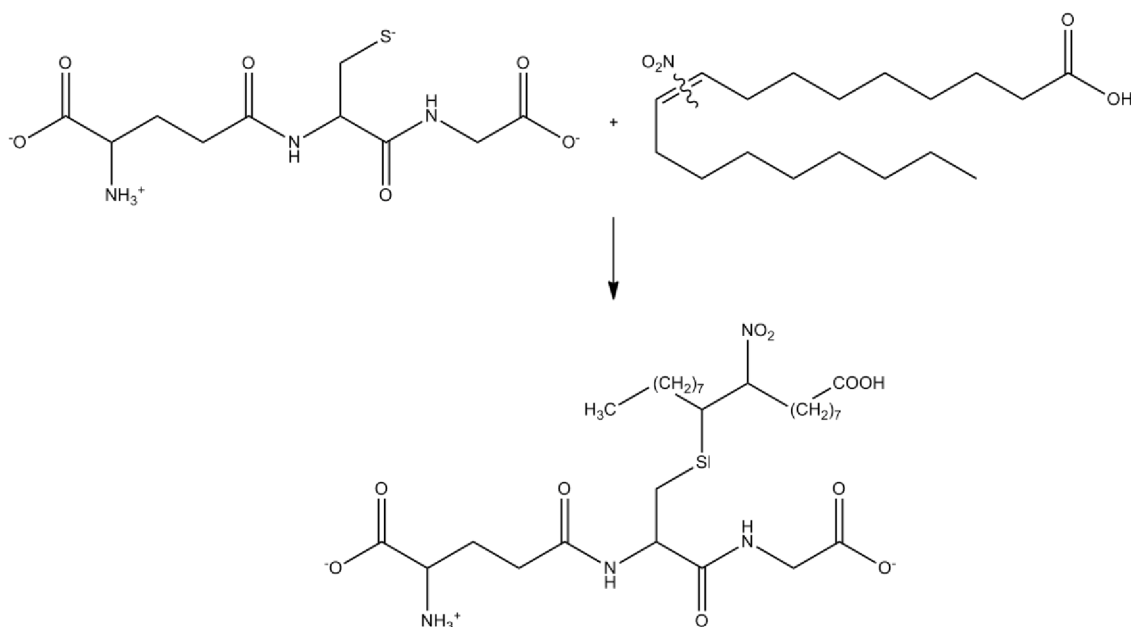


Schéma 14: Michaelova adice NO_2OA na glutathion

Výsledky měření interakce s glycerolesterem kyseliny olejové (MAG) a GSH ukázaly nulový vliv na hodnoty absorbancí jak ve fyziologickém pH (pH 7,4), tak v zásaditém pH (pH 9,5), (graf č. 15 a 16). MAG představuje stabilizovanou formu mastných kyselin, jež se vyskytuje např. v prostoru buněčných membrán, jeho reaktivita je proto velice nízká. ⁵

Stejně tak při pH 7,4 studuji vazbu GSH s esterem kyseliny nitroolejové (NO₂MAG), který obsahuje elektron-akceptorové místo a zastupuje tak nitroderiváty stabilizovaných forem MK, které mohou být také produktem biosyntézy (schéma 15). Protonizovaná forma thiolové skupiny GSH neumožňuje vazbu s NO₂MAG, ke změnám absorbance tedy téměř nedochází (graf č. 17). Graf č. 18 nám ukazuje interakci GSH s NO₂MAG ve vyšším pH prostředí (pH 9,5), kdy se thiolová skupina GSH nachází v deprotonovaném stavu schopném interagovat s NO₂MAG. Interakce GSH s NO₂MAG je pozorovaná snížením absorbancí Ellmanovy reakce v porovnání se samotnou spektrofotometrickou odpovědí GSH.

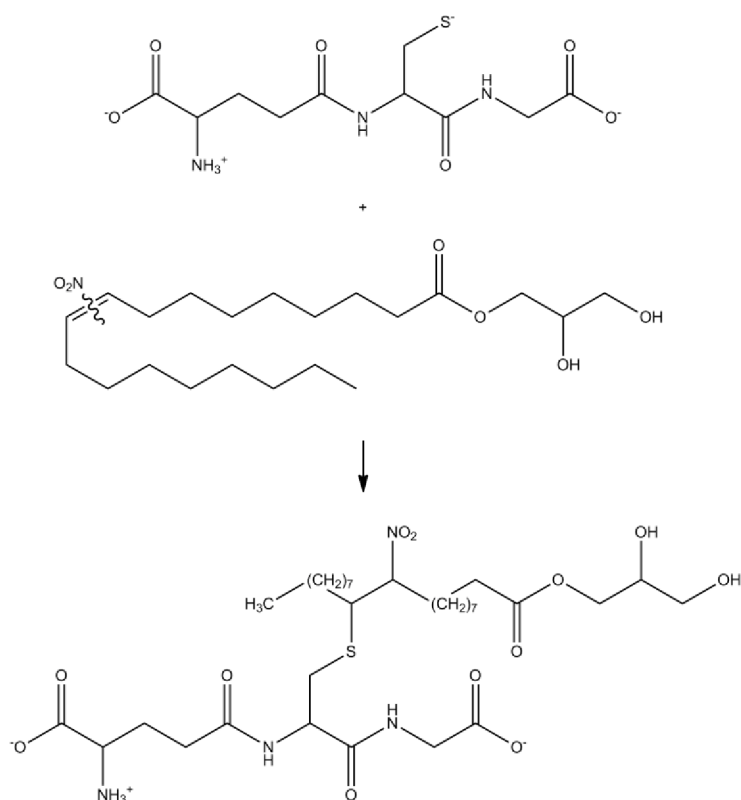


Schéma 15: Michaelova adice NO₂MAG na glutathion

b) Kinetická měření

Cílem kinetického měření bylo zjistit, zda se hodnoty absorbancí u jednotlivých vzorků GSH s elektrofilu mění či nemění s časem. Takové výsledky mohou vypovídat více o charakteru dané interakce. Pro přehlednější vyhodnocení jsou následující grafy vyjádřeny v procentech, 100% odpovídá hodnotě absorbance Ellmanovy reakce samotného GSH. Sleduji tedy, o kolik procent klesla absorbance daného vzorku proti absorbanci samotného GSH v čase. Pokles absorbance souvisí se schopností GSH interagovat s ligandem. Dále měřím vždy vzorky, kde jsou výchozí látky v koncentračních poměrech GSH:ligand 1:0,25; 1:0,5; 1:1. Kinetická měření jsou provedena do 60 minut od začátku inkubace.

Grafy č. 19 a 20 ukazují kinetická měření GSH s maleimidem v pH 7,4 a 9,5, pokles hodnot absorbancí Ellmanovy reakce u GSH po inkubaci s rostoucí koncentrací maleimidu v čase v porovnání se samotným GSH. Lze říci, že Michaelova adice maleimidu na thiolovou skupinu GSH proběhla zhruba do 20 minut od začátku inkubace.

Kinetickým měřením Ellmanovy reakce GSH s OA bylo zjištěno, že nedochází ke změnám měřených absorbancí v čase, čímž bylo potvrzeno, že k interakci OA s GSH nedochází ani po 60 minutách (graf č. 21 a 22).

V grafech č. 23 a 24 lze vidět procentuální pokles absorbance Ellmanovy reakce GSH po inkubaci s rostoucí koncentrací NO₂OA. K výraznějšímu procentuálnímu poklesu dochází při interakci GSH s NO₂OA v pH 9,5. S časem absorbance klesá u všech měřených vzorků, rozdíly jsou ale minimální. Nicméně výsledky značí, že nedochází k vyvázání NO₂OA z GSH.

Jak je popsáno v předešlých grafech, MAG je pro GSH nereaktivní molekulou (graf č. 25 a 26).

Graf č. 28 ukazuje, že interakce GSH s NO₂MAG probíhá v prostředí o pH 9,5 a minimální doba inkubace látek je 10-15 minut. Pokud je thiolová skupina GSH v deprotonované formě (-S⁻), po 15 minutách je GSH nitromonooleinem saturován zhruba z 80 %, jelikož absorbance klesla přibližně na 20 % absorbance samotného GSH. V neutrálním pH (pH 7,4) NO₂MAG s GSH interaguje pouze minimálně.

6. Diskuse a závěr

Oxidačně-redukční reakce jsou bezprostřední součástí buněčných procesů organismu. Elektrofilní a nukleofilní látky a další reaktivní molekuly si mezi sebou přenášejí elektrony, přičemž každý přenos má svůj význam a každá molekula zaujímá svoji úlohu. Vytváří se tak spolu s dalšími typy reakcí složitý komplexní systém, jehož cílem je za běžných podmínek buněčná homeostáza, rovnovážný stav. V tak komplikovaném prostředí však dochází neustále ke změnám a vychýlením z rovnováhy, což způsobuje nesčetná řada vnitřních i vnějších faktorů. Pro tuto diplomovou práci jsou podstatné zejména výkyvy nastávající vlivem nerovnoměrného rozložení reagujících látek, které mají určitý biologický význam. Vzniká oxidační stres, kterému se buňky brání spuštěním např. zánětlivých či destruktivních procesů.

Zabývám se zde látkami, které v buňkách přirozeně vznikají a regulují významné signální dráhy. Jde o nitrované deriváty nenasycených mastných kyselin. Vznikají neenzymatickou oxidací polynenasycených mastných kyselin oxidem dusnatým nebo jinými reaktivními formami dusíku. Jejich biosyntéza tedy závisí na dostupnosti těchto molekul a dostupnost těchto molekul závisí na působení oxidačních a antioxidačních činidel. Elektrofilní povaha nitrovaným mastným kyselinám umožňuje interagovat s aminokyselinovými zbytky peptidů a proteinů, tyto modifikace mohou negativně či pozitivně ovlivnit jejich funkce. Příkladem takové modifikace je interakce nitroderivátu mastné kyseliny s -SH skupinami chaperonu Keap1, proteinu, který je za normálních podmínek v komplexu s transkripčním faktorem Nrf2. Interakcí dochází k rozpadu komplexu a transportu Nrf2 do jádra, kde pokračují další mechanismy vedoucí k expresi genů cytoprotektivních enzymů.⁵

Konkrétními deriváty, kterým se v této práci věnuji, jsou kyselina nitroolejová a glycerolester kyseliny nitroolejové, tzv. nitromonoolein. Kyselina nitroolejová (9- nebo 10-nitro-9-*cis*-oktadecenová) je hojně se vyskytujícím a intenzivně studovaným zástupcem nitroalkenů, podobně jako např. kyselina nitrolinolová nebo kyselina nitroarachidonová.¹²⁶ Jejich přítomnost byla potvrzena v plazmě, červených krvinkách a moči.¹²⁶ Esterifikací do molekul lipidů jsou nitrované mastné kyseliny stabilizované. Buněčné membrány a lipoproteiny fungují jako rezervoáry nitrovaných mastných kyselin, odkud mohou být opět uvolněny působením esteráz a fosfolipáz.⁵

Nitroskupina je v důsledku vysoké elektronegativity jedním z nejsilnějších elektronových akceptorů. Nitroalkeny proto mají elektrofilní vlastnosti a mohou tak vstupovat do reakcí s nukleofily mechanismem Michaelovy adice (schéma 6).⁵ Nukleofily jsou například thiolové skupiny proteinů a peptidů. Thiolát interaguje s β -uhlíkem dvojně vazby nitroalkenu a vzniká tak nitroalkylderivat proteinu.

Tato reakce představuje reverzibilní kovalentní modifikaci s výrazným vlivem na strukturu a funkci proteinů. Produkty reakcí nitrovaných mastných kyselin s proteiny nebo s glutathionem byly detegovány v lidském organismu.¹²⁷ Protože intracelulární koncentrace redukovaného glutathionu je vysoká, předpokládá se, že se na něj bude vázat většina přítomných nitroalkenů. Metabolomická studie z roku 2009 ukázala, že velký podíl kyseliny nitroolejové podané nitrožilně myšim byl reverzibilně konjugován s glutathionem.¹²⁸ Kromě vysoké koncentrace má glutathion důležitou roli jako přímý antioxidant a regeneruje i další antioxidanty, a proto byl zvolen jako vhodný zástupce pro experimenty v této práci.

Experimentům s glutathionem však předcházelo měření interakce kyseliny nitroolejové a nitromonooleinu se samotným cysteinem. Cystein je aminokyselinou vyskytující se často v aktivních místech enzymů. Je zároveň součástí struktury tripeptidu glutathionu. Jedna molekula cysteinu tvoří s druhou molekulou cysteinu ochotně disulfidický můstek, proteiny a peptidy tak mohou mít prostřednictvím těchto aminokyselin definovanou terciární strukturu nebo tvořit dimery.

Pro výzkum interakčních studií nukleofilů s vybranými elektrofilními nitroalkeny byla využita spektrofotometrická Ellmanova metoda. Jak název napovídá, metoda využívá oxidačně-redukčních schopností tzv. Ellmanova činidla, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB). DTNB se v přítomnosti volné thiolové skupiny rozkládá za vzniku výrazně žluté 5-thio-2-nitrobenzoové kyseliny (TNB), která absorbuje viditelné světlo o vlnové délce 412 nm (schéma 10). Absorbance je přímo úměrná množství volných thiolových skupin zkoumané látky a Ellmanova metoda tedy slouží jako efektivní způsob pro jejich kvantifikaci v roztoku.

Za předpokladu, že kyselina nitroolejová a její esterifikovaná forma tvoří adukty s nízkomolekulárními thioley, jsem pomocí Ellmanovy metody mohla sledovat závislost těchto interakcí na reakčních podmínkách, zejména na pH prostředí.

Ellmanova metoda byla nejprve optimalizována pro aminokyselinu cystein v přítomnosti a absenci specifické sondy maleimidu. Maleimid je silně elektrofilní sloučenina a typický Michaelův akceptor, používá se často ke značení díky její specifické reakci s -SH skupinami.

Pro srovnání Ellmanovy odpovědi jsem jako negativní kontroly nízkomolekulárních thiolů využila jím odpovídající dimery, cystin a GSSG. Jak jsem popsala výše, thioly spolu ochotně tvoří disulfidické můstky, jsou proto díky své stabilitě ideální kontrolní látky, jelikož nepodléhají Michaelově adici. Kyselina nitroolejová a nitromonoolein jsou deriváty nenasycených mastných kyselin, a proto byly jako negativní kontroly těchto látek zvoleny příslušné mastné kyseliny, kyselina olejová a monoolein (monoacylglycerol, MAG), které neobsahují elektron-deficitní uhlík a nepodléhají Michaelově adici.

Cílem experimentů bylo sledovat změny absorbance za různých reakčních podmínek, konkrétně vliv pH a času. Ke sledování jsem použila koncentrační řady nízkomolekulárních thiolů (v rozmezí od 5 do 100 $\mu\text{mol/l}$) a vzorky ligandů v koncentracích od 5 do 50 $\mu\text{mol/l}$. Z grafů lze poté podle absorbancí usoudit, v jakém poměru spolu výchozí látky reagovaly.

Hodnoty pH pufrů jsem volila následovně: a) pH odpovídající fyziologickému prostředí plazmy, tedy pH 7,4 a b) pH pufru závislé na pK_A interagující thiolové skupiny ($\text{pH} > \text{pK}_A$). Hodnota pK_A je záporný dekadický logaritmus disociační konstanty a vyjadřuje „sílu“ kyseliny ve vodě. Zvolíme-li tedy pH prostředí vyšší než je hodnota pK_A dané funkční skupiny, vyskytuje se tato skupina v roztoku v disociované (deprotonované) formě. Nitroalkeny potřebují pravděpodobně pro Michaelovu adici k dispozici deprotonovanou formu thiolové skupiny ($-\text{S}^-$), která je reaktivnější. Hodnota pK_A thiolové skupiny cysteinu se může v závislosti na prostředí měnit, nicméně většinou se pohybuje okolo 8,0-8,3.¹²⁴ Volili jsme tedy pH 8,5. V případě glutationu je pK_A -SH skupiny přibližně 9,1.¹²⁵ Zvolili jsme tedy pro tvorbu thiolátové formy pH 9,5. Měřením při dvou různých hodnotách pH jsem tak mohla sledovat závislost interakce na formě thiolové skupiny.

U experimentů s glutathionem jsem také provedla kinetická měření a sledovala tak změny absorbance v čase. Časová závislost Ellmanovy reakce stanovená pro reagující látky by mohla vypovídat o síle dané interakce. Jelikož víme, že vazba thiolů s nitroalkeny je reverzibilní, mohou být výsledky takových měření nápomocné při zkoumání jejich biodostupnosti. Vazbou ligandu na glutathion se totiž může změnit nejen rozpustnost daného ligandu, ale také rychlost jeho vylučování z organismu.¹⁷

V grafech č. 1-3 vidíme výsledky spektrofotometrického měření interakcí cysteinu s maleimidem. Z prvních dvou grafů je zřejmá závislost absorbance na koncentraci maleimidu. Absorbance s rostoucí koncentrací maleimidu lineárně klesá. Maleimid jako silný elektrofil reagoval s cysteinem v poměru 1:1 do výsledné nulové absorbance nezávisle na pH prostředí, což je potvrzeno v grafu č. 3, kde je pro porovnání vynesena pouze nejvyšší koncentrace maleimidu. Optimalizace metody byla tedy úspěšná a tyto výsledky slouží jako výchozí pro další měření.

Výsledky měření cysteinu s kyselinou olejovou a monooleinem potvrdily, že tyto ligandy neovlivňují hodnoty absorbancí (graf č. 4 a 6). Tyto molekuly neobsahují elektrofilní centrum schopné se vázat na thiolové skupiny zkoumaných nukleofilů. Po interakci cysteinu s kyselinou nitroolejovou nebo nitromonooleinem bych však očekávala výrazné snížení absorbance především v prostředí o pH 8,5. Mírný pokles lze vidět pouze u interakce s kyselinou nitroolejovou při vyšším pH (pH 8,5), a to v koncentračním poměru 2:1 (cystein:NO₂OA, graf č. 5). Vysvětlením pro tyto výsledky může být fakt, že nitrované mastné kyseliny potřebují pro interakci kromě deprotonované formy -SH skupiny také specifické mikroprostředí, které se vytváří u proteinů díky jejich trojrozměrné struktuře.¹²⁸ Cystein jako samostatná aminokyselina nedokáže pravděpodobně vytvořit vhodné prostředí. Kdyby nitrované mastné kyseliny za takto nespecifických reakčních podmínek snadno tvořily vazby s thioley, neměly by poté v buněčném prostředí specifické vlastnosti signálních molekul v protizánětlivé buněčné odpovědi. Specifickou vlastností je myšlena např. regulace signální dráhy Keap1/Nrf2/ARE, kde nitrované mastné kyseliny reagují s -SH skupinami proteinu Keap1, čímž uvolňují transkripční faktor Nrf2 z komplexu a umožňují jeho transport do jádra, kde indukuje expresi genů protizánětlivých a antioxidačních proteinů.⁵

Stejně jako s cysteinem, tak i s glutathionem jsem nejprve provedla měření interakce s maleimidem za výše zmíněných reakčních podmínek (grafy č. 8-10). Byla potvrzena závislost absorbance Ellmanovy reakce GSH na koncentraci maleimidu, lze si také všimnout mírných rozdílů při měření v pH 7,4 a 9,5. Thiolátová forma glutathionu usnadnila interakci s nitroalkeny. Glutathion jako tripeptid, který obsahuje i další aminokyseliny, vytváří specifitější prostředí, které může ovlivnit vazbu maleimidu.

Vazba glutathionu s OA v prostředí o pH 7,4 nevzniká, což je potvrzeno v grafu č. 11. V pH 9,5 už dochází k mírnému snížení absorbance Ellmanovy reakce GSH po interakci s rostoucí koncentrací OA, přestože je považovaná za negativní kontrolu (graf č. 12). Při interpretaci výsledků, týkajících se interakcí nukleofilů s nitrovanými MK a jejich parentními molekulami, musí být bráno v úvahu také samotné chování MK ve vodném prostředí. Nitrované MK jsou amfifilní molekuly, které jsou ve vodném prostředí rozpustné pouze do určité koncentrace. Tuto koncentraci nazýváme kritická micelární koncentrace (CMC). Pokud se amfifilní látky nachází v koncentracích vyšších než CMC, ve vodném prostředí tvoří micely, vezikuly a jiné vyšší lipidové struktury. Hodnota CMC pro kyselinu nitroolejovou v 0,1M Na-fosfátovém pufru pH 7,4 při pokojové teplotě 25°C byla stanovena na 10,6 $\mu\text{mol/l}$.¹²⁹ Micely stabilizují mastné kyseliny a snižují jejich reaktivitu. Zároveň tvorba micel může ovlivňovat spektrofotometrické měření. Musíme tedy brát v úvahu tento vliv na měření s vyššími koncentracemi NO₂MK/MK. Přestože zmiňuji roli CMC při popisu výsledků měření s glutathionem, ovlivnění výsledků mohlo nastat i v experimentech s aminokyselinou cysteinem. Interakci NO₂OA s glutathionem můžeme pozorovat snížením absorbancí Ellmanovy odpovědi v porovnání se samotným glutathionem a to především v pH 9,5 (graf č. 13 a 14).

Grafy č. 15 a 16 znázorňují výsledky měření oxidované i redukované formy glutathionu s monoacylglycerolem, kdy nebyly pozorovány žádné změny. U NO₂MAG je patrný vliv pH prostředí na interakci s glutathionem (graf č. 17 a 18). Při pH 7,4 je NO₂MAG téměř nereaktivní, zatímco při pH 9,5 je podle naměřených výsledků NO₂MAG navázán přibližně na polovinu molekul GSH (absorbance klesla na polovinu hodnoty absorbance čistého glutathionu).

Experimenty kinetických měření ukázaly, že k interakci elektrofilních molekul s glutathionem dochází do 15 minut od začátku inkubace. K většímu rozdílu absorbancí Ellmanovy reakce došlo pouze u měření glutathionu s NO_2MAG v pH 9,5 v časech 5 a 15 minut od začátku inkubace, dále se už hodnoty absorbancí nemění. Nemění se ani při všech ostatních měřeních (grafy č. 19-28). Nárůst absorbancí s časem by mohl indikovat nestabilitu vazby či reverzibilní chování studovaných látek.

Jelikož jsou při kinetických měřeních absorbance vyjádřeny v procentech a za stoprocentní se považuje absorbance samotného glutathionu, mohou se některé hodnoty (především u GSSG) jevit jako záporné. Znamená to však, že jsou hodnoty absorbancí nulové.

V závěru této diplomové práce můžeme říci, že experimentální výzkum založený na spektrofotometrické Ellmanově metodě potvrdil interakci nízkomolekulárních thiolů s nitrovanými deriváty nenasyčených mastných kyselin, síla vazby však závisí na řadě okolních faktorů. Elektrofilní charakter nitroalkenů vyžaduje pro vazbu s thioley prostředí, jehož pH je větší než pK_A thiolové skupiny. Cystein jako samotná aminokyselina není zcela vhodná pro hodnocení reaktivity nitroalkenů, jelikož nevytváří vhodné podmínky mikroprostředí. V organismu se cystein vyskytuje převážně jako součást peptidů a proteinů, je tedy obklopen řadou dalších aminokyselin, např. histidinovými zbytky, určující jak pK_A , tak elektron-donorní vlastnosti konkrétního cysteinylového zbytku. Potvrzuje se tím ale skutečnost, že nitrované mastné kyseliny jsou poměrně specifické signální molekuly, které netvoří vazby se všemi thioley za všech podmínek.

Reaktivita nitrovaných mastných kyselin je značně ovlivněna jejich rozpustností ve vodném prostředí. Nitrované mastné kyseliny jsou ve vodě málo rozpustné, proto jsou po nitrožilním podání z velké části vázány na glutathion nebo transportní proteiny jako albumin, což zvyšuje jejich rozpustnost.¹²⁸ Uvolňování nitrovaných mastných kyselin z těchto proteinů závisí na okolních podmínkách. MAG je ve vodném prostředí prakticky nerozpustný. Přítomnost $-NO_2$ skupiny ve struktuře mastných kyselin zvyšuje jejich CMC a tedy NO_2MK se stávají rozpustnějšími deriváty oproti jejich srovnávacím molekulám.¹²⁹ NO_2MAG tvoří micely i v nízkých koncentracích v závislosti na podmínkách (T, pH). Pomocí elektrochemických metod bylo ukázáno, že NO_2MAG je méně reaktivní než NO_2OA .¹³⁰ Výsledky této práce však ukazují, že při reakci NO_2MAG s glutathionem dochází k většímu poklesu absorbance než s NO_2OA . Což může být vysvětleno tak, že za daných podmínek (pH 9,5) může docházet k destabilizaci micel tvořených NO_2MAG v čase a NO_2MAG pak reaguje s GSH.

Nitrované mastné kyseliny jsou jako mediátory protizánětlivých odpovědí stále poměrně nově zkoumané. V roce 2008 byly objasněny základní informace o biosyntéze a signálním působení těchto derivátů.⁵ Řada podobných prací však prokazuje jejich schopnost reverzibilně tvořit adukty s nízkomolekulárními thioley, např. pomocí metod založených na hmotnostní spektrometrii.¹²⁷ Dále existují práce, zabývající se elektrofilními vlastnostmi nitrovaných mastných kyselin a jejich závislostí na charakteru prostředí (hydrofobní/hydrofilní).¹²⁹ Také skutečnost, že nitroderiváty jsou schopné se inkorporovat do lipidových struktur a být tak zabudovány jako rezervoáry v buněčných membránách, je důležitá pro budoucí směřování výzkumu těchto látek. Řada výzkumných prací studuje transport těchto látek pomocí sérového albuminu, hojně zastoupeného transportního proteinu.¹¹⁴ Naměřená data mohou být využita pro další výzkum reaktivity a reverzibilní vazby vybraných elektrofilních nitroalkenů s nukleofily. Kinetická měření jsou vhodná pro posouzení biodostupnosti nitrovaných mastných kyselin.

Závěrečným schématem poukazují na důležitost výzkumu thiolových skupin nukleofilů a jejich interakcí s elektrofilními nitroalkeny. Vazba ligandů na thiolové skupiny proteinů a peptidů může ovlivňovat řadu významných procesů, konkrétní příklady jsem zakreslila do schématu (schéma 16).

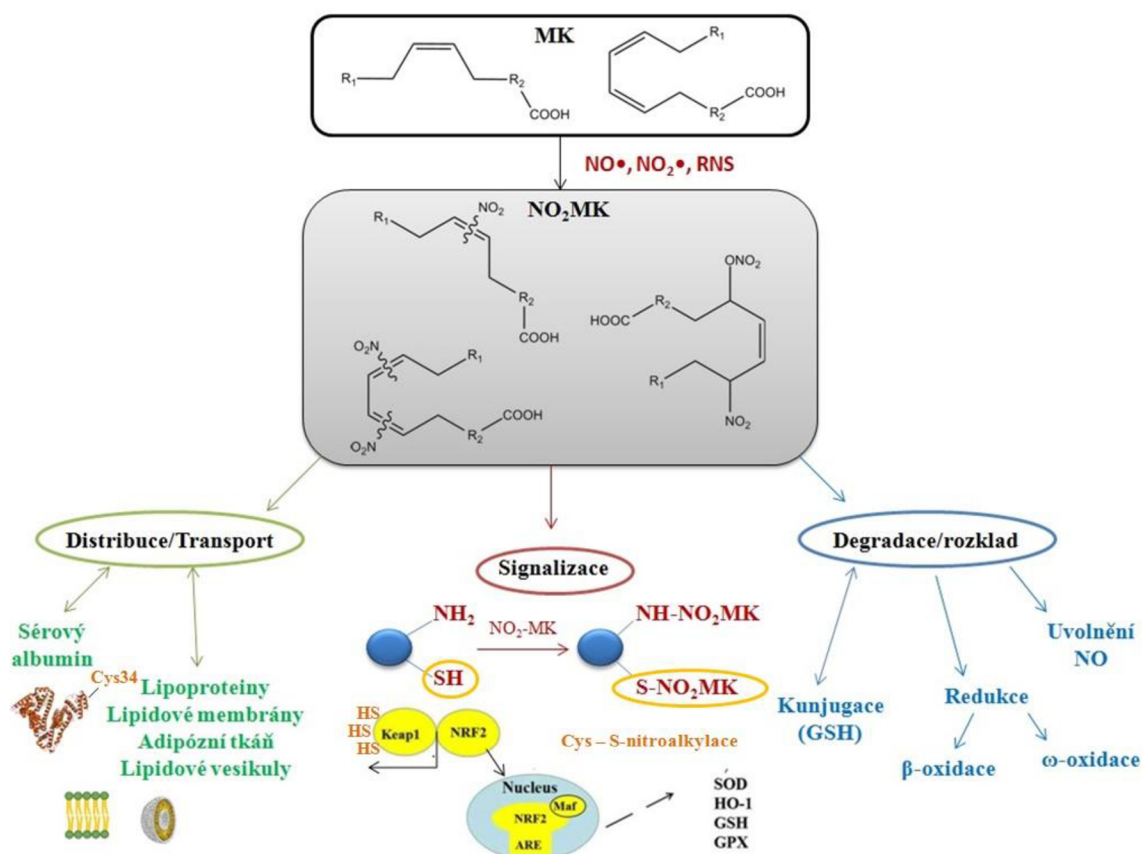


Schéma 16: Biologický význam NO_2MK s důrazem na důležitost role $-\text{SH}$ skupin nukleofilů při transportu a signálním působení NO_2MK .¹³⁰

7. Seznam citací

- (1) Abdellah, Z.; Ahmadi, A.; Ahmed, S.; Aimable, M.; Ainscough, R.; Almeida, J.; Almond, C.; Ambler, A.; Ambrose, K.; Ambrose, K.; et al. Finishing the Euchromatic Sequence of the Human Genome. *Nature* **2004**, *431* (7011), 931–945.
- (2) Jensen, O. N. Modification-Specific Proteomics: Characterization of Post-Translational Modifications by Mass Spectrometry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8* (1), 33–41.
- (3) Villacorta, L.; Gao, Z.; Schopfer, F. J.; Freeman, B. A.; Chen, Y. E. Nitro-Fatty Acids in Cardiovascular Regulation and Diseases: Characteristics and Molecular Mechanisms. *Front. Biosci. - Landmark* **2016**, *21* (4), 873–889.
- (4) Ursini, F.; Maiorino, M.; Forman, H. J. Redox Homeostasis: The Golden Mean of Healthy Living. *Redox Biol.* **2016**, *8*, 205–215.
- (5) Freeman, B. A.; Baker, P. R. S.; Schopfer, F. J.; Woodcock, S. R.; Napolitano, A.; Ischia, M.; Woodcock, S. R.; Napolitano, A. Nitro-Fatty Acid Formation and Signaling. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (23), 15515–15519.
- (6) Egea, J.; Fabregat, I.; Frapart, Y. M.; Ghezzi, P.; Görlach, A.; Kietzmann, T.; Kubaichuk, K.; Knaus, U. G.; Lopez, M. G.; Olaso-Gonzalez, G.; et al. European Contribution to the Study of ROS: A Summary of the Findings and Prospects for the Future from the COST Action BM1203 (EU-ROS). *Redox Biol.* **2017**, *13* (May), 94–162.
- (7) Li, J.; Liu, Y.; Kim, E.; March, J. C.; Bentley, W. E.; Payne, G. F. Electrochemical Reverse Engineering: A Systems-Level Tool to Probe the Redox-Based Molecular Communication of Biology. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *105*, 110–131.
- (8) LoPachin, R. M.; Gavin, T. Reactions of Electrophiles with Nucleophilic Thiolate Sites: Relevance to Pathophysiological Mechanisms and Remediation. *Free Radic. Res.* **2016**, *50* (2), 195–205.
- (9) Ahmed, N. Advanced Glycation Endproducts - Role in Pathology of Diabetic Complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2005**, *67* (1), 3–21.
- (10) Grassi, L.; Cabrele, C. Susceptibility of Protein Therapeutics to Spontaneous Chemical Modifications by Oxidation, Cyclization, and Elimination Reactions. *Amino Acids* **2019**, *51* (10–12), 1409–1431.
- (11) Dinkova-Kostova, A. T.; Talalay, P. Direct and Indirect Antioxidant Properties of Inducers of Cytoprotective Proteins. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 128–138.
- (12) Sheng, Y.; Abreu, I. A.; Cabelli, D. E.; Maroney, M. J.; Miller, A. F.; Teixeira, M.; Valentine, J. S. Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (7), 3854–3918.
- (13) Sies, H. Oxidative Stress: Impact in Redox Biology and Medicine. *Arch. Med. Biomed. Res.* **2016**, *2* (4), 146.

- (14) Molavian, H.; Madani Tonekaboni, A.; Kohandel, M.; Sivaloganathan, S. The Synergetic Coupling among the Cellular Antioxidants Glutathione Peroxidase/Peroxiredoxin and Other Antioxidants and Its Effect on the Concentration of H₂O₂. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (July), 1–8.
- (15) Stratil, P.; Kubáň, V. *Reaktivní Kyslíkové Radikály, Přírodní Antioxidanty a Jejich Zdravotní Účinky*, 1st ed.; Helán, V., Ed.; 2 THETA: Český Těšín, 2018.
- (16) Oakley, A. Glutathione Transferases: A Structural Perspective. *Drug Metab. Rev.* **2011**, *43* (2), 138–151.
- (17) Forman, H. J.; Zhang, H.; Rinna, A. Glutathione: Overview of Its Protective Roles, Measurement, and Biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* **2009**, *30* (1–2), 1–12.
- (18) Samuelsson, M.; Vainikka, L.; Öllinger, K. Glutathione in the Blood and Cerebrospinal Fluid: A Study in Healthy Male Volunteers. *Neuropeptides* **2011**, *45* (4), 287–292.
- (19) Kosower, N. S.; Kosower, E. M. The Glutathione Status of Cells. In *International Review of Cytology*; Academic Press, 1978; Vol. 54, pp 109–160.
- (20) Lushchak, V. I. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *J. Amino Acids* **2012**, *2012*, 1–26.
- (21) Alary, J.; Guéraud, F.; Cravedi, J. P. Fate of 4-Hydroxynonenal in Vivo: Disposition and Metabolic Pathways. *Mol. Aspects Med.* **2003**, *24* (4–5), 177–187.
- (22) Rahman, K. Studies on Free Radicals, Antioxidants, and Co-Factors. *Clin. Interv. Aging* **2007**, *2* (2), 219–236.
- (23) Chatterjee, A. Reduced Glutathione: A Radioprotector or a Modulator of DNA-Repair Activity? *Nutrients* **2013**, *5* (2), 525–542.
- (24) Mokhtari, V.; Sc, M.; Afsharian, P.; Ph, D.; Shahhoseini, M.; Ph, D. A Review on Various Uses of N-Acetyl Cysteine. **2017**, *19* (1), 11–17.
- (25) Kurutas, E. B. The Importance of Antioxidants Which Play the Role in Cellular Response against Oxidative/Nitrosative Stress: Current State. *Nutr. J.* **2016**, *15* (1), 1–22.
- (26) Silva-Adaya, D.; Gonsebatt, M. E.; Guevara, J. Thioredoxin System Regulation in the Central Nervous System: Experimental Models and Clinical Evidence. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, *2014*.
- (27) Karlenius, T. C.; Tonissen, K. F. Thioredoxin and Cancer: A Role for Thioredoxin in All States of Tumor Oxygenation. *Cancers (Basel)*. **2010**, *2* (2), 209–232.
- (28) Bentinger, M.; Tekle, M.; Dallner, G. Coenzyme Q - Biosynthesis and Functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *396* (1), 74–79.
- (29) Navas, P.; Villalba, J. M.; de Cabo, R. The Importance of Plasma Membrane Coenzyme Q in Aging and Stress Responses. *Mitochondrion* **2007**, *7* (SUPPL.), 34–40.

- (30) Nordman, T.; Xia, L.; Björkhem-Bergman, L.; Damdimopoulos, A.; Nalvarte, I.; Arnér, E. S. J.; Spyrou, G.; Eriksson, L. C.; Bjornstedt, M.; Olsson, J. M. Regeneration of the Antioxidant Ubiquinol by Lipoamide Dehydrogenase, Thioredoxin Reductase and Glutathione Reductase. *BioFactors* **2003**, *18* (1–4), 45–50.
- (31) FAO; World Health Organization. *Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition*, 2nd ed.; World Health Organization: Bangkok, 1998.
- (32) Schwab, L.; Goroncy, L.; Palaniyandi, S.; Gautam, S.; Triantafyllopoulou, A.; Mocsai, A.; Reichardt, W.; Karlsson, F. J.; Radhakrishnan, S. V.; Hanke, K.; et al. Neutrophil Granulocytes Recruited upon Translocation of Intestinal Bacteria Enhance Graft-versus-Host Disease via Tissue Damage. *Nat. Med.* **2014**, *20* (6), 648–654.
- (33) Taverna, M.; Marie, A. L.; Mira, J. P.; Guidet, B. Specific Antioxidant Properties of Human Serum Albumin. *Ann. Intensive Care* **2013**, *3* (1), 1–7.
- (34) Stohs, S. J.; Bagchi, D. Oxidative Mechanisms in the Toxicity of Metal Ions. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *18* (2), 321–336.
- (35) Meng, X.; Zhang, X.; Liu, M.; Cai, B.; He, N.; Wang, Z. Fenton Reaction-Based Nanomedicine in Cancer Chemodynamic and Synergistic Therapy. *Appl. Mater. Today* **2020**, *21*, 100864.
- (36) Peters Jr, T. *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*, 1st ed.; Academic Press, 1995.
- (37) Quinlan, G. J.; Martin, G. S.; Evans, T. W. Albumin: Biochemical Properties and Therapeutic Potential. *Hepatology* **2005**, *41* (6), 1211–1219.
- (38) Roche, M.; Rondeau, P.; Singh, N. R.; Tarnus, E.; Bourdon, E. The Antioxidant Properties of Serum Albumin. *FEBS Lett.* **2008**, *582* (13), 1783–1787.
- (39) Turell, L.; Carballal, S.; Botti, H.; Radi, R.; Alvarez, B. Oxidation of the Albumin Thiol to Sulfenic Acid and Its Implications in the Intravascular Compartment. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **2009**, *42* (4), 305–311.
- (40) Berlett, B. S.; Stadtman, E. R. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (33), 20313–20316.
- (41) Otagiri, M.; Chuang, V. T. G. Pharmaceutically Important Pre- and Posttranslational Modifications on Human Serum Albumin. *Biol. Pharm. Bull.* **2009**, *32* (4), 527–534.
- (42) Neuzil, J.; Stocker, R. Free and Albumin-Bound Bilirubin Are Efficient Co-Antioxidants for α -Tocopherol, Inhibiting Plasma and Low Density Lipoprotein Lipid Peroxidation. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (24), 16712–16719.
- (43) Papatheodorou, L.; Weiss, N. Vascular Oxidant Stress and Inflammation in Hyperhomocysteinemia. *Antioxidants Redox Signal.* **2007**, *9* (11), 1941–1958.
- (44) Maiuolo, J.; Oppedisano, F.; Gratteri, S.; Muscoli, C.; Mollace, V. Regulation of Uric Acid Metabolism and Excretion. *Int. J. Cardiol.* **2016**, *213*, 8–14.

- (45) Sautin, Y. Y.; Nakagawa, T.; Zharikov, S.; Johnson, R. J. Adverse Effects of the Classic Antioxidant Uric Acid in Adipocytes: NADPH Oxidase-Mediated Oxidative/Nitrosative Stress. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **2007**, *293* (2), 584–596.
- (46) Khalil, N. M.; Pepato, M. T.; Brunetti, I. L. Free Radical Scavenging Profile and Myeloperoxidase Inhibition of Extracts from Antidiabetic Plants: Bauhinia Forficata and Cissus Sicyoides. *Biol. Res.* **2008**, *41* (2), 165–171.
- (47) Pingitore, A.; Lima, G. P. P.; Mastorci, F.; Quinones, A.; Iervasi, G.; Vassalle, C. Exercise and Oxidative Stress: Potential Effects of Antioxidant Dietary Strategies in Sports. *Nutrition* **2015**, *31* (7–8), 916–922.
- (48) Annanmaki, T.; Pohja, M.; Parviainen, T.; Hakkinen, P.; Murros, K. Uric Acid and Cognition in Parkinson's Disease: A Follow-up Study. *Park. Relat. Disord.* **2011**, *17* (5), 333–337.
- (49) Xiang, S.; Zhang, X.; Xie, X.; Wang, J.; Zhou, Q.; Chen, Z.; Wang, Y.; Liu, G.; Han, F.; Chen, J. High Serum Uric Acid Level Is a Mortality Risk Factor in Peritoneal Dialysis Patients: A Retrospective Cohort Study. *Nutr. Metab.* **2019**, *16* (1), 1–10.
- (50) Kanellis, J.; Watanabe, S.; Li, J. H.; Kang, D. H.; Li, P.; Nakagawa, T.; Wamsley, A.; Sheikh-Hamad, D.; Lan, H. Y.; Feng, L.; et al. Uric Acid Stimulates Monocyte Chemoattractant Protein-1 Production in Vascular Smooth Muscle Cells via Mitogen-Activated Protein Kinase and Cyclooxygenase-2. *Hypertension* **2003**, *41* (6), 1287–1293.
- (51) Fiedor, J.; Science, A. C. Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. **2014**, 466–488.
- (52) Chehue, A.; Olvera Hernandez, E. G.; Cern, T. F.; lvarez, A. The Exogenous Antioxidants. *Oxidative Stress Chronic Degener. Dis. - A Role Antioxidants* **2013**.
- (53) Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13* (10), 572–584.
- (54) Procházková, D.; Boušová, I.; Wilhelmová, N. Antioxidant and Prooxidant Properties of Flavonoids. *Fitoterapia* **2011**, *82* (4), 513–523.
- (55) Nagata, H.; Takekoschi, S.; Takagi, T.; Honma, T.; Watanabe, K. Antioxidative Action of Flavonoids, Quercetin and Catachin, Mediated by the Activation of Glutathione Peroxidase. *Tokai J Exp Clin Med* **1999**, *24*, 1–11.
- (56) Kaviarasan, K.; Kalaiarasi, P.; Pugalendi, V. Antioxidant Efficacy of Flavonoid-Rich Fraction from Spermacoce Hispida in Hyperlipidemic Rats. *J. Appl. Biomed.* **2008**, *6* (4), 165–176.
- (57) Cos, P.; Ying, L.; Calomme, M.; Hu, J. P.; Cimanga, K.; Van Poel, B.; Pieters, L.; Vlietinck, A. J.; Vanden Berghe, D. Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61* (1), 71–76.

- (58) Reiter, R. J.; Acuña-castroviejo, D.; Tan, D.; Burkhardt, S. Free Radical-Mediated Molecular Damage. Mechanisms for the Protective Actions of Melatonin in the Central Nervous System. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2001**, *939*, 200–215.
- (59) Prasad, A. S. Zinc Is an Antioxidant and Anti-Inflammatory Agent: Its Role in Human Health. *Front. Nutr.* **2014**, *1* (September), 1–10.
- (60) Tinggi, U. Selenium: Its Role as Antioxidant in Human Health. *Environ. Health Prev. Med.* **2008**, *13* (2), 102–108.
- (61) Dinkova-Kostova, A. T.; Massiah, M. A.; Bozak, R. E.; Hicks, R. J.; Talalay, P. Potency of Michael Reaction Acceptors as Inducers of Enzymes That Protect against Carcinogenesis Depends on Their Reactivity with Sulfhydryl Groups. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98* (6), 3404–3409.
- (62) Groeger, A. L.; Freeman, B. A. Signaling Actions of Electrophiles: Anti-Inflammatory Therapeutic Candidates. *Mol. Interv.* **2010**, *10* (1), 39–50.
- (63) Satoh, T.; Lipton, S. A. Redox Regulation of Neuronal Survival Mediated by Electrophilic Compounds. *Trends Neurosci.* **2007**, *30* (1), 37–45.
- (64) Jov, M.; Mota-martorell, N.; Pradas, I.; Mart, M.; Ayala, V.; Pamplona, R. The Advanced Lipoxidation End-Product Malondialdehyde-Lysine in Aging and Longevity. **2020**, 1–20.
- (65) Winger, A. M.; Millar, A. H.; Day, D. A. Sensitivity of Plant Mitochondrial Terminal Oxidases to the Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxy-2-Nonenal (HNE). **2005**, No. June.
- (66) Barrera, G.; Pizzimenti, S.; Daga, M.; Dianzani, C.; Arcaro, A.; Cetrangolo, G. P.; Giordano, G.; Cucci, M. A.; Graf, M.; Gentile, F. Lipid Peroxidation-Derived Aldehydes, 4-Hydroxynonenal and Malondialdehyde in Aging-Related Disorders. *Antioxidants* **2018**, *7* (8).
- (67) Roede, J. R.; Fritz, K. S. *Hepatotoxicity of Reactive Aldehydes* ☆; Elsevier Inc., 2015.
- (68) Pryor, W. A.; Porter, N. A. Suggested Mechanisms for the Production of 4-Hydroxy-2-Nonenal from the Autoxidation of Polyunsaturated Fatty Acids. *Free Radic. Biol. Med.* **1990**, *8* (6), 541–543.
- (69) Uchida, K. 4-Hydroxy-2-Nonenal: A Product and Mediator of Oxidative Stress. *Prog. Lipid Res.* **2003**, *42* (4), 318–343.
- (70) Humphries, K. M.; Szwedda, L. I. Selective Inactivation of α -Ketoglutarate Dehydrogenase and Pyruvate Dehydrogenase: Reaction of Lipoic Acid with 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Biochemistry* **1998**, *37* (45), 15835–15841.
- (71) Millar, A. H.; Leaver, C. J. The Cytotoxic Lipid Peroxidation Product, 4-Hydroxy-2-Nonenal, Specifically Inhibits Decarboxylating Dehydrogenases in the Matrix of Plant Mitochondria. *FEBS Lett.* **2000**, *481* (2), 117–121.

- (72) Chew, E.; Nagle, A. A.; Zhang, Y.; Scarmagnani, S.; Palaniappan, P.; Bradshaw, T. D.; Holmgren, A.; Westwell, A. D. Free Radical Biology & Medicine Cinnamaldehydes Inhibit Thioredoxin Reductase and Induce Nrf2: Potential Candidates for Cancer Therapy and Chemoprevention. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *48* (1), 98–111.
- (73) Macpherson, L. J.; Dubin, A. E.; Evans, M. J.; Marr, F.; Schultz, P. G.; Cravatt, B. F.; Patapoutian, A. Noxious Compounds Activate TRPA1 Ion Channels through Covalent Modification of Cysteines. **2007**, *445* (February), 541–545.
- (74) Fu, H.; Park, J.; Pei, D. Peptidyl Aldehydes as Reversible Covalent Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatases. *Biochemistry* **2002**, No. X, 10700–10709.
- (75) Shin, J.; Ohnishi, K.; Murakami, A.; Lee, J.; Kundu, J. K. Zerumbone Induces Heme Oxygenase-1 Expression in Mouse Skin and Cultured Murine Epidermal Cells through Activation of Nrf2. *Cancer Prev Res* **2011**, *4*, 860–871.
- (76) Gersch, M.; Kreuzer, J.; Sieber, S. A. Electrophilic Natural Products and Their Biological Targets. *Nat Prod Rep* **2012**, *29*, 659–682.
- (77) Kudo, N.; Matsumori, N.; Taoka, H.; Fujiwara, D.; Schreiner, E.; Wolff, B.; Yoshida, M.; Horinouchi, S. Leptomycin B Inactivates CRM1/Exportin 1 by Covalent Modification at a Cysteine Residue in the Central Conserved Region. *Proc Natl Acad Sci USA* **1999**, *96* (16), 9112–9117.
- (78) Kobayashi, M.; Wang, W.; Tsutsui, Y.; Sugimoto, M.; Murakami, Absolute Stereostructure and Total Synthesis of Leptomycin B. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8291–8294.
- (79) Nishimura, H.; Mayama, M.; Komatsu, Y.; Kato, H.; Shimaoka, N.; Tanaka, Y. Showdomycin, a New Antibiotic From a Streptomyces Sp. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1964**, *17* (July), 148–155.
- (80) Roy-Burman, S.; Roy-Burman, P.; Visser, D. W. Showdomycin, A New Nucleoside Antibiotic. *Cancer Res.* **1968**, *28* (8), 1605–1610.
- (81) Böttcher, T.; Sieber, S. A. Showdomycin as a Versatile Chemical Tool for the Detection of Pathogenesis-Associated Enzymes in Bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (20), 6964–6972.
- (82) Rosenthal, P. J.; Olson, J. E. D. E.; Lee, G. K.; Palmer, J. T.; Klaus, J. L.; Rasnick, D. Antimalarial Effects of Vinyl Sulfone Cysteine Proteinase Inhibitors. **1996**, *40* (7), 1600–1603.
- (83) Borodovsky, A.; Ova, H.; Kolli, N.; Gan-erdene, T.; Wilkinson, K. D.; Ploegh, H. L.; Kessler, B. M. Chemistry-Based Functional Proteomics Reveals Novel Members of the Deubiquitinating Enzyme Family. **2002**, *9* (02), 1149–1159.
- (84) Greger, H.; Hofer, O.; Zechner, G.; Hadacek, F.; Wurz, G. Sulphones Derived from Methylthiopropenoic Acid Amides from *Glycosmis Angustifolia*. *Phytochemistry* **1994**, *37* (94), 1305–1310.

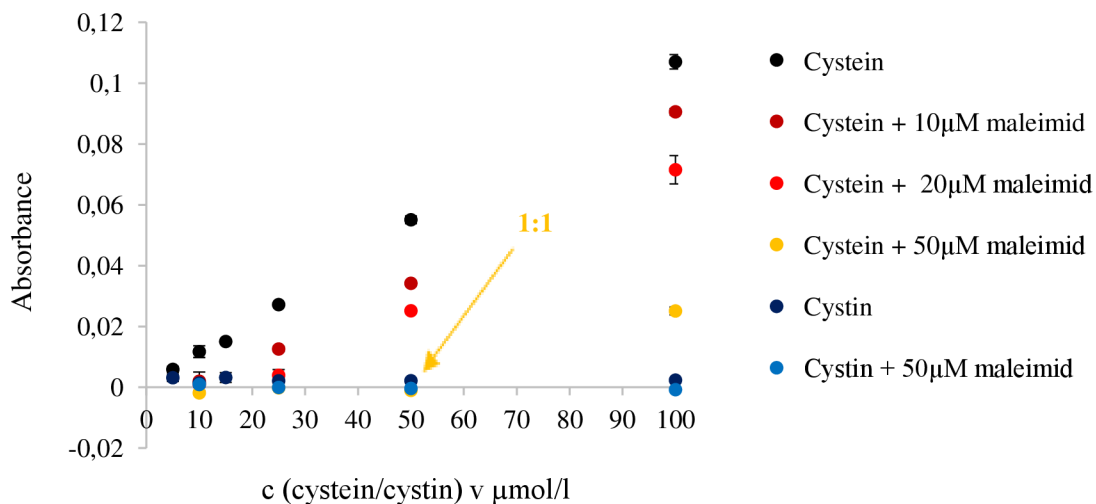
- (85) Drinić, M.; Raninger, A.; Zraunig, A.; Astelbauer, F.; Leitsch, D.; Obwaller, A.; Walochnik, J.; Greger, H.; Duchene, M. IJP : Drugs and Drug Resistance Activity of Methylgerambullin from *Glycosmis* Species (Rutaceae) against *Entamoeba Histolytica* and *Giardia Duodenalis* in Vitro. *IJP Drugs Drug Resist.* **2019**, *10* (August), 109–117.
- (86) Thermo Fisher Scientific. Ch 2 Thiol Reactive Probes. *Mol. Probes(TM) Handb.* **2010**, 96–121.
- (87) Gois, P. M. P.; Ravasco, J.; Faustino, H.; Trindade, A. Bioconjugation with Maleimides: A Useful Tool for Chemical Biology. *Chem. - A Eur. J.* **2018**.
- (88) Schopfer, F. J.; Baker, P. R. S.; Giles, G.; Chumley, P.; Batthyany, C.; Crawford, J.; Patel, R. P.; Hogg, N.; Branchaud, B. P.; Lancaster, J. R.; et al. Fatty Acid Transduction of Nitric Oxide Signaling: Nitrolinoleic Acid Is a Hydrophobically Stabilized Nitric Oxide Donor. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (19), 19289–19297.
- (89) Schopfer, F. J.; Baker, P. R. S.; Freeman, B. A. NO-Dependent Protein Nitration : A Cell Signaling Event or an Oxidative Inflammatory Response ? **2003**, *28* (12), 646–654.
- (90) Radi, R.; Denicola, A.; Freeman, B. A. Peroxynitrite Reactions with Carbon Dioxide-Bicarbonate. *Methods Enzymol.* **1999**, *301*.
- (91) Eiserich, J. P.; Hristova, M.; Cross, C. E.; Jones, A. D.; Freeman, B. A.; Halliwell, B.; Van Der Vliet, A. Formation of Nitric Oxide-Derived Inflammatory Oxidants by Myeloperoxidase in Neutrophils. *Nature* **1998**, *391* (6665), 393–397.
- (92) Lancaster, J. R. Nitroxidative, Nitrosative, and Nitrative Stress: Kinetic Predictions of Reactive Nitrogen Species Chemistry under Biological Conditions. *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19* (9), 1160–1174.
- (93) Pryor, W. A.; Lightsey, J. W.; Church, D. F. Reaction of Nitrogen Dioxide with Alkenes and Polyunsaturated Fatty Acids: Addition and Hydrogen Abstraction Mechanisms. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104* (24), 6685–6692.
- (94) Baker, L. M. S.; Baker, P. R. S.; Golin-bisello, F.; Schopfer, F. J.; Fink, M.; Woodcock, S. R.; Branchaud, B. P.; Radi, R.; Bruce, A. Nitro-fatty Acid Reaction with Glutathione and Cysteine. *J Biol Chem* **2007**, *282* (42), 31085–31093.
- (95) Wanikiat, P.; Woodward, D. F.; Armstrong, R. A. Investigation of the Role of Nitric Oxide and Cyclic GMP in Both the Activation and Inhibition of Human Neutrophils. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *122* (6), 1135–1145.
- (96) Michalik, L.; Auwerx, J.; Berger, J. P.; Chatterjee, V. K.; Glass, C. K.; Gonzalez, F. J.; Grimaldi, P. A.; Kadowaki, T.; Lazar, M. A.; Rahilly, S. O.; et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Pharmacol Rev* **2006**, *58* (4), 726–741.
- (97) Christofides, A.; Konstantinidou, E.; Jani, C.; Boussiotis, V. A. The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR) in Immune Responses. *Metabolism.* **2021**, *114*, 154338.

- (98) Klaassen, C. D.; Reisman, S. A. Nrf2 the Rescue: Effects of the Antioxidative/Electrophilic Response on the Liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2010**, *244* (1), 57–65.
- (99) Sova, M.; Saso, L. Design and Development of Nrf2 Modulators for Cancer Chemoprevention and Therapy: A Review. *Drug Des. Devel. Ther.* **2018**, *12*, 3181–3197.
- (100) Ross, D. Quinone Reductases Multitasking in the Metabolic World. *Drug Metab. Rev.* **2004**, *36* (3–4), 639–654.
- (101) Saha, S.; Buttari, B.; Panieri, E.; Profumo, E.; Saso, L. An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. *Molecules* **2020**, *25* (22), 1–31.
- (102) Ramos-Gomez, M.; Kwak, M. K.; Dolan, P. M.; Itoh, K.; Yamamoto, M.; Talalay, P.; Kensler, T. W. Sensitivity to Carcinogenesis Is Increased and Chemoprotective Efficacy of Enzyme Inducers Is Lost in Nrf2 Transcription Factor-Deficient Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98* (6), 3410–3415.
- (103) Soriano, F. X.; Baxter, P.; Murray, L. M.; Sporn, M. B.; Gillingwater, T. H.; Hardingham, G. E. Transcriptional Regulation of the AP-1 and Nrf2 Target Gene Sulfiredoxin. *Mol. Cells* **2009**, *27* (3), 279–282.
- (104) Vacek, J.; Ostatná, V. *Bioelektrochemie*, 1st ed.; Univerzita Palackého v Olomouci: Olomouc, 2020.
- (105) Heyrovský, M.; Mader, P.; Veselá, V.; Fedurco, M. The Reactions of Cystine at Mercury Electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *369* (1–2), 53–70.
- (106) Paleček, E.; Heyrovský, M. 75 Let Oscilografické Polarografie J. Heyrovského a Současná Chronopotenciometrie Konstantním Proudem. *Chem. List.* **2017**, *111* (1), 71–91.
- (107) Paleček, E.; Černocká, H.; Ostatná, V.; Navrátilová, L.; Brázdová, M. Electrochemical Sensing of Tumor Suppressor Protein P53-Deoxyribonucleic Acid Complex Stability at an Electrified Interface. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *828*, 1–8.
- (108) Belicky, S.; Černocká, H.; Bertok, T.; Holazova, A.; Réblová, K.; Paleček, E.; Tkac, J.; Ostatná, V. Label-Free Chronopotentiometric Glycoprofiling of Prostate Specific Antigen Using Sialic Acid Recognizing Lectins. *Bioelectrochemistry* **2017**, *117*, 89–94.
- (109) Wang, J. *Analytical Electrochemistry*, 2nd ed.; John Wiley & Sons: Chichester, 2000.
- (110) Speiser, B. Linear Sweep and Cyclic Voltammetry. *Encycl. Electrochem.* **2003**.
- (111) Černocká, H.; Ostatná, V.; Paleček, E. Fast-Scan Cyclic Voltammetry with Thiol-Modified Mercury Electrodes Distinguishes Native from Denatured BSA. *Electrochem. commun.* **2015**, *61*, 114–116.
- (112) Chevion, S.; Berry, E. M.; Kitrossky, N.; Kohen, R. Evaluation of Plasma Low Molecular Weight Antioxidant Capacity by Cyclic Voltammetry. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, *22* (3), 411–421.

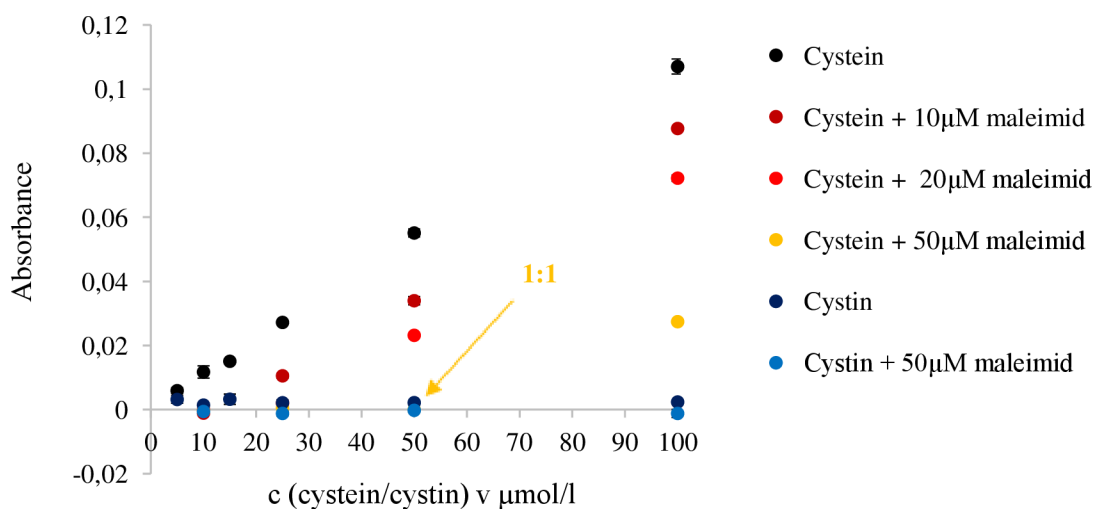
- (113) Paleček, E.; Tkáč, J.; Bartošík, M.; Bertók, T.; Ostatná, V.; Paleček, J. Electrochemistry of Nonconjugated Proteins and Glycoproteins. Toward Sensors for Biomedicine and Glycomics. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (5), 2045–2108.
- (114) Zatloukalova, M.; Mojovic, M.; Pavicevic, A.; Kabelac, M.; Freeman, B. A.; Pekarova, M.; Vacek, J. Redox Properties and Human Serum Albumin Binding of Nitro-Oleic Acid. *Redox Biol.* **2019**, *24*, 101213.
- (115) Newton, G. L.; Dorian, R.; Fahey, R. C. Analysis of Biological Thiols: Derivatization with Monobromobimane and Separation by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Biochem.* **1981**, *114* (2), 383–387.
- (116) Ishii, K.; Noda, M.; Uchiyama, S. Mass Spectrometric Analysis of Protein–Ligand Interactions. *Biophys. Physicobiology* **2016**, *13* (0), 87–95.
- (117) Reisz, J. A.; Bechtold, E.; King, S. B.; Poole, L. B.; Furdui, C. M. Thiol-Blocking Electrophiles Interfere with Labeling and Detection of Protein Sulfenic Acids. *FEBS J.* **2013**, *280* (23), 6150–6161.
- (118) Solecka-Witulska, B. A.; Weise, C.; Kannicht, C. Mass Spectrometry-Based Method for Detection and Identification of Free Thiol Groups in Proteins. In *Post-Translational Modification of Proteins: Tools for Functional Proteomics*; Kannicht, C., Ed.; Springer Nature, 2019; Vol. 1934, pp 179–189.
- (119) Kai, T.; Xia, N.; Liu, L.; Wang, J. Accurate Determination of the Thiol-to-Metal Ratio in Metalloproteins by on-Line Combination of UV-Vis Spectrophotometry with Electrochemistry. *RSC Adv.* **2012**, *2* (23), 8729–8733.
- (120) Spiess, P. C.; Morin, D.; Jewell, W. T.; Buckpitt, A. R. Measurement of Protein Sulfhydryls in Response to Cellular Oxidative Stress Using Gel Electrophoresis and Multiplexed Fluorescent Imaging Analysis. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21* (5).
- (121) Zinellu, A.; Lepedda, A.; Sotgia, S.; Zinellu, E.; Marongiu, G.; Usai, M. F.; Gaspa, L.; De Muro, P.; Formato, M.; Deiana, L.; et al. Albumin-Bound Low Molecular Weight Thiols Analysis in Plasma and Carotid Plaques by CE. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33* (1), 126–131.
- (122) Poganik, J. R.; Huang, K. T.; Parvez, S.; Zhao, Y.; Raja, S.; Long, M. J. C.; Aye, Y. Wdr1 and Cofilin Are Necessary Mediators of Immune-Cell-Specific Apoptosis Triggered by Tecfidera. *Nat. Commun.* **2021**, *12* (1), 1–15.
- (123) Novák, D.; Vrba, J.; Zatloukalová, M.; Roubalová, L.; Stolarczyk, K.; Dorčák, V.; Vacek, J. Cysteamine Assay for the Evaluation of Bioactive Electrophiles. *Free Radic. Biol. Med.* **2021**, *164*, 381–389.
- (124) Williams, M. *The Merck Index: An Encyclopedia Of Chemicals, Drugs, And Biologicals*, 15th ed.; O’Neil, M. J., Ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2013**.
- (125) Tummanapelli, A. K.; Vasudevan, S. Ab Initio MD Simulations of the Brønsted Acidity of Glutathione in Aqueous Solutions: Predicting PKa Shifts of the Cysteine Residue. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (49), 15353–15358.
- (126) Kalyanaraman, S. Nitrate Lipids: A Class of Cell-Signaling Molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (32), 11527–11528.

- (127) Baker, L. M. S.; Baker, P. R. S.; Golin-Bisello, F.; Schopfer, F. J.; Fink, M.; Woodcock, S. R.; Branchaud, B. P.; Radi, R.; Freeman, B. A. Nitro-Fatty Acid Reaction with Glutathione and Cysteine: Kinetic Analysis of Thiol Alkylation by a Michael Addition Reaction. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (42), 31085–31093.
- (128) Rudolph, V.; Schopfer, F. J.; Khoo, N. K. H.; Rudolph, T. K.; Cole, M. P.; Woodcock, S. R.; Bonacci, G.; Groeger, A. L.; Golin-Bisello, F.; Chen, C. S.; et al. Nitro-Fatty Acid Metabolome: Saturation, Desaturation, β -Oxidation, and Protein Adduction. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (3), 1461–1473.
- (129) Grippo, V.; Mojovic, M.; Pavicevic, A.; Kabelac, M.; Hubatka, F.; Turanek, J.; Zatloukalova, M.; Freeman, B. A.; Vacek, J. Electrophilic Characteristics and Aqueous Behavior of Fatty Acid Nitroalkenes. *Redox Biol.* **2021**, *38*, 101756.
- (130) Zatloukalová, M.; Jedinák, L.; Riman, D.; Franková, J.; Novák, D.; Cytryniak, A.; Nazaruk, E.; Bilewicz, R.; Vrba, J.; Papoušková, B.; et al. Cubosomal Lipid Formulation of Nitroalkene Fatty Acids: Preparation, Stability and Biological Effects. *Redox Biol.* **2021**, *46*.

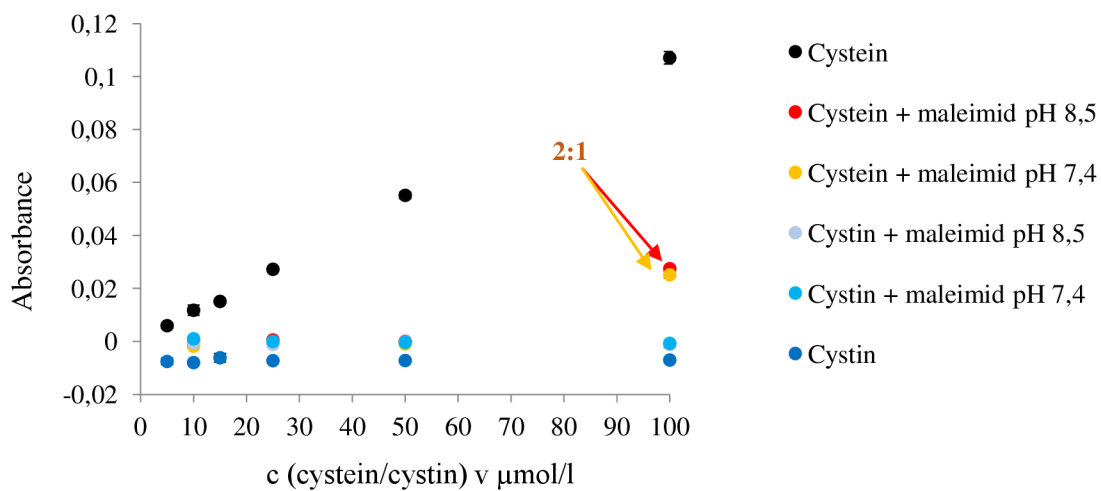
7. Přílohy



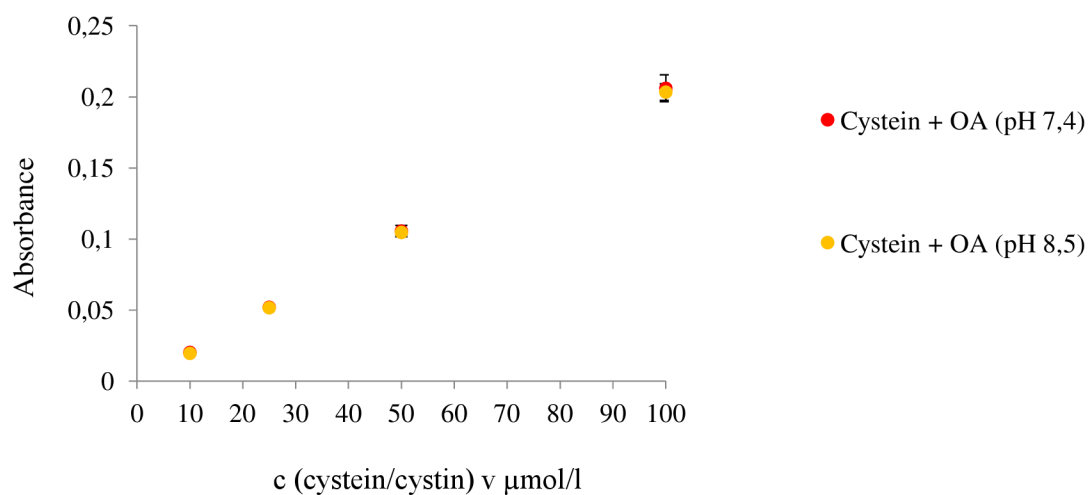
Graf č. 1: Cystein ($c = 5, 10, 15, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + maleimid ($c = 0, 10, 20, 50 \mu\text{mol/l}$), Cystin ($c = 5, 10, 15, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + maleimid ($c = 0, 50 \mu\text{mol/l}$), pufr - Na-fosfátový **pH 7,4**



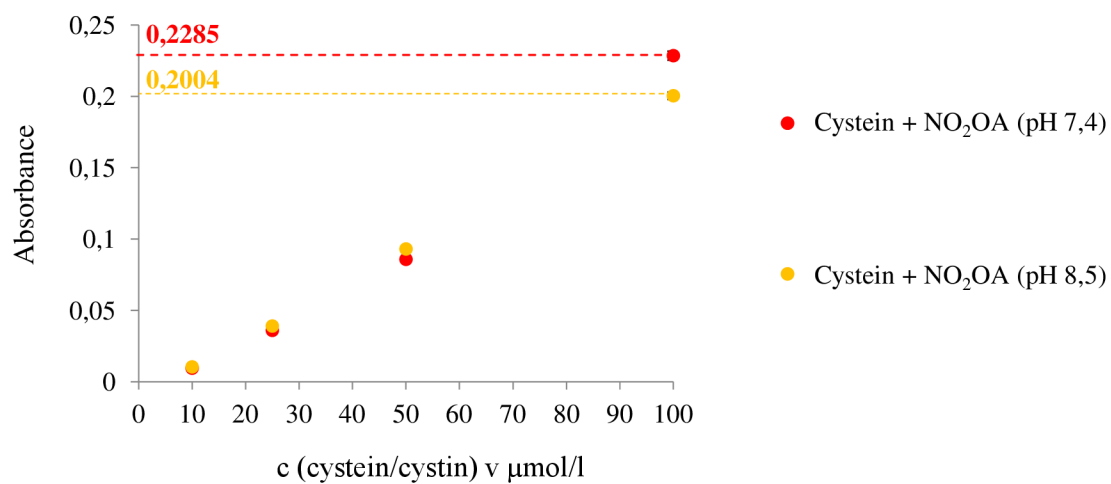
Graf č. 2: Cystein ($c = 5, 10, 15, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + maleimid ($c = 0, 10, 20, 50 \mu\text{mol/l}$), Cystin ($c = 5, 10, 15, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + maleimid ($c = 0, 50 \mu\text{mol/l}$), pufr - Na-fosfátový **pH 8,5**



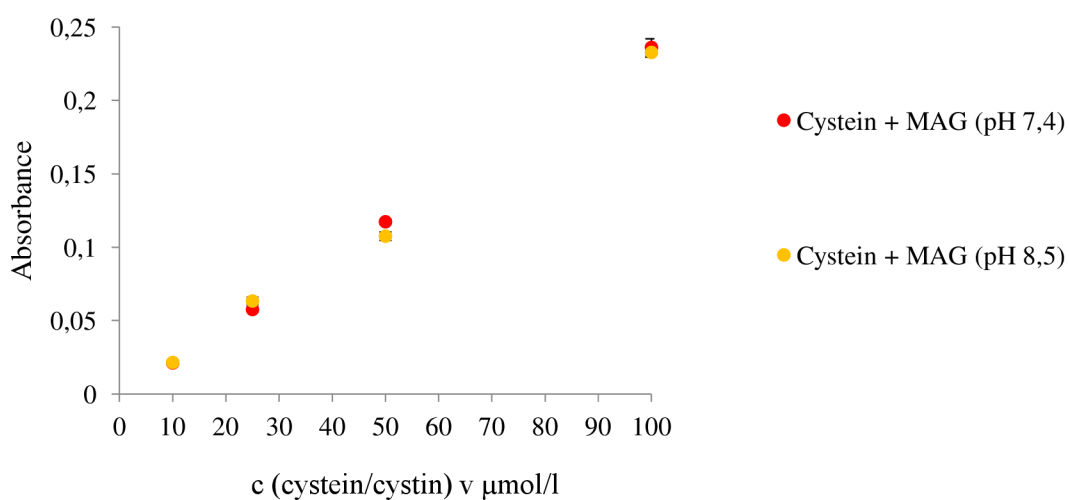
Graf č. 3: Cystein ($c = 5, 10, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + maleimid ($c = 0, 50 \mu\text{mol/l}$), cystin ($c = 5, 10, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$), pufrý - Na-fosfátový **pH 7,4 a 8,5**.



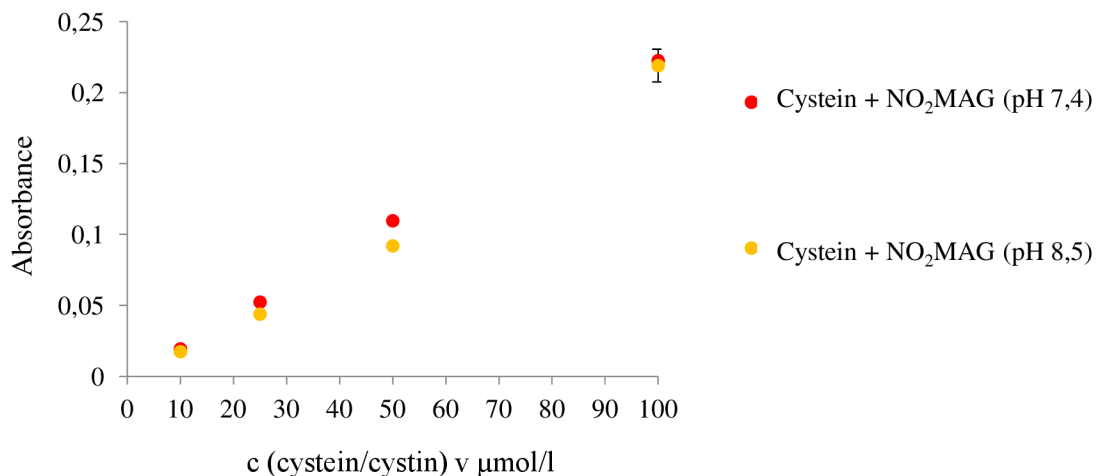
Graf č. 4: Cystein ($c = 5, 10, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + OA ($c = 50 \mu\text{mol/l}$), pufrý: Na-fosfátový **pH 7,4 a 8,5**.



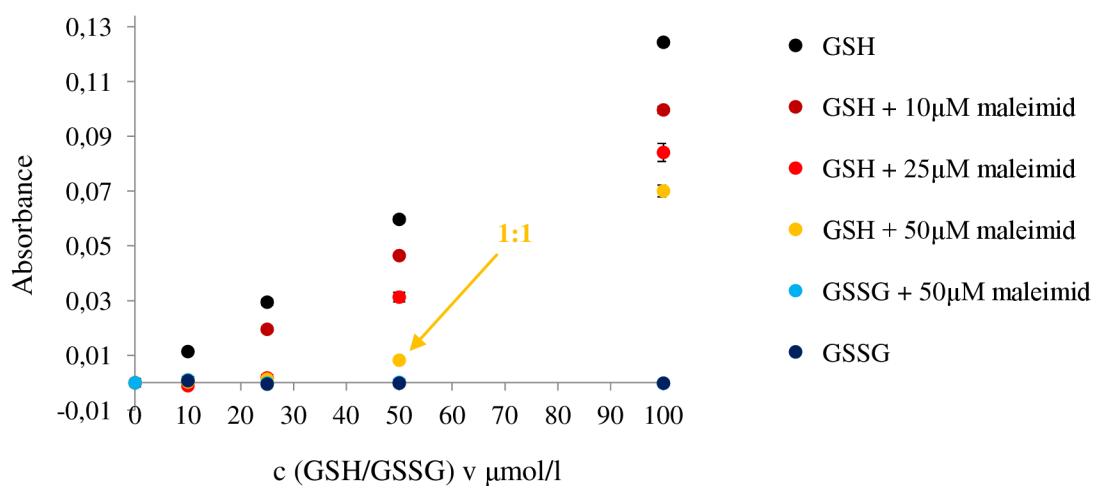
Graf č. 5: Cystein ($c = 5, 10, 15, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + NO_2OA ($c = 50 \mu\text{mol/l}$), pufrý - Na -fosfátový **pH 7,4 a 8,5**.



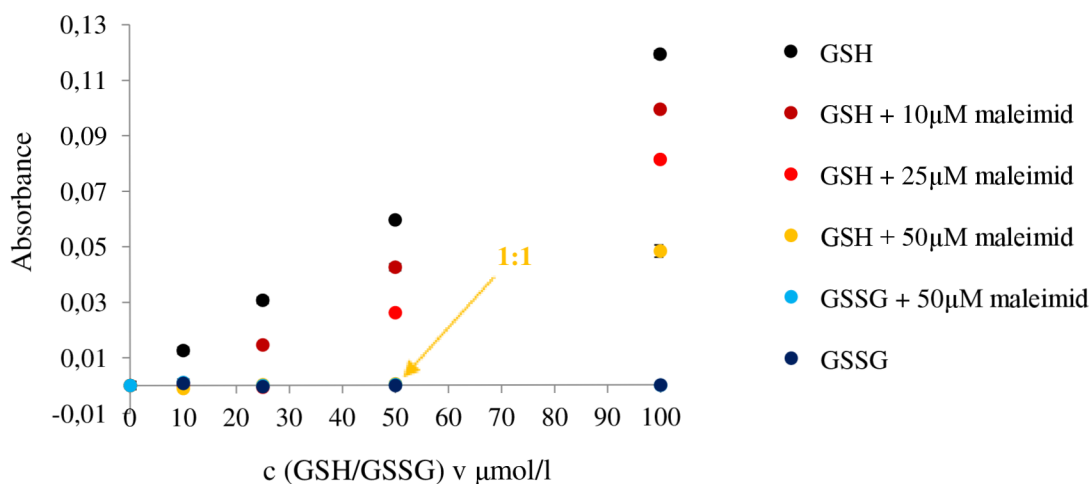
Graf č. 6: Cystein ($c = 5, 10, 15, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + MAG ($c = 50 \mu\text{mol/l}$), pufrý - Na -fosfátový **pH 7,4 a 8,5**.



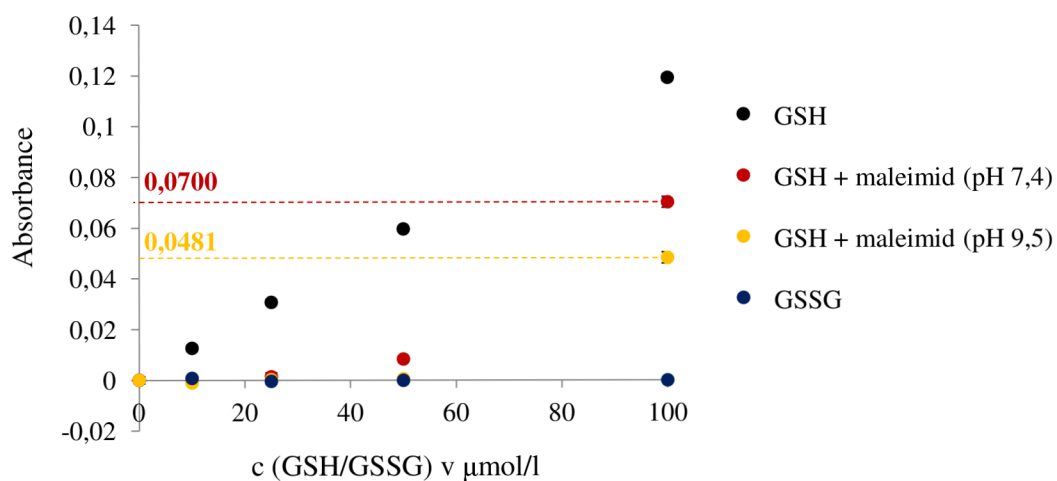
Graf č. 7: Cystein ($c = 5, 10, 15, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + NO_2MAG ($c = 50 \mu\text{mol/l}$), cystin ($c = 5, 10, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$), pufr - Na-fosfátový **pH 7,4 a 8,5**.



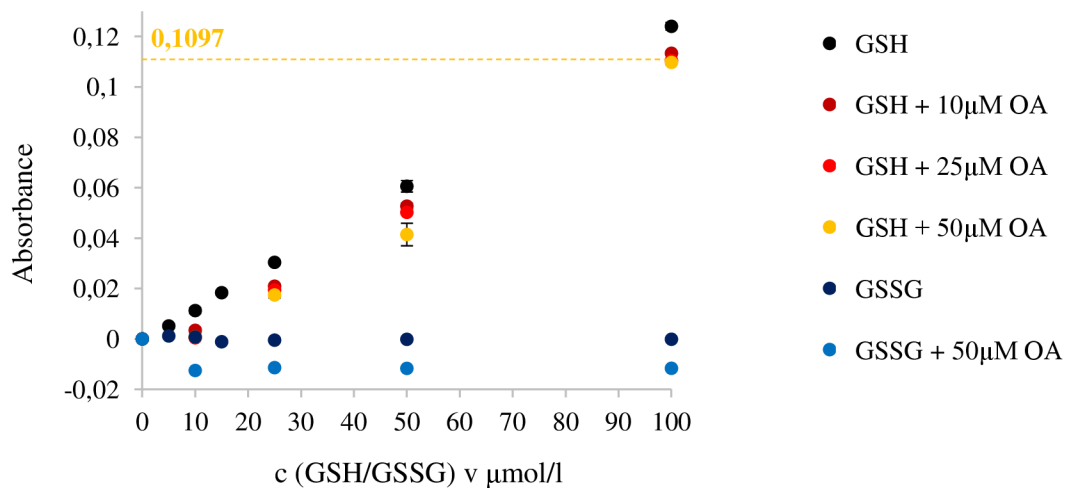
Graf č. 8: GSH ($c = 10, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + maleimid ($c = 0, 10, 25, 50 \mu\text{mol/l}$), GSSG ($c = 10, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + maleimid ($c = 0, 50 \mu\text{mol/l}$), pufr - Na-fosfátový **pH 7,4**.



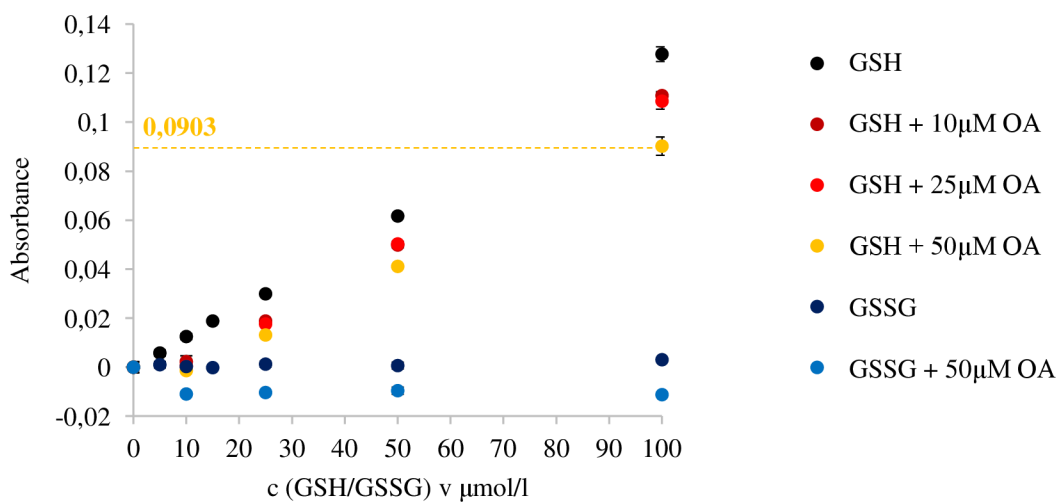
Graf č. 9: GSH ($c = 10, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + maleimid ($c = 0, 10, 25, 50 \mu\text{mol/l}$), GSSG ($c = 10, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + maleimid ($c = 0, 50 \mu\text{mol/l}$), pufr - Britton-Robinsonův **pH 9,5**.



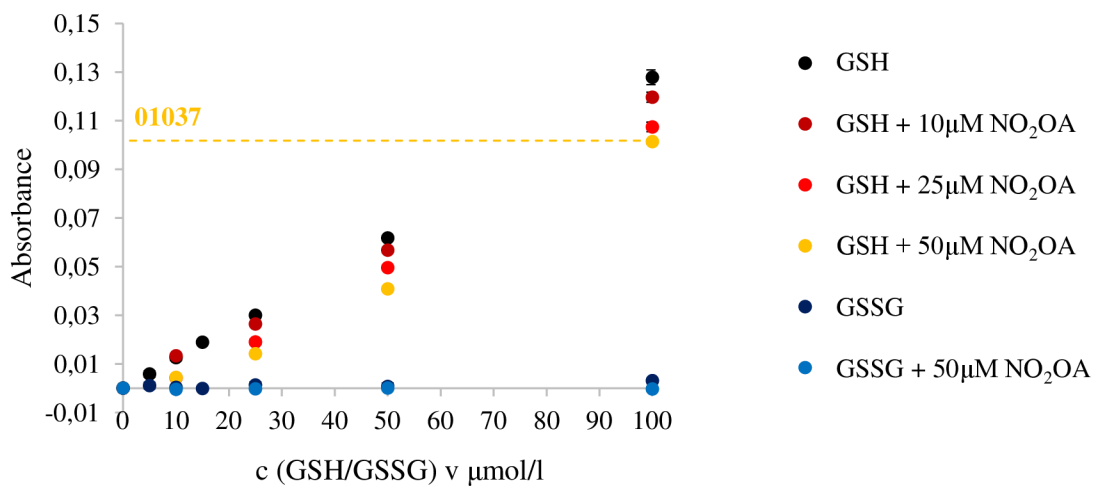
Graf č. 10: GSH ($c = 10, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + maleimid ($c = 0, 50 \mu\text{mol/l}$), GSSG ($c = 10, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$), pufr - Na-fosfátový **pH 7,4**; Britton-Robinsonův **pH 9,5**.



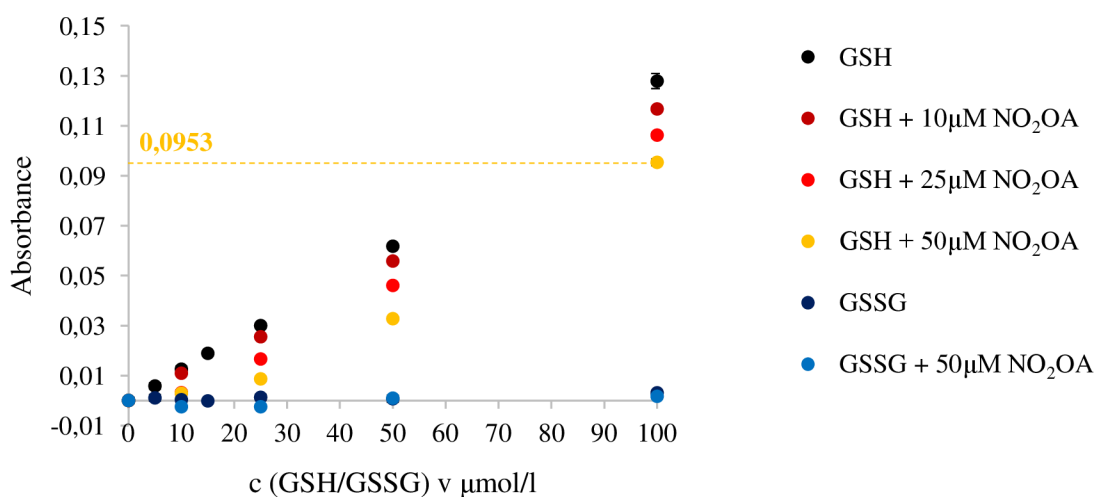
Graf č. 11: GSH ($c = 5, 10, 15, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + OA ($c = 0, 10, 25, 50 \mu\text{mol/l}$), GSSG ($c = 5, 10, 15, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + OA ($0, 50 \mu\text{mol/l}$), pufr - Na-fosfátový **pH 7,4**.



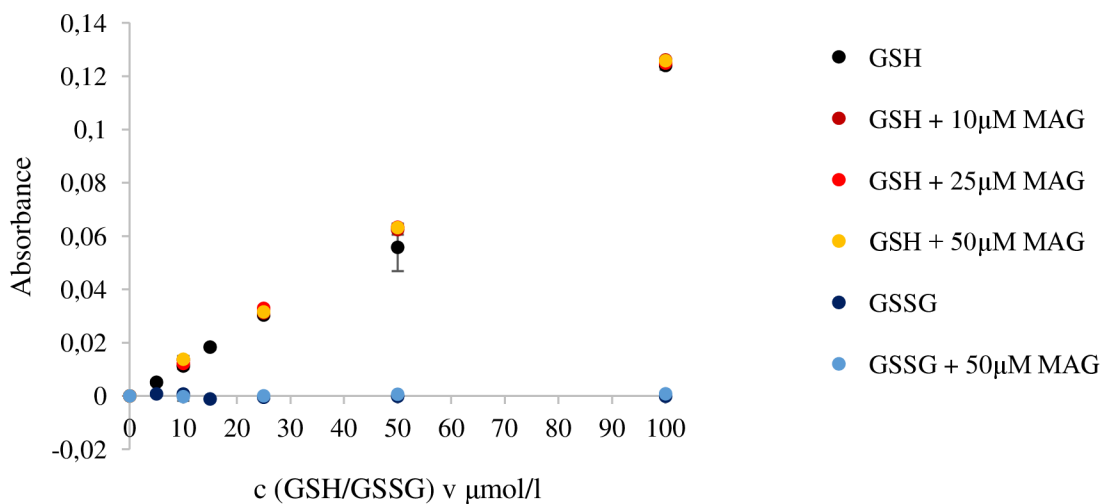
Graf č. 12: GSH ($c = 5, 10, 15, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + OA ($c = 0, 10, 25, 50 \mu\text{mol/l}$), GSSG ($c = 5, 10, 15, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + OA ($0, 50 \mu\text{mol/l}$), pufr - Britton-Robinsonův **pH 9,5**.



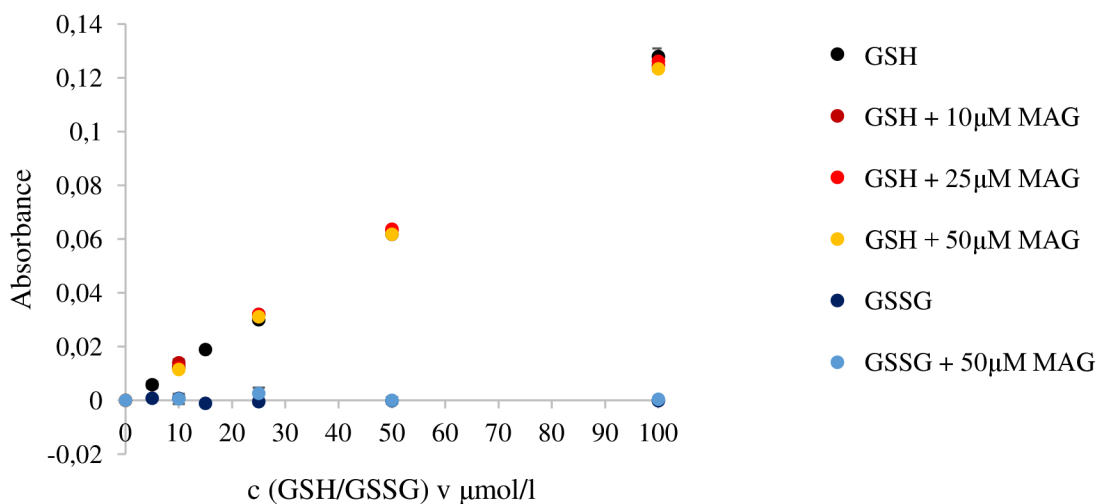
Graf č. 13: GSH ($c = 5, 10, 15, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + NO₂OA ($c = 0, 10, 25, 50 \mu\text{mol/l}$), GSSG ($c = 5, 10, 15, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + NO₂OA (0, 50 $\mu\text{mol/l}$), pufr - Na-fosfátový pH 7,4.



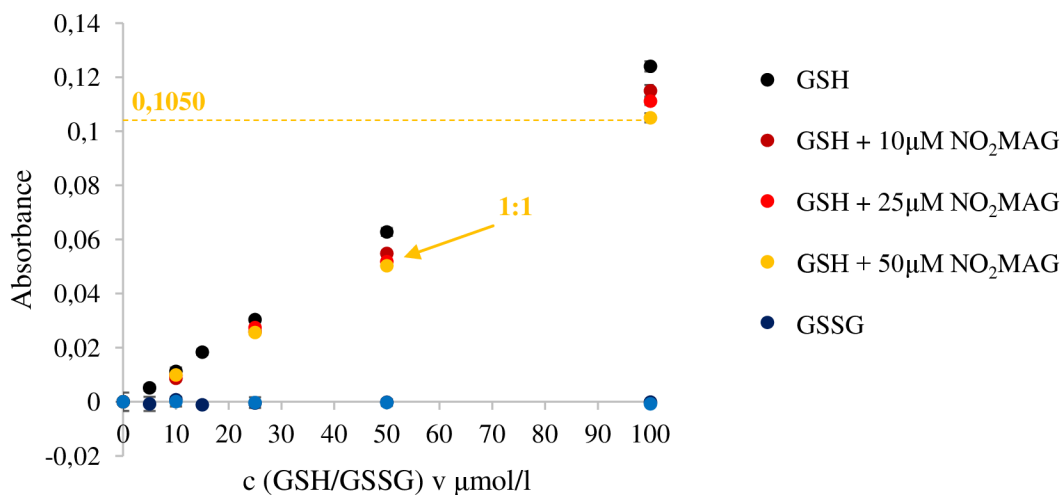
Graf č. 14: GSH ($c = 5, 10, 15, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + NO₂OA ($c = 0, 10, 25, 50 \mu\text{mol/l}$), GSSG ($c = 5, 10, 15, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + NO₂OA (0, 50 $\mu\text{mol/l}$), pufr - Britton-Robinsonův pH 9,5.



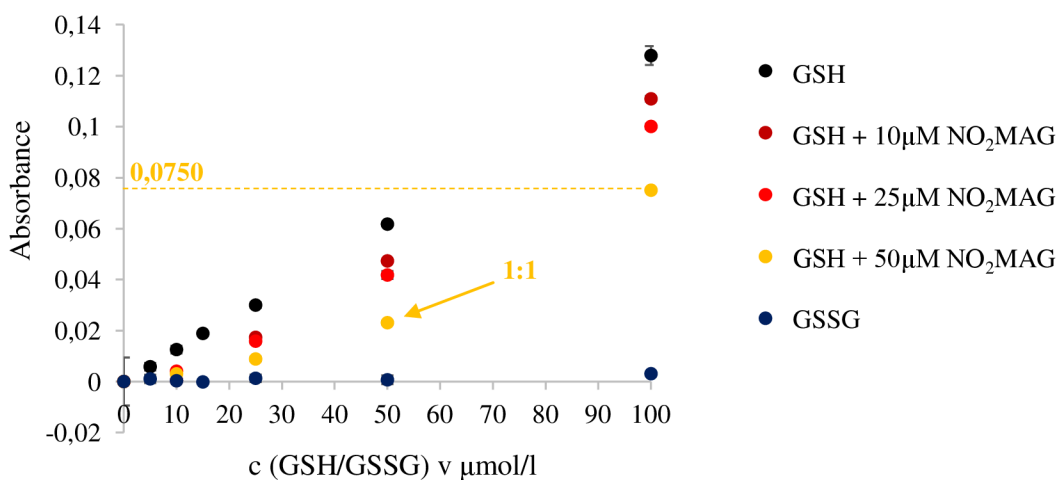
Graf č. 15: GSH ($c = 5, 10, 15, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + MAG ($c = 0, 10, 25, 50 \mu\text{mol/l}$), GSSG ($c = 5, 10, 15, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + MAG ($0, 50 \mu\text{mol/l}$), pufr - Na-fosfátový **pH 7,4**.



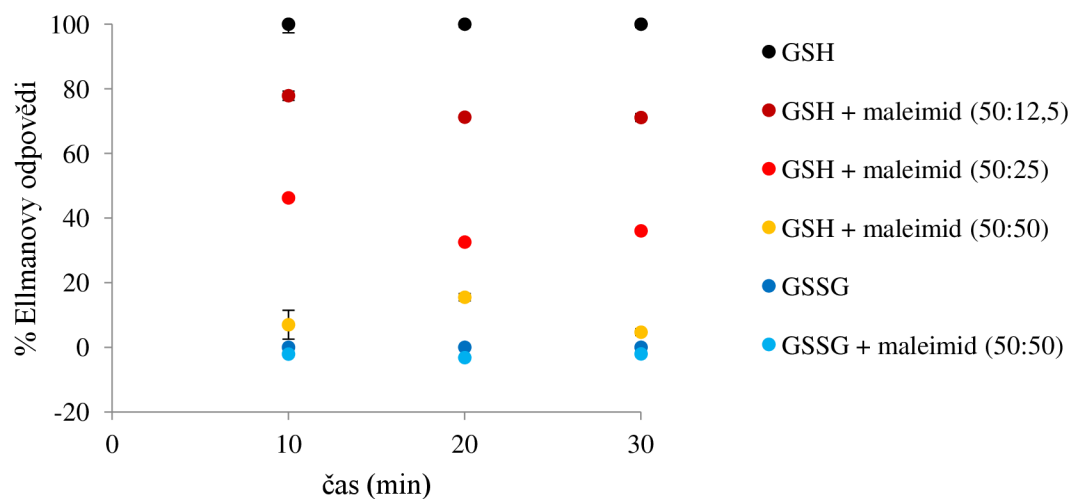
Graf č. 16: GSH ($c = 5, 10, 15, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + MAG ($c = 0, 10, 25, 50 \mu\text{mol/l}$), GSSG ($c = 5, 10, 15, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + MAG ($0, 50 \mu\text{mol/l}$), pufr - Britton-Robinsonův **pH 9,5**.



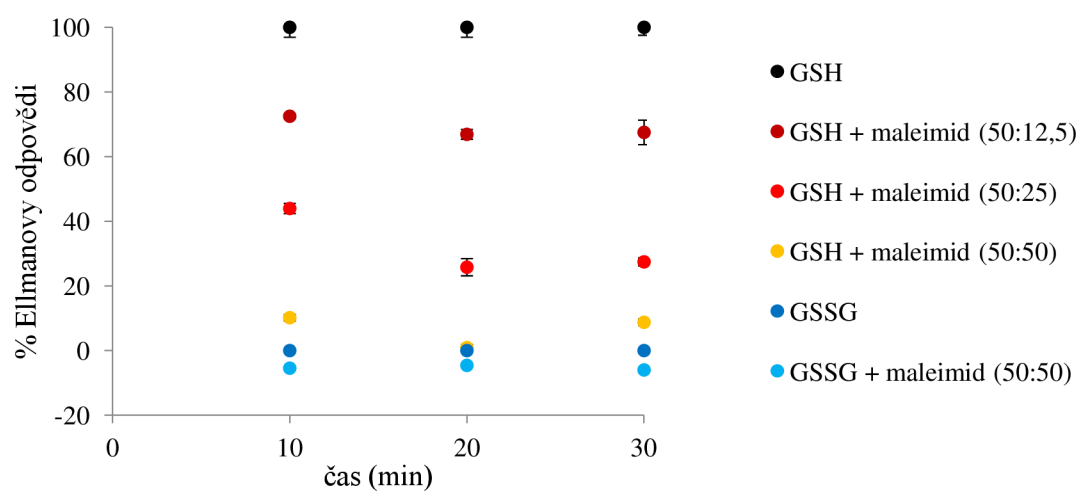
Graf č. 17: GSH ($c = 5, 10, 15, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + NO₂MAG ($c = 0, 10, 25, 50 \mu\text{mol/l}$), GSSG ($c = 5, 10, 15, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + NO₂MAG ($0, 50 \mu\text{mol/l}$), pufr - Na-fosfátový pH 7,4.



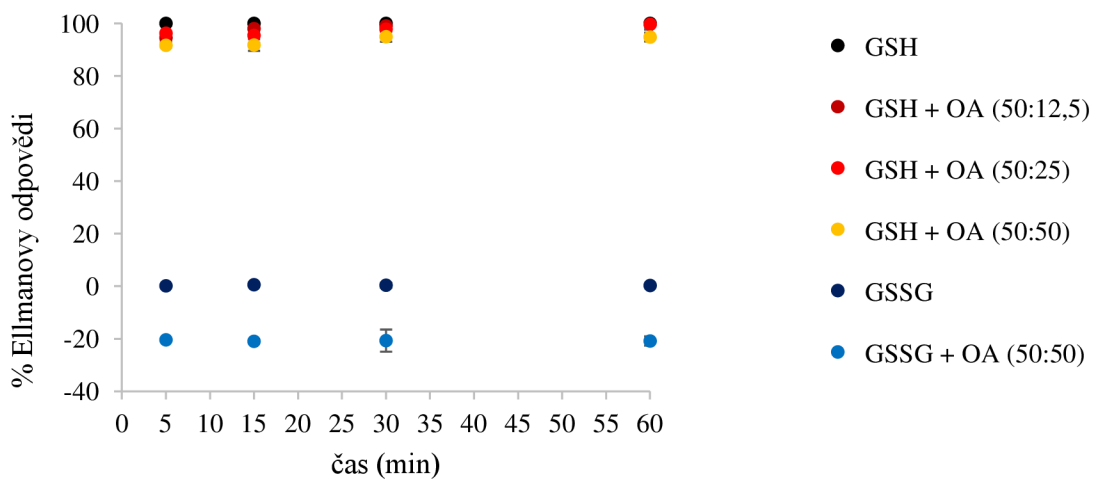
Graf č. 18: GSH ($c = 5, 10, 15, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + NO₂MAG ($c = 0, 10, 25, 50 \mu\text{mol/l}$), GSSG ($c = 5, 10, 15, 25, 50, 100 \mu\text{mol/l}$) + NO₂MAG ($0, 50 \mu\text{mol/l}$), pufr - Britton-Robinsonův pH 9,5.



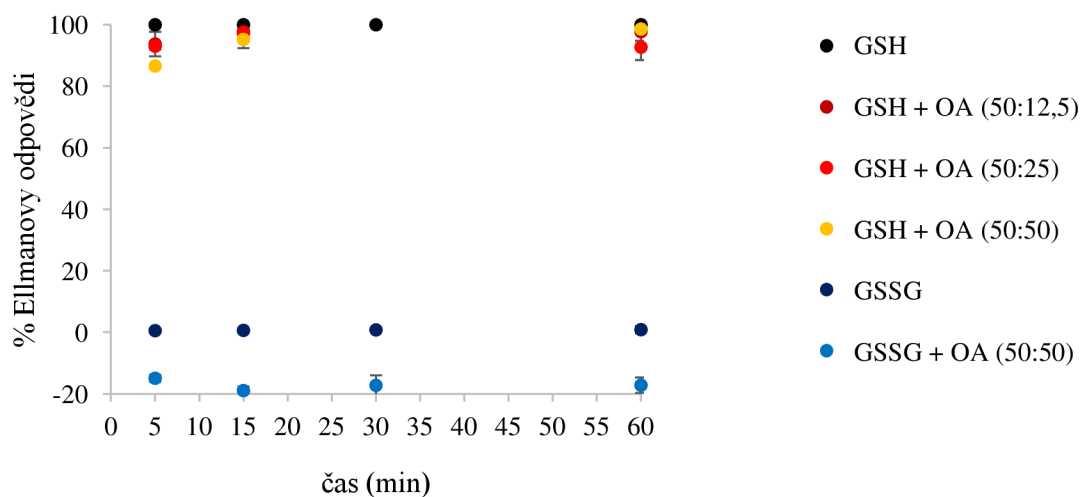
Graf č. 19: GSH ($c = 50 \mu\text{mol/l}$) + maleimid ($c = 0; 12,5; 25; 50 \mu\text{mol/l}$), GSSG ($50 \mu\text{mol/l}$) + maleimid ($c = 0, 50 \mu\text{mol/l}$), pufr - Na-fosfátový **pH 7,4**.



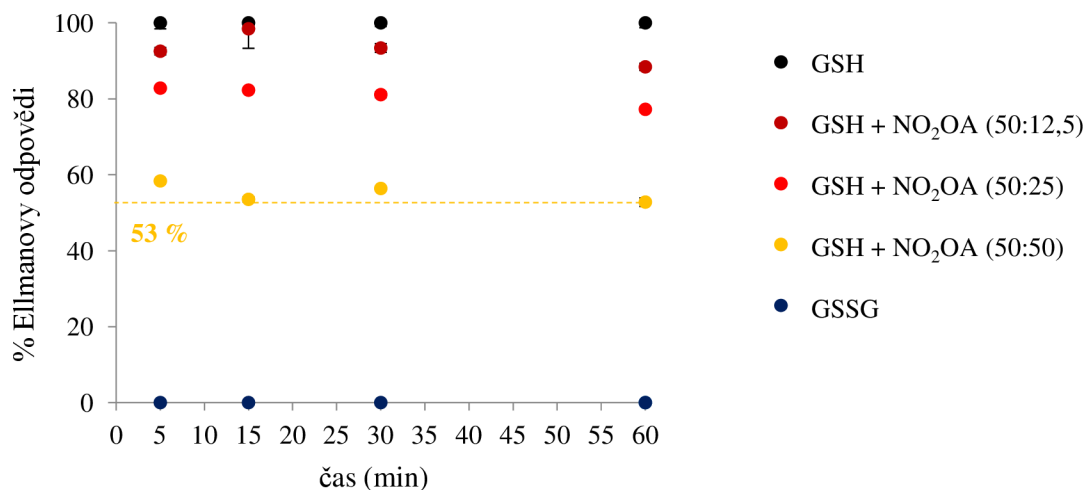
Graf č. 20: GSH ($c = 50 \mu\text{mol/l}$) + maleimid ($c = 0; 12,5; 25; 50 \mu\text{mol/l}$), GSSG ($50 \mu\text{mol/l}$) + maleimid ($c = 0, 50 \mu\text{mol/l}$), pufr - Britton-Robinsonův **pH 9,5**.



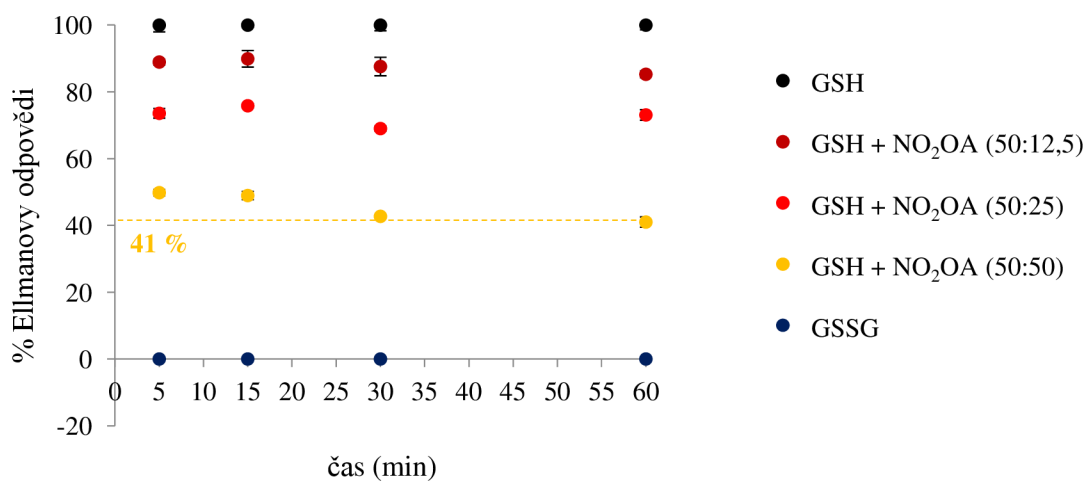
Graf č. 21: GSH ($c = 50 \mu\text{mol/l}$) + OA ($c = 0; 12,5; 25; 50 \mu\text{mol/l}$), GSSG ($50 \mu\text{mol/l}$) + OA ($c = 0, 50 \mu\text{mol/l}$), pufr - Na-fosfátový **pH 7,4**.



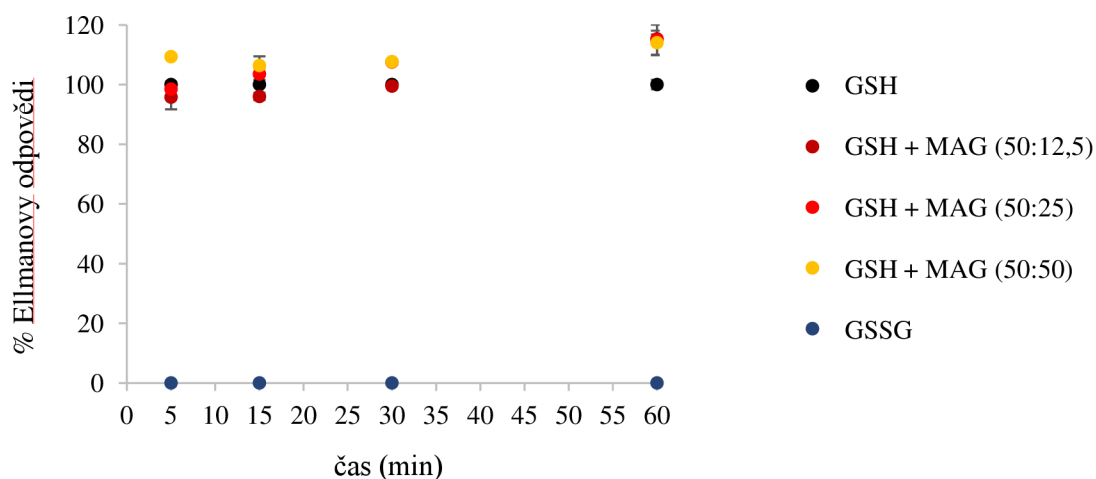
Graf č. 22: GSH ($c = 50 \mu\text{mol/l}$) + OA ($c = 0; 12,5; 25; 50 \mu\text{mol/l}$), GSSG ($50 \mu\text{mol/l}$) + OA ($c = 0, 50 \mu\text{mol/l}$), pufr - Britton-Robinsonův **pH 9,5**.



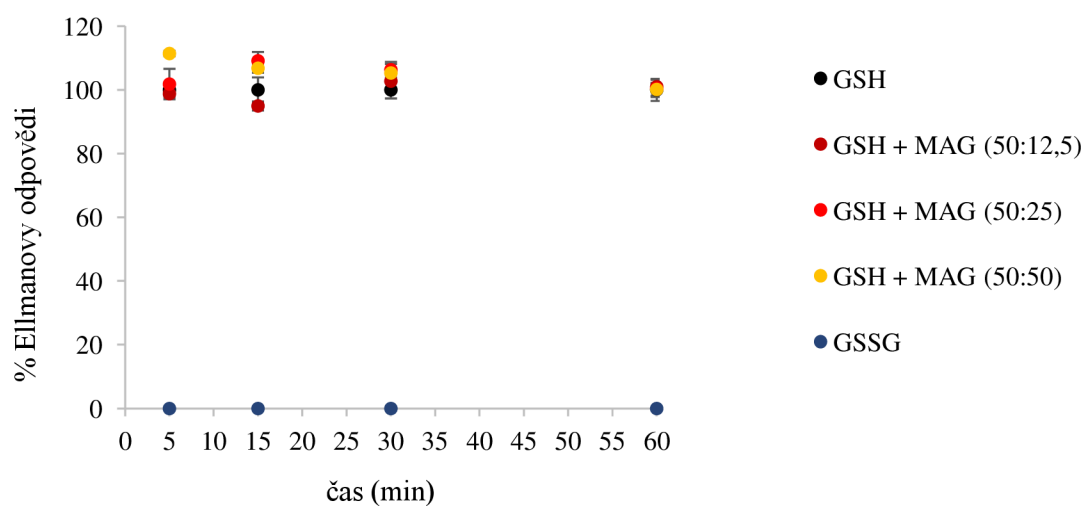
Graf č. 23: GSH ($c = 50 \mu\text{mol/l}$) + NO₂OA ($c = 0; 12,5; 25; 50 \mu\text{mol/l}$), GSSG ($50 \mu\text{mol/l}$), pufr - Na-fosfátový **pH 7,4**.



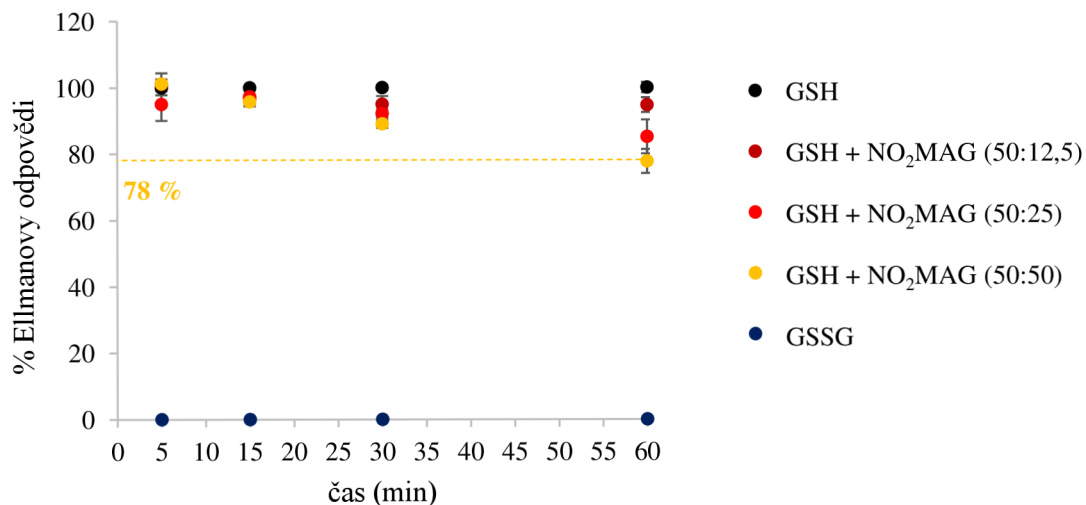
Graf č. 24: GSH ($c = 50 \mu\text{mol/l}$) + NO₂OA ($c = 0; 12,5; 25; 50 \mu\text{mol/l}$), GSSG ($50 \mu\text{mol/l}$), pufr - Britton-Robinsonův **pH 9,5**.



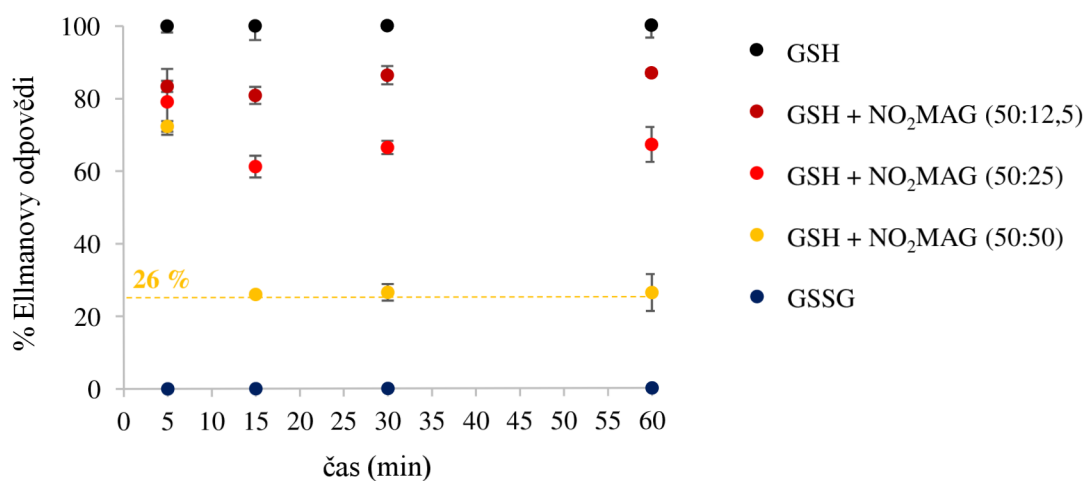
Graf č. 25: GSH ($c = 50 \mu\text{mol/l}$) + MAG ($c = 0; 12,5; 25; 50 \mu\text{mol/l}$), GSSG ($50 \mu\text{mol/l}$), pufr - Na-fosfátový **pH 7,4**.



Graf č. 26: GSH ($c = 50 \mu\text{mol/l}$) + MAG ($c = 0; 12,5; 25; 50 \mu\text{mol/l}$), GSSG ($50 \mu\text{mol/l}$), pufr - Britton-Robinsonův **pH 9,5**.



Graf č. 27: GSH ($c = 50 \mu\text{mol/l}$) + NO₂MAG ($c = 0; 12,5; 25; 50 \mu\text{mol/l}$), GSSG ($50 \mu\text{mol/l}$), pufr - Na-fosfátový **pH 7,4**.



Graf č. 28: GSH ($c = 50 \mu\text{mol/l}$) + NO₂MAG ($c = 0; 12,5; 25; 50 \mu\text{mol/l}$), GSSG ($50 \mu\text{mol/l}$), pufr - Britton-Robinsonův **pH 9,5**.