

Oxidační stres způsobený aktivními látkami pro kosmetický průmysl

Sára Jakubkovičová

Bakalářská práce
2021

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Sára Jakubkovičová**
Osobní číslo: **T19655**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Oxidační stres způsobený aktivními látkami pro kosmetický průmysl**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

1. Kosmeticky a farmaceuticky aktivní látky (AKF) mohou, mimo jiné, vyvolávat oxidační stres vedoucí k poškození DNA. Seznamte se se zdroji oxidačního stresu, jeho vlivu na buněčné funkce, vztahu k poškození DNA a genotoxicitě.
2. Zaměřte se na metody stanovení oxidačního stresu, především pak comet assay.

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- [1] OLIVE P. L., BANÁTH P. J. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. Nature Protocols 1, 23 – 29, 2006. doi:10.1038/nprot.2006.5.
- [2] SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J., RELICHOVÁ, J. et al. Genetika. Brno: Masarykova univerzita, 2009.
- [3] ALBERTS B. et al. Molecular Biology of the Cell 5th ed. Garland Science.
- [4] BARZILAI, A., YAMAMOTO, K. I. DNA damage responses to oxidative stress, DNA Repair. 3 (8), 2004. ISSN 1568-7864.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Zdenka Čapáková, Ph.D.**
Centrum polymerních systémů

Datum zadání bakalářské práce: **2. ledna 2021**
Termín odevzdání bakalářské práce: **21. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 20. února 2021

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Kyslík patří mezi plyny nezbytné pro život. Jeho reaktivní formy jsou běžnými vedlejšími produkty normálního aerobního buněčného metabolismu a hrají důležité fyziologické role v intracelulární buněčné signalizaci a homeostáze. Naše tělo je tak neustále vystaveno útokům reaktivních kyslíkových druhů. Pokud dojde k nerovnováze mezi tvorbou volných radikálů a antioxidační kapacitou organismu nastává oxidační stres, který je původce mnohých nemocí. Předložená bakalářská práce se zaměřuje právě na tuto problematiku, a to v souvislosti s účinky oxidačního stresu na lidskou pokožku. V první části se práce věnuje samotné pokožce a následně jsou popsány volné radikály. Pozornost je věnována i ochraně před oxidačním stresem. Poslední kapitola potom pojednává o možnostech stanovení oxidačního stresu.

Klíčová slova: kyslík, reaktivní formy kyslíku, oxidační stres, antioxidanty, oxidační poškození

ABSTRACT

Oxygen is essential for life. Its reactive forms are common by products of normal aerobic cellular metabolism and play important physiological roles in intracellular cell signaling and homeostasis. Thus, the human body is constantly exposed to attacks of reactive oxygen species. In case of imbalance between free radicals production and antioxidant capacity of the organisms, the oxidative stress arises and can cause various diseases. The bachelor thesis focuses on this topic in the context of oxidative stress effects on the human skin. In the first part, the skin is described, followed by a description of free radicals. Attention is also paid to the protection against oxidative stress. The last chapter is dealing with the possibilities of the determination of oxidative stress.

Keywords: oxygen, reactive oxygen species, oxidative stress, antioxidants, oxidative damage

Chtěla bych poděkovat vedoucí práce Ing. Zdence Capákové, Ph.D, za cenné rady, připomínky a velkou ochotu a vstřícnost. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, která mě po celou dobu studií podporovala.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	8
I TEORETICKÁ ČÁST	9
1 KŮŽE	10
1.1 REGENERACE KŮŽE	10
2 STÁRNUTÍ KŮŽE ZPŮSOBENÉ OXIDAČNÍM STRESEM	12
3 VOLNÉ RADIKÁLY	13
3.1 FYZIOLOGICKÁ AKTIVITA VOLNÝCH RADIKÁLŮ	13
3.2 ŠKODLIVÉ ÚČINKY VOLNÝCH RADIKÁLŮ NA LIDSKÉ ZDRAVÍ.....	14
3.3 REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU	14
3.3.1 Biologické účinky reaktivních forem kyslíku	16
3.3.2 Reaktivní formy kyslíku v aerobním metabolismu	18
3.3.3 Působení reaktivních forem kyslíku na kůži	18
3.4 REAKTIVNÍ FORMY DUSÍKU	19
4 OCHRANA ORGANISMU PROTI OXIDAČNÍMU STRESU	21
4.1 ENZYMATICKÉ ANTIOXIDANTY	22
4.2 NEENZYMATICKÉ ENDOGENNÍ ANTIOXIDANTY	24
4.3 NEENZYMATICKÉ EXOGENNÍ ANTIOXIDANTY	26
5 METODY STANOVENÍ OXIDAČNÍHO STRESU	30
5.1 PŘÍMÉ MĚŘENÍ REAKTIVNÍCH DRUHŮ KYSLÍKU	30
5.2 POŠKOZENÍ PROTEINŮ	31
5.3 POŠKOZENÍ LIPIDŮ.....	32
5.4 POŠKOZENÍ DNA	33
5.4.1 Test cytotoxicity	34
5.4.2 Kometový test	35
5.4.3 Detekce 8-Hydroxy-2'-deoxiguanosinu	37
5.4.4 Alkalická eluce.....	38
5.4.5 Postlabelingové metody	38
ZÁVĚR	39
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	41
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	51
SEZNAM OBRÁZKŮ	53
SEZNAM ROVNIC	54

ÚVOD

Kyslík je nejrozšířenějším prvkem na Zemi. Jeho reaktivní formy (hlavně volné radikály) se účastní mnohých fyziologických, biochemických i patologických procesů. Volné radikály jsou teda reaktivní sloučeniny, které se přirozeně produkují v lidském těle a naše tělo je neustále vystaveno jejich útokům. Mohou mít pozitivní účinky (např. na imunitní systém) nebo negativní účinky (např. lipidy, proteiny nebo oxidaci DNA). K omezení těchto škodlivých účinků organismus vyvinul komplexní ochranu – antioxidační systém. Tento systém reguluje hladinu volných radikálů a udržuje správnou fyziologickou funkci. Skládá se z antioxidačních enzymů (kataláza, glutathionperoxidáza, superoxiddismutáza) a neenzymatických antioxidantů (např. Vitamin E (tokoferol), vitamin A (retinol), vitamin C (kyselina askorbová), glutathion a kyselina močová). Nicméně environmentální stresory (tj. UV záření, ionizující záření, znečišťující látky a těžké kovy) a xenobiotika (tj. antiblastická léčiva) přispívají k výraznému zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku, což způsobuje nerovnováhu. Nerovnováha mezi produkcí volných radikálů a antioxidační obranou vede k stavu oxidačního stresu, který se může podílet na procesech stárnutí, a dokonce i na některých patologických stavech. Nadměrné množství volných radikálů generovaných za podmínek oxidačního stresu způsobují oxidační poškození proteinů, lipidů a nukleových kyselin, což vážně ohrožuje zdraví buněk a přispívá k rozvoji onemocnění, včetně rakoviny.

Tato bakalářská práce je zaměřena na definici volných radikálů, jako původce oxidačního stresu. Jejich vliv na důležité molekuly v lidském těle (lipidy, proteiny, DNA), jejichž poškození může mít negativní vliv na lidské zdraví. Antioxidanty hrají důležitou roli v odbourávání reaktivních forem kyslíku. Nejvýznamnější z nich sú popsány v rámci práce.

Byla vyvinuta řada metod pro určení míry poškození oxidačním stresem. Biomarkery oxidačního stresu lze využít jako důležité nástroje při hodnocení stavu onemocnění u lidí. Proto je v této bakalářské práci věnována pozornost i metodám stanovení oxidačního stresu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KŮŽE

Lidská kůže je největším orgánem lidského těla (představujícím jednu šestinu celkové tělesné hmotnosti), fungujícím jako fyzická bariéra, která chrání tělo před ztrátou vody a před poškozením z vnějšího prostředí, jako jsou patogeny, chemikálie, fyzikální látky a sluneční záření [1, s. 38-42]. Kůže navíc poskytuje základní fyziologické funkce včetně imunitní obrany, termoregulace, senzorickeho vstupu mechanoreceptorů a endokrinních a metabolických mechanismů k udržení optimálního zdraví. Stavba kůže umožňuje její přizpůsobení pohybům a tvarovým změnám těla a dalším funkcím ve vztahu k organismu a okolí. Kůže se skládá ze tří částí:

- epidermis (pokožka)
- dermis (škára)
- tela subcutanea (podkožní vazivo)

Epidermis je povrchová vrstva tvořená epitelem ektodermového původu, směrem k povrchu vytváří zrohovatělou vrstvu. Mimo základní buňky keratinocyty obsahuje i jiné buňky jako melanocyty, Langerhansovy buňky a Merkelovy buňky. Vrstevnatý epitel se směrem k povrchu diferencuje a mění ve *stratum corneum*, která je nositelem bariérové funkce kůže. K pokožce patří i útvary, které z ní vznikají – chlupy, nehty a kožní žlázy.

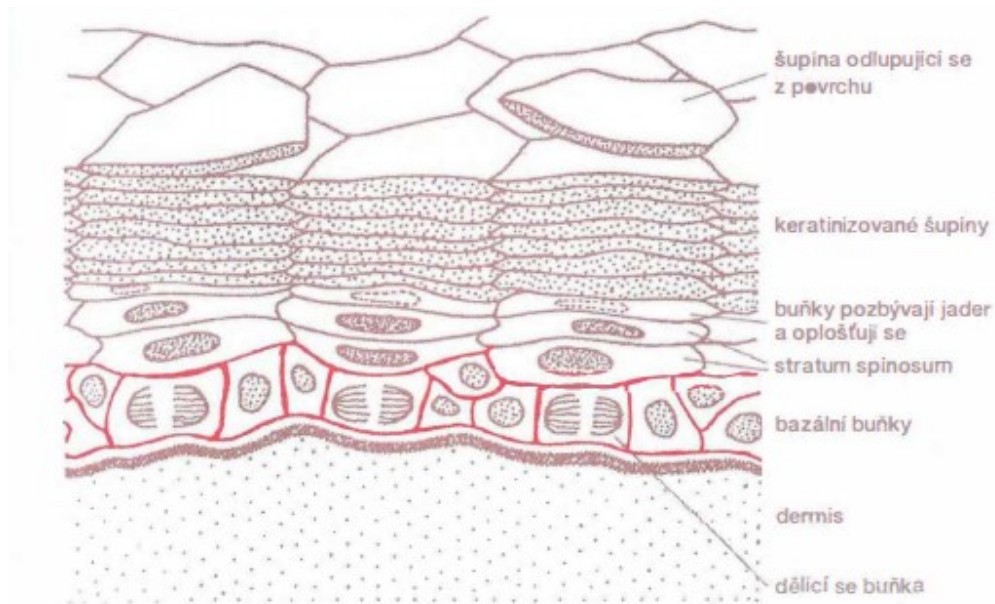
Dermis je fibroelastické vazivo, které vývojově pochází z mesodermu. Tvoří ho dvě vrstvy: *stratum papillare* – obsahuje kromě sítí vláken i větší množství vazivových buněk a je protkaná sítí kapilár a *stratum reticulare* – obsahuje méně vláken a husté svazky kolagenních fibril. Dermis je septy připoutána k *tela subcutanea*, která odděluje kůži od povrchové fascie nebo od periostu.

Tela subcutanea je tvořena tukovou a vazivovou tkání, spojuje kůži s orgány, které se nacházejí pod ní. [2, s. 673] Mimo místa fixovaná ke spodině je tela subcutanea prorostlá lalůčky tuku, vzniká zde tukový polštář. Podkožní tukové vazivo je jednak skladištěm zásobních látek, jednak má ochrannou funkci, izolační funkci při termoregulaci a na některých místech má i význam mechanický. [3, s. 673]

1.1 Regenerace kůže

Jak bylo zmíněno výše, kůže má ochrannou funkci. Představuje důležitou bariéru proti pronikání UV paprsků, invazi patogenů a odpařování vody. Nejvíce postižena těmito vlivy je epidermální vrstva. Zralé buňky vyskytující se na jejím povrchu se neustále odírají a olupují

a jsou nahrazovány proliferací a diferenciací buněk z vnitřních vrstev. Toto obnovování buněk závisí na kmenových buňkách. Epidermální kmenové buňky nejsou diferencované a jsou obtížně identifikovatelné. Mají charakter unipotentních buněk¹, takže může vzniknout jenom jeden typ terminální buňky. Jsou uloženy v nejhlubší vrstvě epidermis, kde dochází k intenzivní mitóze. Poté se diferencující dceřiné buňky přesouvají kolmo vzhůru a dočasně se stávají součástí metabolicky aktivní vrstvy. Během tohoto posunu vzhůru syntetizují keratin. Ve stratum spinosum dochází k oplošťování buněk, ztrátě jádra a intracelulárních organel. Postupně se přemění ploch šupiny obsahující pouze keratin. Tyto šupiny tvoří povrchovou vrstvu epidermis. Proces regenerace vrstvy epidermis je znázorněn na obrázku 1 [4, s. 420-421].



Obrázek 1 – Znázornění regenerace epidermis [4, s. 421]

¹ Buňky, které mohou produkovat pouze jeden typ buněk.

2 STÁRNUTÍ KŮŽE ZPŮSOBENÉ OXIDAČNÍM STRESEM

Oxidační stres hraje důležitou roli při stárnutí lidské kůže a poškození. K oxidačnímu stresu dochází, pokud je překročena tzv. antioxidační kapacita tkání anebo buněk. Mechanismy stárnutí zahrnují tvorbu/vliv reaktivních kyslíkových druhů oxidačním metabolismem a expozici slunečnímu ultrafialovému (UV) záření. Oxidační jevy a molekulární mechanismy stárnutí kůže zahrnují poškození DNA, zánětlivou odpověď, sníženou produkci antioxidantů a tvorbu matricových metaloproteináz, které degradují kolagen a elastin v dermální vrstvě. Všechny tyto události vedou k poškození pokožky a odrážejí proces stárnutí. Dochází k narušení extracelulární dermální matrice, ztrátě pevnosti a elasticity, zhoršení hojení ran, výskytu vrásek, stárnutí a ztrátě tonusu pokožky. Stárnutí kůže lze klasifikovat podle vnitřních a vnějších mechanismů. Vnitřní stárnutí je nevyhnutelný jev, který zahrnuje několik faktorů, jako je genetika, metabolismus a plynutí času, kdy může dojít k poškození opravného procesu. Proces opravy je důležitou součástí stárnutí, protože DNA a jejich genové produkty (tj. proteiny) hrají zásadní roli pro optimální zdraví pokožky. Mitochondrie generují reaktivní formy kyslíku, tímto se produkují volné radikály. Toto může vést k mitochondriálnímu poškození nebo k změně funkce buněk. Pokud je poškození příliš velké může u postižených buněk dojít k buněčné smrti. Pokud nejsou poškozené kožní buňky opraveny, dochází k mutacím, které vedou k předčasnému stárnutí [1, s. 38-42]. Na druhé straně vnějšímu stárnutí lze do jisté míry zabránit. Vnější stárnutí je způsobeno vlivy z vnějšího prostředí, zejména slunečním zářením. Toto se běžně nazývá fotostárnutí (tzv. foto aging). Fotostárnutí je důsledek dlouhodobé expozice UV záření. Předpokládá se, že stárnutí je z 80–90 % způsobeno právě působením UV záření.

Existují různé typy UV záření (UVA, UVB, UVC). Paprsky UVC jsou blokovány ozonovou vrstvou a nedopadají na povrch Země [5, s. 19-40]. UVB představuje pouze 2–5 % emitovaného slunečního záření. Proniká do epidermálních buněk, může poškodit DNA a aktivovat kaskádu událostí vedoucích ke stárnutí pokožky. UVA představuje 95–98 % celkového UV záření dopadajícího na zemský povrch. Proniká hlouběji do dermis, kde degraduje kolagenní a elastinová vlákna. Tato degradace je způsobena oxidačním stresem. Generací reaktivních forem kyslíku dochází ke změnám buněčné aktivity. Toto vede k dezorganizaci dermální matrice a snížení antioxidační ochrany [1, s. 38-42].

3 VOLNÉ RADIKÁLY

Radikály jsou vysoce reaktivní částice, která obsahuje jeden anebo víc nepárových elektronů a mají tendenci doplnit si chybějící elektron. Jsou schopné se navázat na jinou strukturu nebo předat elektron jiné molekule, nebo jí ho odebrat. Volné radikály reagují s různými biologickými strukturami jako jsou mastné kyseliny, lipidy, aminokyseliny, proteiny, mononukleotidy, polynukleotidy, ale i s nízkomolekulárními metabolity, koenzymy a další. Jsou důležitými prostředníky přenosu energie, faktory imunitní ochrany a signální molekuly buněčné regulace. [6, s. 21-69]

Kůže je během života vystavena mnoha faktorům, které ji negativně ovlivňují. Mezi tyto faktory patří oxidační stres způsobený volnými radikály. Volné radikály se snaží spárovat s jinými molekulami a často zahajují kaskádu událostí, které mohou destabilizovat případně zničit celou buňku. Pokud nejsou volné radikály kontrolovány mohou způsobit značné poškození proteinů, lipidů, membrán a DNA. Volné radikály narušují integritu kůže a jiných tkání. [7, s. 104-304] Volné radikály mohou vznikat několika způsoby: homolytickým štěpením kovalentní chemické vazby, kdy každá část získá jeden nepárový elektron, nebo přidáním jednoho elektronu k normální molekule – redukcí, nebo oxidací, což je naopak ztráta jednoho elektronu. Oxidace a redukce jsou energeticky méně náročné v porovnání s homolytickým štěpením, a proto je vznik volných radikálů v biologických systémech uskutečňovaný převážně těmito dvěma procesy. Vznik radikálů může být iniciací celého řetězce dalších reakcí. [6, s. 21-69]

Volné radikály se tvoří ve velkém množství jako nevyhnutelný vedlejší produkt mnoha biochemických procesů a v některých případech záměrně, například v aktivovaných neutrofilech. Kromě toho mohou v těle vznikat volné radikály v reakci na elektromagnetické záření z prostředí a získávat je přímo jako oxidující znečišťující látky, jako je ozon a oxid dusičitý. Pokud je antioxidační obrana nedostatečná, může dojít k poškození v různých tkáních. [8, s. 3-5]

3.1 Fyziologická aktivita volných radikálů

Pokud jsou volné radikály udržovány v nízké nebo střední koncentraci, hrají pro organismus několik prospěšných rolí. Například jsou potřebné k syntéze některých buněčných struktur a k použití v obranném systému hostitele k boji proti patogenům. Fagocyty ve skutečnosti syntetizují a ukládají volné radikály, aby je bylo možné uvolnit při napadení patogenními mikroorganismy [9, s. 3-5]. Volné radikály se také podílejí na řadě buněčných signálních

drah. Mohou být produkovány nefagocytárními izoformami NADPH oxidázy; v tomto případě volné radikály hrají klíčovou regulační roli v intracelulárních signálních kaskádách, v několika buněčných typech, jako jsou fibroblasty, endotelové buňky, buňky hladkého svalstva cév, srdeční myocyty a tkáň štítné žlázy. Pravděpodobně nejznámějším volným radikálem působícím jako signální molekula je oxid dusnatý. Je to důležitý posel mezi buňkami, který je vyžadován pro správnou modulaci průtoku krve a podílí se na trombóze, a je zásadní pro normální nervovou aktivitu. Oxid dusnatý se také podílí na nespecifické obraně hostitele, která je nutná k eliminaci intracelulárních patogenů a nádorových buněk. Další fyziologickou aktivitou volných radikálů je indukce mitogenní reakce [10, s. 315-424].

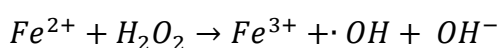
3.2 Škodlivé účinky volných radikálů na lidské zdraví

V případě přebytku způsobují volné radikály a oxidanty jev známý jako oxidační stres. Jedná se o škodlivý proces, který může negativně ovlivnit několik buněčných struktur, jako jsou membrány, lipidy, proteiny, lipoproteiny a deoxyribonukleová kyselina (DNA). Oxidační stres vzniká, když existuje nerovnováha mezi tvorbou volných radikálů a schopností buněk je odbourávat. Například může způsobit přebytek hydroxylového radikálu a peroxynitritu peroxidaci lipidů, což poškozuje buněčné membrány a lipoproteiny. To zase povede k tvorbě malondialdehydu (MDA) a konjugované dienové sloučeniny, o nichž je známo, že jsou cytotoxické i mutagenní. Protože jde o radikálovou řetězovou reakci, peroxidace lipidů se šíří velmi rychle a ovlivňuje velké množství lipidových molekul. Proteiny mohou být také poškozeny oxidačním stresem, mohou podléhat konformačním změnám, které by mohly vést ke ztrátě, nebo poškození jejich enzymatické aktivity [9, s. 3-5]. Dokonce i DNA je náchylná k lézím souvisejícím s oxidačním stresem, z nichž nejreprezentativnější je tvorba 8-oxo-2'-deoxyguanosinu (8-OHdG); toto je obzvláště zhoubná léze DNA, která může být zodpovědná za mutagenezi [11, s. 11-20]. Může také způsobit ztrátu epigenetické informace. Buňky samozřejmě mohou zavést několik mechanismů, jako je oprava základní excize (BER) nebo antioxidanty, jako obranná reakce proti lézím DNA. Pokud není přísně kontrolován, může být oxidační stres zodpovědný za vyvolání několika onemocnění, chronických i degenerativních, stejně jako urychlení procesu stárnutí těla a způsobit akutní patologie (tj. trauma a mrtvice) [9, s. 3-5].

3.3 Reaktivní formy kyslíku

Kyslík je nepostradatelný pro každý aerobní organismus na zemi. Vyskytuje všude kolem nás ve vzduchu. Nachází se v molekule vody, která je součástí všech živých organismů.

Kyslík může být i součástí mnoha organických a anorganických sloučenin, hlavně reaktivnějších funkčních skupin jako jsou hydroxylové, karbonylové aj. Jedná se o reaktivní látku. Reaktivita kyslíku je dána rozmístěním elektronů ve valenčních orbitalech. Díky rozmístění elektronů v orbitalu se kyslík chová jako biradikál [2, s. 16-173]. Termín „reaktivní formy kyslíku“ se používá jak pro volné radikály, tak pro jejich neradikální meziprodukty. Volné radikály jsou definovány jako druhy obsahující jeden nebo více nepárových elektronů, a právě toto předurčuje jejich vysokou reaktivitu [13, s. 2-5]. Při nízkých nebo středních koncentracích jsou potřebné pro fyziologické aktivity, jako je intracelulární buněčná signalizace a homeostáza, buněčná smrt, imunitní obrana proti patogenům. Tyto volné radikály se produkují buď endogenně jako přirozený vedlejší produkt normálního buněčného metabolismu kyslíku. Anebo mohou být navíc indukovány exogenními zdroji, jako je UV světlo, ionizující záření, znečištěné ovzduší, životní styl, strava, stres a kouření. Udržování rovnováhy mezi redukčním a oxidačním stavem je zásadní pro správné fyziologické funkce [3, s. 1-6]. Reaktivní formy kyslíku jsou z 90 % produkovány mitochondriemi během procesu dýchání. Mezi další zdroje tvořící ROS v buňkách patří oxidázy NADPH, které se podílejí na přenosu elektronů přes plazmatickou membránu [4, s. 165]. Za fyziologických podmínek je nejběžnějším volným radikálem kyslíku superoxidový radikál a mitochondrie jsou považovány za hlavní zdroj. Přenos elektronů podél enzymů respiračního řetězce není zcela účinný a únik elektronů na molekulární kyslík, zejména z komplexů I a III, vede k tvorbě superoxidového aniontu. Díky svému náboji je superoxidový aniont nepropustný pro membrány, a tak zůstává uvnitř mitochondriální matrix. Podobně může být superoxid generován také únikem elektronů z kratšího elektronového transportního řetězce v endoplazmatickém retikulu. Superoxid je zhasen enzymem superoxidem dismutázou, který jej převádí na peroxid vodíku. Peroxid vodíku není volný radikál, a proto je méně reaktivní než superoxidový aniont. Avšak hlavně díky jeho účasti při vzniku dalších radikálů spadá pod termín ROS. Jelikož je nepolární, je schopen difundovat buněčnými membránami a membránami organel, a proto působí široce jako druhý posel v drahách přenosu signálu. Peroxid vodíku je zase detoxikován na vodu pomocí enzymů katalázy a glutathion peroxidázy. Je důležité, aby antioxidační enzymy působily ve shodě, protože nerovnováha v koncentracích superoxidového radikálu a peroxidu vodíku může vést k tvorbě mnohem nebezpečnějšího hydroxylového radikálu. Tato reakce je katalyzována volnými železnatými ionty ve Fentonově reakci:



Rovnice 1– Fentonova reakce

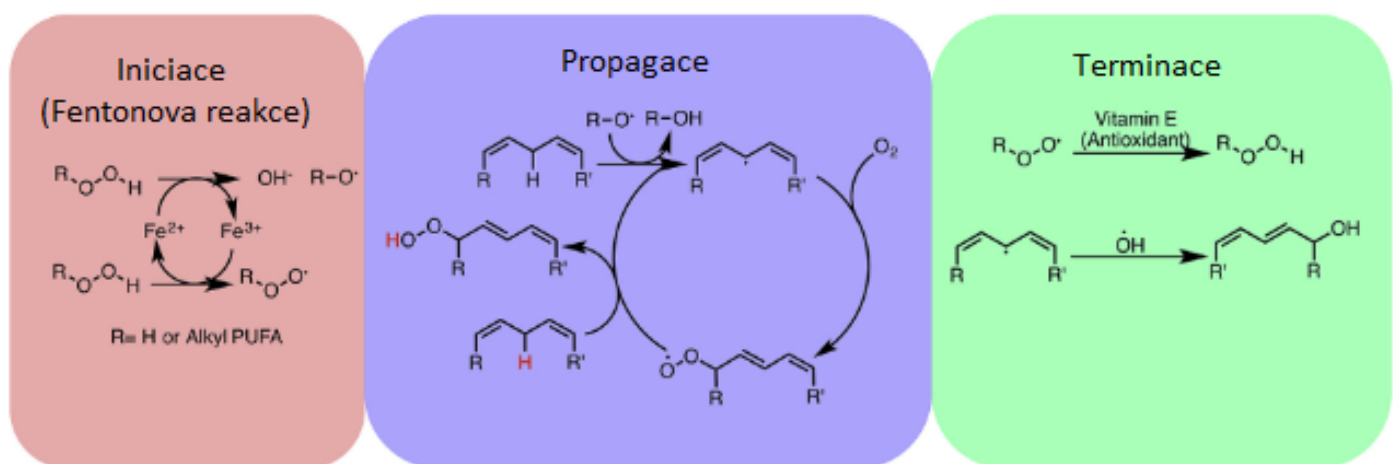
Hydroxylový radikál se považuje za nejreaktivnější volný radikál. Má odhadovaný poločas rozpasu 10^{-9} s a reaguje s jakoukoli biologickou molekulou ve své bezprostřední blízkosti. Nadměrná tvorba superoxidu může také vést k interakcím s oxidem dusnatým za vzniku peroxyinitritu. Peroxyinitrit je silný prooxidant [5, s. 2-5].

3.3.1 Biologické účinky reaktivních forem kyslíku

Otevření iontových kanálů: Nerovnováha ROS vede ke ztrátě intracelulární homeostázy Ca^{2+} s uvolňováním iontů Ca^{2+} z endoplazmatického retikula a dalších zásob. Koncentrace vápníku v lumen ER (endoplazmatické retikulum) je mnohem vyšší než v cytosolu a dosahuje milimolárních hladin. Tato koncentrace je udržována vápníkovými pumpami patřícími do rodiny ATPáz sarcoplazmatického a endoplazmatického retikula a je nezbytná pro správné fungování aparátu skládání proteinů. ROS jsou schopné aktivovat kanály uvolňující vápník v membráně endoplazmatického retikula, které zahrnují inositol-1,4,5, trifosfátový receptor (IP3R) a ryanodinový receptor [16, s. 409-435]. Výsledné uvolňování Ca^{2+} z endoplazmatického retikula aktivuje v buňce různé procesy citlivé na Ca^{2+} . Má také zásadní vliv na funkci. Ztráta aktivity chaperonu má za následek akumulaci nesprávně složených proteinů v lumenu, což vede k další generaci ROS, protože jsou prováděny pokusy o jejich opětovné složení. Akumulace také stimuluje rozvinutou proteinovou odpověď, vysoce konzervovanou sadu signálních drah, které mají za cíl obnovit homeostázu, ale pokud selže, bude stimulovat apoptózu [5, s. 2-5]. Zvýšení koncentrace iontů Ca^{2+} v cytosolu také nepříznivě ovlivňuje mitochondriální funkci, včetně zvýšení jejich vlastní produkce ROS a otevření přechodového póru permeability. Otevření přechodu permeability membrány je podporováno synergicky zvýšenými ionty Ca^{2+} a oxidací thiolových skupin na proteiny ve vnitřní mitochondriální membráně [17, s. 12-15]. Výsledkem je kolaps potenciálu mitochondriální membrány a syntézy ATP. Pokud jsou ovlivněny mitochondrie v celé buňce, koncentrace ATP prudce klesají, iontová homeostáza je ztracena a buňka prochází primární nekrozou. Zapojení omezenějšího počtu organel nebo přechodné otevření pórů může umožnit udržení ATP na úrovních dostatečných k tomu, aby místo toho mohla nastat apoptóza [18, s. 1481–1486].

Peroxidace lipidů: Hydroxylové radikály jsou schopné způsobit peroxidaci lipidů (obrázek 2) v plazmatické membráně nebo v jakékoli organelle, která obsahuje velké množství postranních řetězců polynenasycených mastných kyselin. Abstrahováním vodíku z postranního řetězce uhlovodíků mastné kyseliny vytvářejí radikály centrované na uhlík. Je-li přítomen

kyslík, může reagovat za vzniku peroxylového radikálu, který je zase schopen abstrahovat vodík ze sousední mastné kyseliny, a tak šířit reakci. Protože je vitamin E rozpustný v tucích a má hydrofobní ocas, má tendenci se hromadit uvnitř lipidových membrán. Zde působí jako nejdůležitější přerušovač řetězců, protože reaguje s lipidovými peroxylovými radikály asi čtyřikrát rychleji, než mohou reagovat se sousedními postranními řetězci mastných kyselin. Může být účinně detoxikován v buňkách skupinou enzymů glutathion S-transferázy, ale vysoké hladiny jsou spojeny se ztrátou tekutosti a funkce membrány a aktivací apoptotické kaskády [5, s. 2-5].



Obrázek 2 – Peroxidace lipidů [19, s. 421]

Modifikace proteinů: Aminokyseliny, ať už volné nebo v bílkovinách, jsou terčem oxidačního poškození. Přímá oxidace postranních řetězců vede k tvorbě karbonylových skupin (aldehydy a ketony) a prolin, argenin, lysin a threonin jsou obzvláště náchylné k napadení [6, s. 23-38]. Abstrakce vodíkových iontů z thiolové skupiny cysteinu může vést k tvorbě disulfidových vazeb a abnormálnímu skládání proteinů způsobem analogickým k aktivaci ASK1². Abnormální skládání může vést ke ztrátě funkce, ale také agregaci proteinů a buněčné smrti. Nakonec peroxyinitrit bude reagovat s tyrosinovými zbytky za vzniku 3-nitrotyrosinu. Na fyziologických úrovních je nitrace bílkovin považována za selektivní a reverzibilní proces, který vede k aktivaci analogickým způsobem jako fosforylace, ale při vyšších úrovních může být na škodu [7, s. S66-S69].

² Kináza 1 regulující signál apoptózy

Oxidace DNA: DNA je napadena hlavně hydroxylovými radikály a reakcí s DNA bázemi nebo deoxyribózovými cukry lze vytvářet různé produkty. Například hydroxylový radikál se může přidat ke guaninu za vzniku 8-hydroxy-2'-deoxyguanosinu. Útoky na cukerné skupiny mohou způsobit poškození vlákna, zatímco útoky na histonové proteiny mohou vést ke křížovým vazbám, které narušují skládání chromatinu, opravu DNA a transkripci. Může proto dojít k mutaci nebo aberantní genové expresi. Mitochondriální DNA je obzvláště citlivá na útok ROS kvůli své blízkosti místu generování superoxidových radikálů z řetězce transportu elektronů, nedostatku ochrany proti histonům a minimálních opravných mechanismů, které existují. V důsledku toho je poškození mitochondriální DNA rozsáhlé i za normálních podmínek a mutace se vyskytují pětikrát až desetkrát rychleji než v jaderné DNA [8, s. 6465–6467]. Protože mitochondriální DNA kóduje několik proteinů, včetně enzymů elektronového transportního řetězce, mutace mohou vést ke zhoršení produkce energie a riziku dalšího úniku elektronů, což zvyšuje původní stres [5, s. 2-5].

3.3.2 Reaktivní formy kyslíku v aerobním metabolismu

Při procesu oxidační fosforylace jsou elektrony z NADH a FADH₂ přenášeny na kyslík a vytváří značné množství reaktivních forem kyslíku, které mohou poškodit mitochondriální DNA. Elektrony reagují s kyslíkem, nebo jinými akceptory elektronů a vytvářejí volné radikály. Jelikož mitochondriální DNA postrádá histony a obecně je méně efektivně opravována než jaderná DNA, dochází u mitochondriální DNA k častějším mutacím. V důsledku zvyšujících se mutací se narušuje funkce mitochondrií, což vede k poklesu produkce energie. Vadný respirační řetězec vytváří čím dál více kyslíkových radikálů, které nakonec zničí celou buňku. Předpokládá se, že mutace DNA jsou hlavní příčinou stárnutí a nemocí souvisejících s věkem [7, s. 104-304].

3.3.3 Působení reaktivních forem kyslíku na kůži

Jako největší orgán v našem těle se kůže podílí na několika důležitých fyziologických funkcích jako je regulace tělesné teploty, ochrana vnitřních orgánů, exkrece, výměna látek nebo imunitní funkce atd. Obecně by pokožka měla být hladká, pružná a rovnoměrně zbarvená, ale jak kůže stárne, prochází různými změnami. Některé z nich vedou ke vzniku vrásek, nerovnoměrné pigmentaci nebo ztenčování kůže. Některé z těchto změn způsobuje přítomnost volných radikálů.

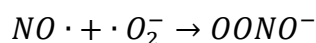
Volné radikály a reaktivní formy kyslíku jsou přirozenou součástí našeho těla, jako vedlejší produkty biologických procesů například buněčného dýchání a oxidační fosforylace. Lidské

tělo se přirozeně brání a zachycuje tyto radikály, ale pokud je tělo vystaveno nadměrnému množství radikálů uvolňujících se působením například UV záření nebo znečištění od cigaretového kouře nebo ozonu, antioxidanty nacházející se přirozeně v těle se s tím nedokážou vypořádat. Při zvýšené produkci superoxidu a peroxidu vodíku například dochází ke snižování elasticity kůže i její imunitní odpovědi. Dále se mohou v kůži hromadit oxidační produkty jako lipofusciny, což jsou granule žlutohnědého pigmentu a způsobují zbarvení kůže. Volné radikály jsou také zodpovědné za mnoho nemocí, včetně rakoviny kůže a stárnutí kůže v důsledku poškození buněčných složek. [7, s. 104-304]

3.4 Reaktivní formy dusíku

Reaktivní formy dusíku jsou odvozené od oxidu dusnatého a superoxidového aniontu, produkovaného prostřednictvím několika enzymů včetně NADPH oxidasy, lipoxygenázy, cyklooxygenázy. Reaktivní formy dusíku mohou způsobovat nitrosativní stres. Nitrosativní stres působí společně s oxidačním stresem na poškození buněk, smrt nebo mitochondriální dysfunkci.

Mezi reaktivní formy dusíku patří oxid dusnatý, peroxyinitrit, nitrotyrosin a nitrosothioly. Reakce oxidu dusnatého (NO) s anionem superoxidu (O_2^-) má za následek tvorbu peroxyinitritu ($ONOO^-$) (rovnice 2.) a iniciaci vzniku reaktivních forem dusíku.



Rovnice 2 – Reakce oxidu dusnatého se superoxidovým aniontem

Peroxyinitrit je toxický, má silné oxidační a nitrační účinky. Právě díky silným oxidačním vlastnostem napadá různé biomolekuly jako DNA, bílkoviny, lipidy, thioly, aminokyseliny, a může tak mít za následek zlomy v DNA, peroxidaci lipidů v membránách, poškození mitochondrií, posttranslační modifikace proteinů, poruchy v buněčné signalizaci, apoptózu a nekrózu buněk. Peroxyinitrit může také generovat další reaktivními formami dusíku, včetně oxidu dusičitého a oxidu dusitého [23, s. 217-218]. Níže na obrázku 3 je uveden přehled reaktivních forem kyslíku a dusíku.

<i>REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU</i>	
<i>Volné radikály</i>	<i>Látky, které nejsou volnými radikály</i>
superoxid, O_2^\bullet	peroxid vodíku, H_2O_2
hydroxylový radikál, HO^\bullet	kyselina chlorná, $HOCl$
peroxyl, ROO^\bullet	ozon, O_3
alkoxyl, RO^\bullet	singletový kyslík, 1O_2
hydroperoxyl, HO_2^\bullet	
<i>REAKTIVNÍ FORMY DUSÍKU</i>	
<i>Volné radikály</i>	<i>Látky, které nejsou volnými radikály</i>
oxid dusnatý, NO^\bullet	nitrosyl, NO^+
oxid dusičitý, NO_2^\bullet	nitroxid, NO
	kyselina dusitá, HNO_2
	oxid dusitý, N_2O_3
	oxid dusičitý, N_2O_4
	nitronium, NO_2^+
	peroxynitrit, $ONOO$
	alkylperoxynitrit, $ROONO$

Obrázek 3 – Přehled reaktivních forem kyslíku a dusíku

[12, s. 22]

4 OCHRANA ORGANISMU PROTI OXIDAČNÍMU STRESU

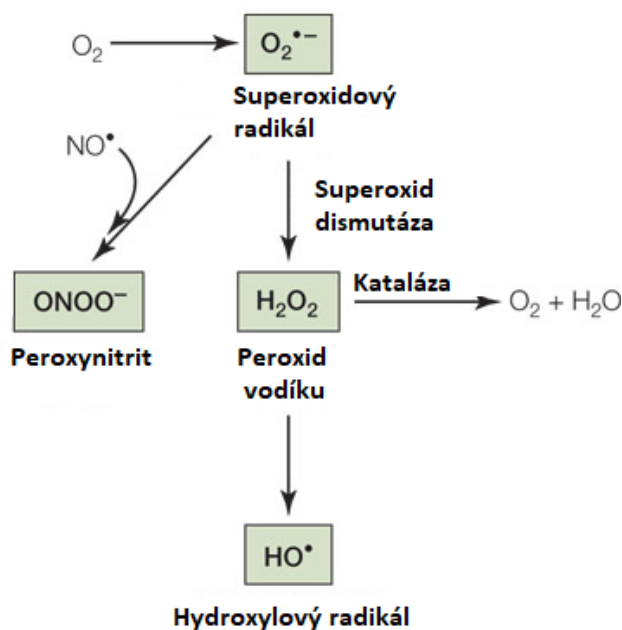
Vzhledem k možnosti poškození tkání není divu, že si tělo vyvinulo antioxidační obranné mechanismy, které ho chrání před útokem volných radikálů. Tyto obranné mechanismy lze běžně považovat za buněčné, membránové a extracelulární. Antioxidant můžeme definovat jako jakoukoli látku, která, je-li přítomna v nízkých koncentracích, ve srovnání s koncentracemi oxidovatelného substrátu, značně zpomaluje nebo inhibuje oxidaci substrátu [8, s. 3-5].

Řada nemocí může být způsobena oxidačním stresem, nerovnováhou vzniku RONS (reaktivní formy kyslíku a dusíku) a jejich odstraňováním. Při řadě chorobných stavů dochází k poklesu kapacity antioxidačního systému a ke zvýšení tvorby radikálů [6, s. 21-23]. Kyslík je poměrně reaktivní a tím je pro aerobní organismy toxický. Antioxidační ochrana umožňuje aerobním organismům přežít v přítomnosti kyslíku. Antioxidanty mohou vznikat buď přímo v organismu nebo mohou být přijímány potravou. Antioxidační ochrana působí na řadu částic, jak na radikály, tak i na neradikálové malé reaktivní molekuly nebo ionty. Patří zde reaktivní kyslíkové částice, reaktivní dusíkové částice, reaktivní halogenové a siriné částice. U organismů se můžeme setkat s řadou obranných systémů, které předcházejí vzniku reaktivních kyslíkových i nekyslíkových derivátů a také je odstraňují, nebo opravují poškozené biomolekuly. Tyto systémy mohou být jak enzymatické, tak i neenzymatické. Antioxidanty jsou obvykle zaměřeny na zneškodnění určité reaktivní částice na určitém místě [2, s. 16-173].

Lidské tělo zavedlo několik strategií proti účinkům volných radikálů a oxidačního stresu, založených na enzymatických a neenzymatických antioxidačních molekulách. Přirozeně se vyskytující antioxidanty v organismu jsou dané geneticky a jedná se o endogenní antioxidanty. Kromě nich existuje několik exogenních antioxidačních molekul živočišného nebo rostlinného původu, zejména přijímané stravou nebo doplňky výživy [9, s. 2-5]. Mezi enzymatické antioxidanty patří superoxid dismutáza (SOD), glutathion peroxidáza (GPx), glutathion reduktáza (GRx) a kataláza (CAT). Neenzymatické antioxidanty se dělí podle původu na endogenní a exogenní. Endogenní antioxidant je glutathion, také nazývaný hlavní antioxidant, kyselina močová a albumin, zatímco exogenní antioxidanty zahrnují karotenoidy, kyselinu askorbovou, α -tokoferol (vitamín E) a flavonoidy [24, s. 11-14]. Tyto antioxidanty chrání lipidy, proteiny a DNA před škodlivými účinky reaktivních forem kyslíku [25, s. 176-178].

4.1 Enzymatické antioxidanty

Superoxid dismutáza – Hraje zásadní roli při ochraně proti oxidačnímu stresu tím, že přeměňuje radikál superoxidu na neutrální, méně toxický peroxid vodíku (obrázek 4) [26, s. 453]. Následně se peroxid vodíku převádí na vodu a kyslík jinými antioxidantními enzymy včetně glutathionperoxidázy nebo katalázy [27, s. 72]. Superoxid dismutáza primární enzymatický antioxidant zodpovědný za odstranění superoxidu v cytosolu a mitochondriích a také chrání buňky před oxidačním stresem [28, s. 1994]. Superoxid dismutáza je metaloenzym, a proto pro svou činnost vyžaduje kovový kofaktor [29, s. 292]. Můžeme ho rozdělit do tří samostatných skupin podle toho, který kov používá pro stabilitu, katalýzu a také celkovou strukturu enzymu. Obsahuje buď železo nebo mangan, měď a zinek nebo nikl [26, s. 453]. Cu / Zn-SOD se dále dělí na intracelulární a extracelulární podle toho, jestli obsahuje N-terminální signální štěpný peptid pro sekreci. Cu / Zn-SOD se díky své fyziologické funkci a terapeutickému potenciálu ukázalo jako značně důležitý typ SOD, na druhé straně je Cu / Zn-SOD také jedním z nejdůležitějších zachycovačů volných radikálů [30, s. 492]. Cu / Zn-SOD je jedním z nejhojnějších rozpustných proteinů, představuje více než 80% intracelulární aktivity SOD a významně chrání buňky před sníženou proliferací, sníženou životností a metabolickými defekty v důsledku oxidačního stresu [31, s. 720]. Mn-SOD je považován za prekursorový protein, který je produkován v mitochondriích a hraje zásadní roli v cytoplazmě po odštěpení signálního peptidu [30, s. 492].



Obrázek 4 – Reakce superoxidového radikálu se superoxid dismutázou [32, s. 308]

Glutathion peroxidáza – GPx je důležitý intracelulární enzym, který štěpí peroxidy vodíku (H_2O_2) na vodu; a peroxidy lipidů na jejich odpovídající alkoholy hlavně v mitochondriích a někdy v cytosolu, typicky za použití glutathionu jako redukčního činidla. V lidském těle existuje několik druhů GPx, GPx1 – GPx8. Jeho aktivita nejčastěji závisí na mikronutrientním kofaktoru známém jako selen. Z tohoto důvodu je GPX často označována jako selenocysteinová peroxidáza. Mají antioxidační funkci na různých místech a buněčných kompartmentech například v cytosolu a mitochondriích, ve střevním epitelu nebo v plazmě a také chrání membrány před oxidačními účinky [29, s. 292].

Kataláza – Je běžný antioxidační enzym přítomný téměř ve všech živých tkáních, které využívají kyslík. Enzym používá buď železo nebo mangan jako kofaktor. Kataláza byla prvním charakterizovaným antioxidačním enzymem a katalyzuje dvoustupňovou přeměnu peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Tato přeměna je znázorněna rovnicí 3.



Rovnice 3 – Dvoustupňová přeměna peroxidu vodíku

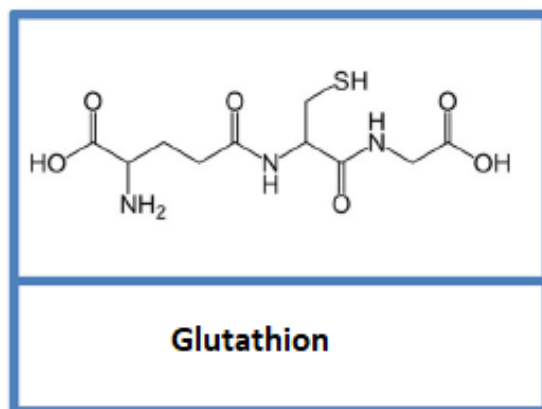
[25, s. 177]

Kataláza se skládá ze čtyř proteinových podjednotek, z nichž každá obsahuje hemovou skupinu a molekulu NADPH. Kataláza je vysoce efektivní; dokáže za jednu sekundu rozbít miliony molekul peroxidu vodíku. Enzym se nachází primárně v peroxisomech, ale chybí v mitochondriích savčích buněk [25, s. 176-178].

4.2 Neenzymatické endogenní antioxidanty

Glutathion – Glutathion je stěžejní antioxidant přítomný ve všech rostlinných a živočišných buňkách [33, s. 6-15]. Jedná se o nízkomolekulární sloučeninu složenou ze tří aminokyselin: glycinu, cysteinu a kyseliny glutamové [34, s. 71-74]. Struktura glutathionu je tripeptid, který se skládá z gama peptidové vazby mezi aminovou skupinou cysteinu a karboxylovou skupinou glutamátového postranního řetězce (obrázek 5). Karboxylová skupina cysteinu je navázána na glycin peptidovou vazbou. Sulfhydrylová skupina cysteinu slouží jako donor protonu a umožňuje glutathionu působit jako antioxidant. Atom síry v sulfhydrylové funkční skupině je ve stavu nízké oxidace, a proto je sulfhydryl silně citlivý na oxidaci i bez přítomnosti enzymu. Homeostáza intracelulárního glutathionu není regulována pouze syntézou *de novo*, ale také několika dalšími faktory, buněčného exportu, využití a recyklace. Tento redoxní cyklus je uznáván jako glutathionový cyklus, který zahrnuje glutathion, spolu s dalšími enzymy souvisejícími s redoxními reakcemi, působí jako první obrana proti nadprodukcí škodlivých ROS a zároveň opravují poškození způsobené ROS [33, s. 6-15]. Ve fyziologických podmínkách je syntetizován v mnoha různých tkáních, ale k nejintenzivnější syntéze glutathionu dochází v hepatocytech. Glutathion v lidském těle je přítomen v několika redoxních formách, z nichž nejdůležitější jsou redukovaný glutathion a oxidovaný glutathion [34, s. 71-74]. V cytosolu buněk vytváří systém, který slouží jako primární ochrana proti nadměrné produkci reaktivních radikálů. Vytváří se ve všech živočišných buňkách. Je součástí velkého množství metabolických reakcí, např. metabolismu askorbátu, udržuje komunikaci mezi buňkami, chrání SH skupiny před oxidací. Glutathion napomáhá urychlit odstranění reaktivních radikálů [2, s. 16-173]. Glutathion zabraňuje poškození buněk vyvolaného ROS, včetně lipidových peroxidů, volných radikálů a těžkých kovů. Glutathion může vychytávat ROS prostřednictvím neenzymatických a enzymatických reakcí. K neenzymatické antioxidační aktivitě přispívá volná thiolová skupina glutathionu. Kromě toho glutathion také detoxikuje oxidanty a elektrofilu pomocí enzymatických reakcí, které zahrnují glutathionreduktázu, glutathionperoxidázu a glutathion-S transferázu. Glutathion hraje klíčovou roli při regulaci redoxního stavu buňky, konkrétně modulací správné terciární struk-

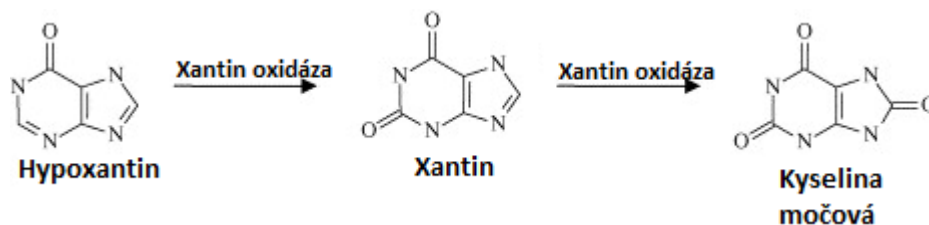
tury proteinů prostřednictvím výměny thiol-disulfidu souběžně s glutaredoxinem a proteinovými disulfidovými izomerázami. Kromě antioxidačních vlastností zahrnuje glutathion také metabolismus hormonů, jako jsou estrogeny, leukotrieny a prostaglandiny, a signální transdukci pro transkripci. Změna koncentrace glutathionu byla spojena s nepříznivými dopady na zdraví, jako je dysregulace buněčné proliferace, transkripce detoxikačních enzymů a apoptóza. Glutathion je kategorizován jako neesenciální živina pro člověka, protože může být syntetizován v těle z aminokyselin, jako je kyselina L-glutamová, L-cystein a glycin [33, s. 6-15]. Regeneruje další oxidované antioxidanty s malými molekulami, například vitamín C a vitamín E, podílí se na opravě proteinových molekul, nukleových kyselin a lipidů poškozených v peroxidačních procesech [34, s. 71-74].



Obrázek 5 – Chemická struktura glutathionu [33, s. 7]

Kyselina močová – Je jednou z nízkomolekulárních organických sloučenin, která vzniká při metabolismu purinů. Kyselina močová je hydrofilní antioxidant, který tvoří dvě třetiny celkové aktivity pro zachycení kyslíku v krevním séru. [35, s. 1-4] Vzniká přeměnou hypoxantinu na xantin oxidací enzymem xantinoxidázou (obrázek 6). Nachází se v krvi a v tělních tekutinách ve formě solí nejčastěji s Na nebo K. Při zvýšené koncentraci kyseliny močové může dojít k vytváření krystalků ve tkáních a následně k onemocnění zvané dna a k tvorbě ledvinových kamenů. Kyselina močová je schopna vychytávat několik oxidantů jako jsou hydroxylové radikály, singletový kyslík, ozon nebo oxidanty založená na dusíku jako je peroxylový radikál. S ionty železa je schopna vytvářet pevný chelátový komplex a tím zabráňuje vstupu železa do fentonovy reakce, při které vzniká toxický hydroxylový radikál.

Kromě toho kyselina močová přispívá k ochraně antioxidantních enzymů, jako je intracelulární superoxiddismutáza 1 a extracelulární superoxiddismutáza 3 [36, s. 10].



Obrázek 6 – Přeměna hypoxantinu na kyselinu močovou [37, s. 2]

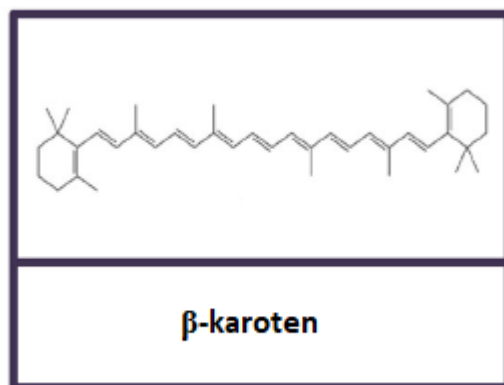
Albumin – Albumin je multifunkční protein, který vykazuje četné fyziologické funkce. Primární úlohou je regulovat osmotický tlak a distribuovat tekutiny mezi různými částmi těla. Podílí se také na přepravě žlučových pigmentů, cholesterolu a mastných kyselin. Nejnovější výzkumy ukazují, že plazmatický albumin je hlavním extracelulárním antioxidantem. Přibližně 40–70 % celkové antioxidantní aktivity lidského sérového albuminu je spojeno s aminokyselinami síry, methioninem a cysteinem, a proto je vynikající pro vychytávání volných radikálů, zejména se sníženým zbytkem cysteinu. Volná sulfhydrylová skupina cysteinu umožňuje albuminu vychytávat hydroxylové radikály. Je schopen zachytit různé reaktivní druhy, jako je peroxid vodíku (H_2O_2), superoxidový radikál (O^{2-}), kyselina chlorovodíková (HOCl) a peroxynitrit (ONOO^-) [34, s. 71-74].

4.3 Neenzymatické exogenní antioxidanty

Karotenoidy – Karotenoidy jsou přirozeně se vyskytující organické pigmenty [33, s. 6-15]. Jsou to rostlinné antioxidanty s konjugovanými dvojnými vazbami. Mají lipofilní povahu. Nachází se v membránách, lipoproteinech a adipocytech lidského těla. Takže největší zastoupení můžeme najít v tukové tkáni, játrech, vaječnicích nebo žluté skvrně oka. Karotenoidy jsou schopny reagovat s reaktivními kyslíkovými formami. Důležité jsou hlavně při působení UV záření a světla na lidské tělo jako jsou oči nebo kůže.

Karotenoidy se dělí do dvou tříd, a to na karoteny a xantofyly. Uhlovodíkové karotenoidy (α -karoten, β -karoten (obrázek 7) a lykopen) jsou známé jako karoteny [38, s. 27-32]. Kyslíkové substituenty (lutein a zeaxanthin), keto / oxo skupiny (echinenon a canthaxanthin), epoxidové skupiny (violaxanthin, antheraxanthin a neoxanthin) a aldehydové skupiny (b-

citraurin) jsou klasifikovány jako komplexní xantofyly [39, s. 727–743.]. Většina karotenoidů jsou tetraterpenoidy, které pocházejí z 8 izoprenové molekuly a obsahují 40 atomů uhlíku. Všechny karotenoidy mají polyisoprenoidovou strukturu složenou z dlouhého konjugovaného řetězce sousedícího s více dvojnými vazbami s téměř symetrií na centrální dvojně vazbě. Tato základní acyklická struktura může být změněna funkčními skupinami bohatými na kyslík. Konjugovaný systém dvojných vazeb bohatý na elektrony umožňuje, aby karotenoidy fungovaly jako účinné lapače radikálů tím, že uhasí singletový kyslík a zachytí peroxylové radikály. Karotenoidy mají nejen antioxidační vlastnosti, ale také usnadňují modulaci buněčného cyklu, apoptózu a buněčnou diferenciaci, posílení imunitního systému, regulaci buněčných signálních drah, podporu růstových faktorů a adhezních molekul. Karotenoidy jsou vysoce lipofilní molekuly, které pobývají intracelulárně a chrání membránu před oxidačním stresem. Karotenoidy jsou dobře známé jako prostředek na ochranu zraku [33, s. 6-15].



Obrázek 7 – Chemická struktura β -karotenu

[33, s. 7]

α -tokoferol (vitamín E) – Jedná se o nejdůležitější antioxidant rozpustný v tucích. Vitamin E sestává ze skupiny osmi strukturně spojených lipofilních chromanolových kongenerů. Vitamin E se obvykle přirozeně vyskytuje v potravinách. Jedná se o souhrnný název skupiny čtyř tokoferolů a čtyř tokotrienolů, z nichž všechny obsahují nasycené a tři dvojně vazby ve svých phytylových koncích. Jak tokoferoly, tak tokotrienoly se dále dělí na α -, β -, γ -, a δ - na základě methylové a hydroxylové substituce v jejich fenolových kruzích. Ze všech izoform vitaminu E se α -tokoferol nachází převážně v savčí tkáni; naopak, γ - tokoferol je primární

formou vitamínu E ve stravě a má silné antioxidační vlastnosti. Aktivita několika proteinových kináz, zejména členů podskupiny proteinových kináz C (PKC), může být modulována v lidských neuronálních buňkách doplněných tokoferoly a tokotrienoly. Tato signalizace ovlivňuje apoptotickou buněčnou smrt a regulaci buněčného cyklu v různých modelech buněčných linií, jako jsou lidské neurony a glioblastomové buňky, se silným účinkem α - a γ -tokoferolu na fosforylační stimulaci izoforem MAPK-ERK pro přežití [33, s. 6-15]. Je schopen reagovat s lipidovými peroxidovými radikály a také se singletovým kyslíkem. Může absorbovat energii z ultrafialového záření, a tak hraje důležitou roli při fotoochraně před reaktivními kyslíkovými radikály. Vitamín E snižuje oxidační poškození biologických membrán a lipoproteinů [2, s. 16-173]. Vitamín E spouští apoptózu rakovinných buněk a inhibuje tvorbu volných radikálů [24, s. 11-14].

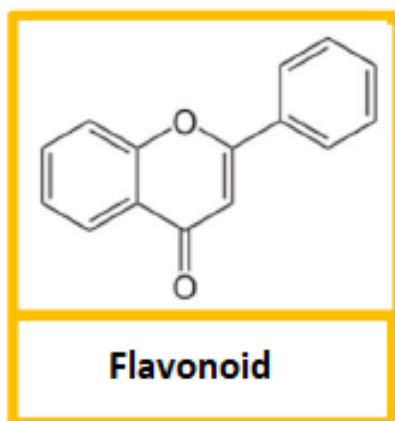
Kyselina askorbová (vitamín C) – Kyselina askorbová, známá také jako vitamin C, je vodě rozpustný antioxidant. Za fyziologických podmínek existuje vitamin C hlavně jako askorbátový anion. Kyselina askorbová má čtyři $-OH$ skupiny, které mohou darovat vodík do oxidačního systému (obrázek 8). Vzhledem k tomu, že skupiny $-OH$ sousedí s atomy uhlíku, je kyselina askorbová citlivá na chelatuující ionty kovů (Fe^{2+}). Kyselina askorbová slouží jako redukční činidlo, zachycuje volné radikály a uhasí superoxidový radikál. Při vysokých hladinách kyseliny askorbové ($> 1\ 000\ mg / kg$) má tendenci přesouvat rovnováhu mezi železitými (Fe^{3+}) a železnatými (Fe^{2+}) ionty, a tím čistit kyslík a inhibovat oxidaci. Kyselina askorbová je kofaktorem mnoha enzymem katalyzovaných reakcí, jako je udržování integrity pojivové a vaskulární tkáně, zvyšování biosyntézy kolagenu a absorpce železa, modulace fungování leukocytů a hematopoézy, neuroprotektce a hydroxylace lysinu a prolinů [33, s. 6-15].



Obrázek 8 – Chemická struktura kyseliny askorbové [33, s. 15]

Flavonoidy – Jsou velmi početná skupina polyfenolických sloučenin (obrázek 9), které můžeme najít ve všech cévnatých rostlinách. Lze je rozdělit do několika podtříd, jako jsou flavony, flavanony, izoflavony, antokyany, flavanoly a flavonoly [40, s. 1558]. Tyto látky byly zkoumány kvůli jejich potenciálním přínosům pro zdraví jako antioxidanty, působení zprostředkované jejich funkčními hydroxylovými skupinami, které jsou schopné zachytit volné radikály a / nebo chelatovat kovové ionty. Jejich antioxidační aktivita závisí na konformačním rozložení funkčních skupin; konfigurace, substituce a celkový počet hydroxylových skupin jsou důležitými faktory při určování mechanismů antioxidační aktivity, jako je vychytávání ROS / RNS a chelatace kovů. Flavonoidy potlačují syntézu ROS, inhibici enzymů nebo chelataci stopových prvků odpovědných za tvorbu volných radikálů, vychytávají ROS a zlepšují antioxidační obranu [9, s. 2-5]. Nachází se v ovoci a zelenině. Dokážou odstraňovat volné radikály a také působí jako ochranné látky při prevenci poškození DNA a oxidaci lipidů [2, s. 16-173]. Flavonoidy mohou vychytávat různé oxidující látky, včetně superoxidového aniontu, hydroxylových nebo peroxylových radikálů [40, s. 1558].

Genistein je sójový isoflavon, který je díky svým širokým farmakologickým aktivitám pravděpodobně nejzajímavější a nejstudovanější sloučeninou flavonoidů. Genistein byl značně používán jako antioxidant v mnoha studiích, které ukazují potenciál pro vychytávání ROS a RNS s vysokou mírou účinnosti. Tato flavonoidová sloučenina je schopna zlepšit antioxidační obranu buňky, čímž zabraňuje apoptotickému procesu modulací několika genů a proteinů. U nelidských primátů a králíků způsobil genistein doplněný stravou aterosklerozu. Další studie pozorovala zvýšení antioxidační ochrany LDL a ateroprotektivní účinek [9, s. 2-5].



Obrázek 9 – Chemická struktura flavonoidu [33, s. 7]

5 METODY STANOVENÍ OXIDAČNÍHO STRESU

V posledních letech výzkumy prokázaly, že oxidační stres je zapojen do přirozeného procesu stárnutí a do celé řady lidských chorob, včetně neurodegenerativních poruch, roztroušené sklerózy, kardiovaskulárních chorob, revmatoidní artritidy a rakoviny. V souladu s tímto vztahem mezi oxidačním stresem a lidským onemocněním, četné studie naznačují, že zvyšující se příjem antioxidantů ve stravě snižuje riziko koronárních srdečních chorob, Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy choroby, ischemické mrtvice a astmatu. Biomarkery oxidačního stresu jsou proto důležitými nástroji při posuzování stavu onemocnění a účinků antioxidantů na zdraví lidí [3, s. 1-6].

5.1 Přímé měření reaktivních druhů kyslíku

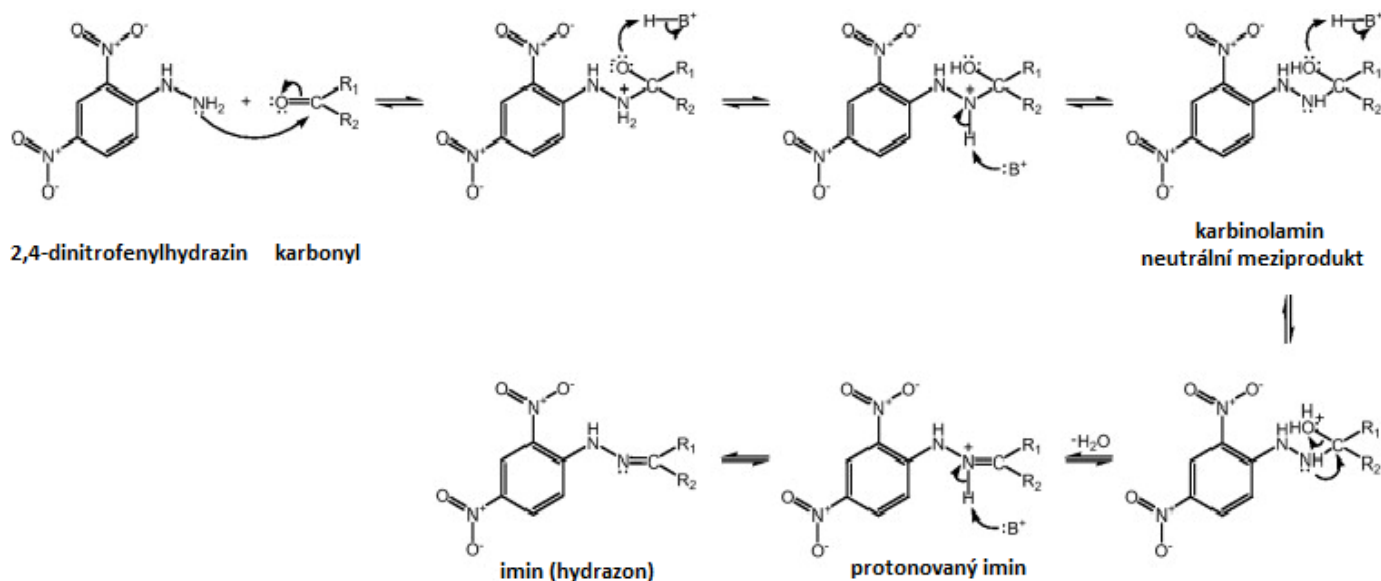
Reaktivní kyslíkové druhy (ROS) jsou klíčové molekuly zodpovědné za škodlivé účinky oxidačního stresu. Stanovení ROS je kvůli jejich krátké době životnosti velmi obtížné stanovit. Avšak existuje několik technik, které k jejich stanovení slouží. Jeden způsob, jak odhadnout buněčné hladiny ROS, je pomocí fluorogenních sond. Peroxid vodíku (H_2O_2), hydroxylové radikály a peroxylové radikály lze měřit po obarvení 5-(a-6)-karboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetátem (DCFDA). Tato membránově propustná sonda difunduje do buněk, kde se hydrolyzuje intracelulární esterázou na DCFH (2',7'-dichlorodihydrofluorescein). Ten zůstává zachycen v buňkách a reaguje s H_2O_2 za vzniku fluorescenčního 2',7'-dichlorfluoresceinu (DCF). Proto lze množství peroxidu produkovaného buňkami odhadnout pomocí intenzity fluorescence DCF, to je pak analyzováno průtokovou cytometrií nebo použitím čtečky fluorescenčních destiček. Superoxidové molekuly lze také detekovat po obarvení další fluorescenční sondou, dihydroethidium (DHE). Forma ethidiumbromidu se sníženým obsahem borohydridu sodného je také propustná pro životaschopné buňky. Uvnitř buněk je DHE přímo oxidován na ethidiumbromid superoxidovým aniontem, který poté fluoreskuje. Dalším způsobem, jak kvantifikovat molekuly ROS, jako jsou u hydroperoxydy, zejména v séru, je testem, při kterém se vyhodnocují deriváty reaktivních metabolitů kyslíku (d-ROMs). V tomto testu je malé množství séra pacienta se rozpustí v roztoku pufovaném acetátem (pH 4,8). Ionty přechodných kovů (Fe^{2+} , Fe^{3+}) uvolněné z proteinů v kyselém prostředí reagují s hydroperoxidovými skupinami a převádějí je pomocí Fentonovy reakce na alkoxy a peroxy radikály. Tyto nově vytvořené radikály se chemicky zachycují pomocí chromogenu (N, N-diethyl-para-fenylendiamin), což vede ke vzniku odpovídajícího radikálového kationtu. Koncentrace těchto nově vzniklých radikálů, které jsou přímo proporcionální

k peroxidům přítomným v séru, se pak stanoví spektrofotometricky při absorpci 505 nm [3, s. 1-6]. Další fyzikální metodou, kterou je možné stanovit ROS je elektronová paramagnetická rezonance nazývaná také spinová rezonance. Tato metoda je založena na silném magnetickém poli, ve kterém jsou sloučeniny obsahující nepárový elektron schopny absorbovat mikrovlnné záření. V současné době se jedná o jednu z nejpřesnějších metod přímého stanovení ROS [41, s. 1433-1435].

Jak již bylo zmíněno výše, přímé stanovení hladiny ROS je velice obtížné kvůli jejich krátké životnosti a rychlé reaktivitě. Zatímco peroxylové radikály a peroxid vodíku jsou relativně stabilní molekuly (s poločasem vteřiny až minut), hydroxylové radikály jsou velmi reaktivní (mají poločas rozpadu menší než nanosekundu). Proto se přistupuje k nepřímému měření ROS zkoumáním oxidačního poškození lipidů, proteinů a nukleových kyselin [3, s. 1-6].

5.2 Poškození proteinů

Obsah karbonylových skupin v proteinu je běžně používaný marker oxidační modifikace proteinů a poskytuje významné důkazy o oxidačním stresu v klinických vzorcích. Karbonylové skupiny v proteinech jsou generovány díky oxidaci páteře proteinů a aminokyselinových zbytků jako je prolin, arginin, lysin a threonin, molekulami ROS. Oxidované proteiny mohou být měřeny použitím metody 2,4-dinitrofenylhydrazinu (DNPH) [42, s. 3]. V tomto testu DNPH reaguje s karbonylovými skupinami a vytváří Schiffovu bázi za vzniku dinitrofenylhydrazonových produktů (obrázek 10), jejichž hladiny mohou být analyzovány spektrofotometricky při 375 nm a korelovat s hladinami oxidovaných proteinů. Alternativně lze obsah karbonylových skupin identifikovat elektroforézou na 2D gelu a westernovým přenosem. Detekce produktů pokročilé oxidace proteinů (AOPP) je dalším možnou metodou k hodnocení oxidace proteinů v klinických vzorcích. AOPP, také definované jako zesíťované proteinové produkty obsahující dityrosin, jsou generovány reakcí plazmatických proteinů s chlorovanými oxidanty, jako jsou chloraminy. V této metodě se plazma nebo sérum pacientů, kalibrované chloraminem-T smísí s jodidem draselným a kyselinou octovou a absorbance se odečte spektrofotometricky při 340 nm [3, s. 1-6].

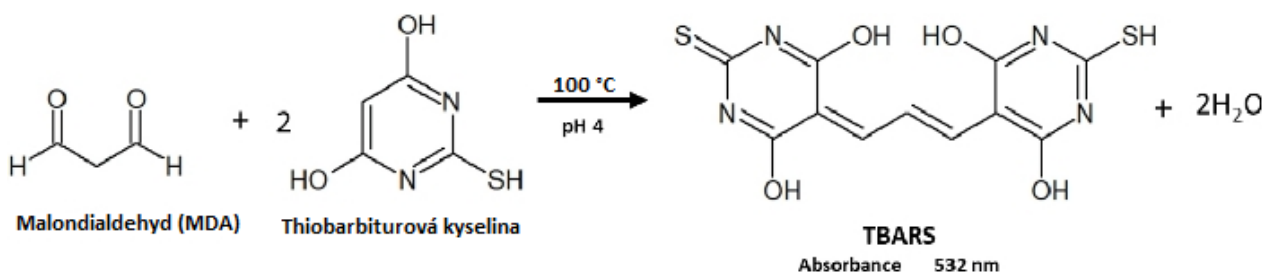


Obrázek 10 – Reakce DNPH s karbonylem [43, s. 1283]

5.3 Poškození lipidů

Peroxidace lipidů se běžně používá jako indikátor poškození buněčných membrán zprostředkovaného ROS. Malondialdehyd (MDA) je jedním z nejlépe studovaných konečných produktů peroxidace polynenasycených mastných kyselin ve vzorcích a často se používá pro odhad podmínek oxidačního stresu [9, s. 33-50]. Hladiny MDA lze měřit pomocí látek reaktivních s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS). Ve všech těchto metodách MDA reaguje s TBARS v kyselém prostředí při 100 °C za vzniku růžově / červeně zbarveného produktu, který lze extrahovat butanolem a měřit spektrofotometricky (obrázek 11). Metoda TBARS je rychlá a snadná. Alternativně lze plazmatický MDA měřit pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s použitím kolony s reverzní fází nebo plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) na kapilární koloně po transmethylaci methoxidem sodným. Zatímco tato metoda určuje úroveň MDA reprodukovatelněji a spolehlivěji, zpracování jednotlivých vzorků je časově náročné, pracné a nepraktické. Další lipidové peroxidační markery zahrnují 8-isoprostaglandin F_{2α}, 4-hydroxy-2-nonenal, konjugované dieny a lipidové hydroperoxydy pro identifikace oxidačního poškození lipidů buněk. 8-isoprostaglandin F_{2α}, generovaný jako produkt neenzymatické peroxidace kyseliny arachidonové v membránových fosfolipidech, lze měřit pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Konjugované dieny vznikají jako důsledek autooxidace polynenasycených mastných kyselin působením volných radikálů. Při detekci

se pozoruje maximální absorpce UV světla při 233 nm. Lipidové hydroperoxydy, které jsou primární oxidační produkty polynenasycených mastných kyselin, lze je stanovit testem, kde dochází k oxidaci železa xylenolovou oranží [3, s. 1-6].



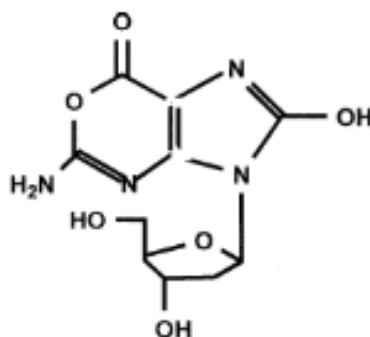
Obrázek 11 – Reakce malondialdehydu s kyselinou thiobarbiturovou [45]

5.4 Poškození DNA

Poškození DNA se projevuje ve velmi nízkých koncentracích. Z toho důvodu je velmi důležité, aby metody zaměřené na stanovení lézí DNA byly velmi citlivé, specifické a velmi důležitý aspekt je i to, aby bylo možné poškození detekovat z malého množství vzorku.

Za nejzávažnější poškození DNA se považuje oxidační poškození guaninu v poloze C8. Guanin je nejcitlivější ze všech bází z důvodu jeho nejnižšího redoxního potenciálu. Právě toto poškození na uhlíku C8 má za následek vznik 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosinu (8-OHdG) (obrázek 12) a je jednou z hlavních oxidačních modifikací v DNA, která je generována hydroxylací deoxyguanosinových zbytků [46, s. 302-308]. Zbytky 8-OHdG mohou být vyříznuty z DNA enzymatickými opravnými systémy, což vede k jejich cirkulaci v krvi a následnému vylučování močí. Úrovně 8-OHdG v krvi a / nebo moči pacientů lze proto měřit jako marker oxidačního poškození DNA. 8-OHdG je často zkoumán pomocí HPLC ve spojení s elektrochemickým detektorem (ECD) [47, s. 521-530]. I přes svou citlivost a přesnost HPLC-ECD (vysokoučinná plynová chromatografie s elektrochemickou detekcí) metoda není příliš vhodná pro analýzu obsahu 8-OHdG v klinických vzorcích kvůli ceně, technické náročnosti a nízké propustnosti. Mezi alternativní a jednodušší způsoby měření tohoto markeru poškození DNA patří enzymová imunoanalýza (ELISA) a imunohistochemická analýza [3, s. 1-6]. Během oxidačního stresu se také generují jednořetězcové nebo dvouřetězcové zlomy v DNA. Tato oxidační poškození DNA lze identifikovat pomocí tzv. kometové analýzy,

který je založen na schopnosti štěpených fragmentů DNA migrovat z jádra při aplikaci elektrického pole, na rozdíl od nepoškozené DNA, která migruje pomaleji a zůstává uvnitř nukleoidu. Posouzení tvaru „komety“ DNA a struktury migrace lze použít k vyhodnocení poškození DNA v buňkách [48, s. 6751–6761]. Obecněji lze různé modifikované báze DNA v klinických vzorcích měřit pomocí plynové chromatografie-hmotnostní spektrometrie s vybraným monitorováním iontů. Zde se kvantifikace těchto produktů provádí hmotnostní spektrometrií s ředěním izotopů za použití jejich stabilních izotopem značených analogů jako vnitřních standardů. Modifikace bází DNA detekované všemi těmito metodami, i když jsou velmi důležité, neposkytují informace o tom, zda je poškození v aktivních genech nebo v křídlové DNA. Zdá se však pravděpodobné, že „exponovaná“ a aktivní DNA bude citlivější na oxidační poškození než ta, která je zabalena do kondenzovaného chromatinu. Alternativně mohou být vyhodnoceny enzymy pro opravu DNA, jako je lidská 8-oxoguanin-DNA-glykosyláza a apurinická / apyrimidinová endonukleáza (APE), které opravují endogenní poškození DNA vyvolané zvýšenými hladinami ROS, aby se odhadlo oxidační poškození [3, s. 1-6].



8-Hydroxy-2'-deoxyguanosin

Obrázek 12 – Chemická struktura 8-Hydroxy-2'-deoxy-guanosinu [49, s. 153]

5.4.1 Test cytotoxicity

Test cytotoxicity je jednou z metod pro biologické hodnocení a screening. Využívá tkáňové buňky ke sledování buněčného růstu, reprodukce a morfologických účinků potenciálně škodlivých látek. Cytotoxicita je jednou z nejdůležitějších metod biologického hodnocení. Při těchto testech se objevují metody pro detekci poškození buněk morfologickými změnami,

stanovení poškození buněk, měření buněčného růstu a metabolických vlastností. Testy cytotoxicity zahrnují: extrakční, přímé a nepřímé kontaktní testy. Extrakční test se používá pro detekci toxicity rozpustných látek. Test přímého kontaktu je nejcitlivější pro testování cytotoxicity [50, s. 617-618].

5.4.2 Kometový test

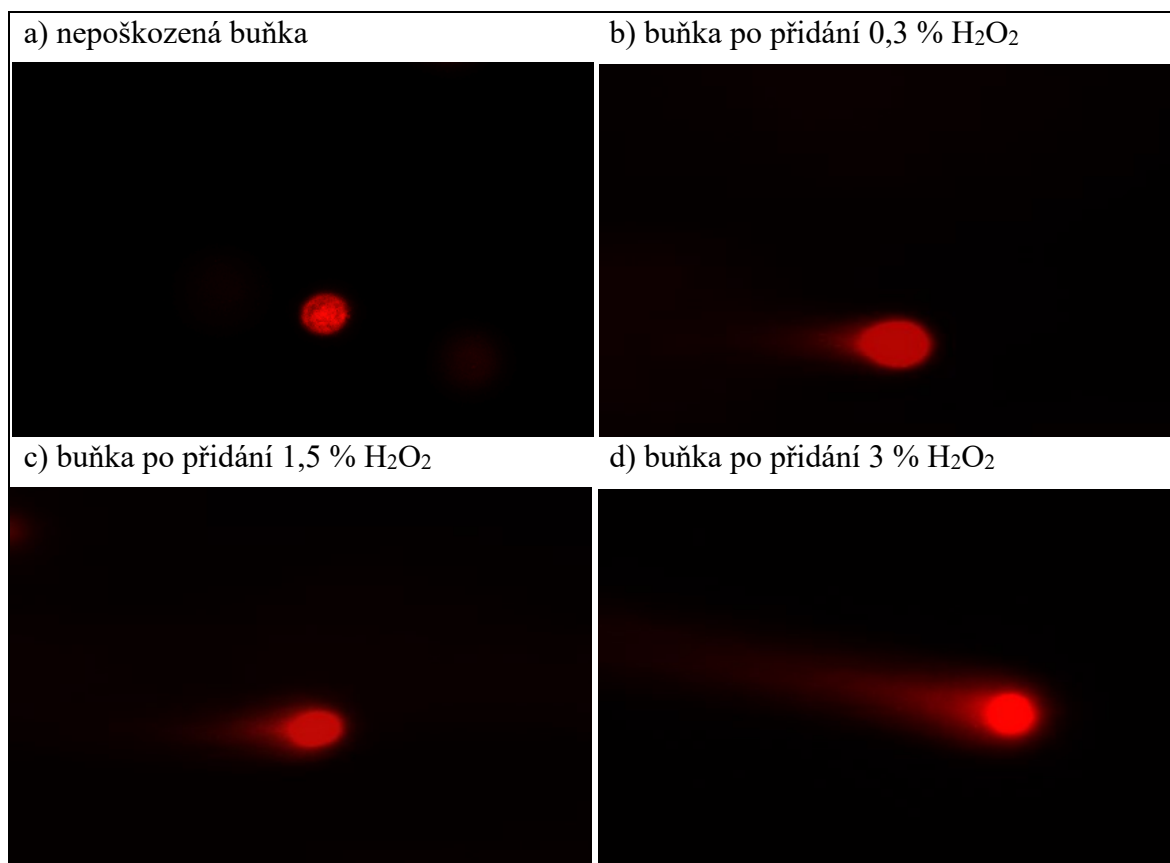
Lidská DNA je vystavena exogenním i endogenním látkám, které mohou modifikovat její strukturu. Tyto strukturální změny mohou mít různé formy: zlomy v cukr-fosfátové kostře zasahující jeden nebo oba řetězce, oxidace nebo alkylace bází, velké molekuly kovalentně spojené s bázemi DNA, proteiny spojené s bázemi DNA, kovalentní vazby mezi bázemi ve stejném řetězci nebo v různých řetězcích a nesprávně spárované báze. Tyto léze DNA mohou ovlivnit transkripci. Pokud nejsou opraveny nebo jsou nesprávně opraveny před replikací mohou způsobovat mutace. Mutace v klíčových genech se podílejí na vývoji rakoviny a jiných degenerativních onemocnění [51, s. 72].

Identifikace a kvantifikace poškození DNA je velmi důležitým předmětem v oblasti biomedicínského výzkumu. Jednou z nejlevnějších, snadno použitelných a nejúspěšnějších metod pro analýzu poškození DNA je tzv. kometový test. Rozsah této metody je poměrně velký a dá se uplatnit v řadě oblastí výzkumu: poškození a opravy DNA, biomonitoringu člověka a molekulární epidemiologie, diagnostiky genetických poruch, sledování kontaminace životního prostředí genotoxiny a testování nových chemických látek na genotoxicitu [52, s. 1]. Mezi výhody této metody patří potřeba relativně malého počtu buněk, použitelnost testu na všechny eukaryotické buňky, detekce poškození DNA na úrovni jednotlivých buněk. Naopak mezi nevýhody patří časová náročnost, četná individuální manipulace – riziko poškození agarózy, nutnost pracovat ve ztemnělém prostředí [53, s. 1].

Kometový test kombinuje gelovou elektroforézu s fluorescenční mikroskopií pro vizualizaci migrace řetězců DNA z jednotlivých buněk vložených do agarózy. Tato metoda je založena na rozdílné elektroforetické pohyblivosti molekuly DNA v agarózovém gelu. Pokud záporně nabitá DNA obsahuje zlomy, DNA superhelix se uvolní a zlomené konce jsou schopny migrovat směrem k anodě během elektroforézy. Pokud je DNA nepoškozená, nedostatek volných konců a velká velikost fragmentů zabraňují migraci. Obecně teda platí, že čím jsou fragmenty DNA menší, tím rychleji migrují v gelu směrem k anodě. Stanovení relativního množství migrované DNA poskytuje jednoduchý způsob měření počtu zlomů DNA v jednotlivých buňkách. Tato metoda může být provedena buď v alkalickém nebo neutrálním

prostředí. Alkalické prostředí se používá pro detekci jednořetězcových i dvouřetězcových zlomů a alkalicky labilních míst v DNA. V neutrálním prostředí se detekují pouze dvouřetězcové zlomy DNA [54, s. 23-29].

Stanovení tvaru, velikosti a množství DNA v kometách je velmi důležitým atributem testu, aby bylo možné přesně vyhodnotit indukované poškození. Poškození můžeme vyhodnotit vizuálně (tj. fotograficky, pod mikroskopem, nebo nesespecifickými systémy pro analýzu obrazu), nebo pomocí softwaru pro analýzu obrazu. Ačkoli vizuální vyhodnocení poskytují poměrně dobrý údaj o poškození DNA, software pro analýzu obrazu je považován za spolehlivý, reprodukovatelný, které poskytuje řadu důležitých informací (např. distribuce DNA v ocasu komety, celkový obsah buněčné DNA) a může také indikovat různé fáze distribuce buněčného cyklu, které mohou být užitečné při interpretaci údajů [55, s. 54-55]. Níže na obrázku 13 můžeme pozorovat poškození buňky při různých koncentracích H_2O_2 .



Obrázek 13 – Znázornění poškození buňky po přidání H_2O_2 o různých koncentracích

Na obrázku 13 můžeme vidět poškození DNA buňky při různých koncentracích H_2O_2 . Na fotografii a) vidíme ohraničené jádro bez známek poškození, tudíž se žádné komety netvoří. Při působení H_2O_2 dochází k poškození DNA a na fotografiích b) – d) můžeme pozorovat, že čím větší je koncentrace H_2O_2 tím více dochází k poškození DNA, a tudíž se vytvoří větší kometa.

5.4.3 Detekce 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosinu

K detekci 8-OHdG v moči nebo jiných biologických vzorcích se používá enzymový imunosorbentní test (ELISA). Měření 8-OHdG v moči pomocí ELISA šetří čas, provozní náklady a objem vzorku. Nevýhodou této metody je, že protilátky mohou křížově reagovat s guaninem a jinými sloučeninami [56, s. 3-14]. Kromě imunotestů byly pro studium poškození oxidační DNA široce vyvinuty chromatografické techniky, jako je GC-MS (Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií) [57, s. 349-356]. Další metodikou detekce 8-OHdG je použití HPLC s elektrochemickým přepínacím systémem kolony (HPLC-ECD), který využívá selektivitu různých uhlíkových kolon. Tento systém lze použít k analýze oxidované DNA v různých matricích. V poslední době se ke studiu 8-OHdG stále častěji používají detekční techniky založené na MS (hmotnostní spektrometrie). 8-OHdG lze také detekovat pomocí extrakce na pevné fázi a HPLC s třístupňovou čtyřnásobnou detekcí hmotnosti. Tato metoda umožňuje vysoce specifické stanovení pro relativně velký objem vzorku. Ačkoli jsou HPLC-MS a GC-MS citlivé a přesné, nejsou to vhodné postupy pro detekci 8-OHdG v klinických vzorcích, a to kvůli komplikovaným extrakčním a separačním krokům, vysokým nákladům, technické náročnosti a nízké propustnosti [58, s. 3].

8-OHdG byl také detekován pomocí kapilární elektroforézy s různými detektory, jako jsou UV, elektrochemické nebo amperometrické detektory. Metoda kapilární elektroforézy s UV detekcí byla použita ke kvantifikaci 8-OHdG v neošetřených vzorcích moči, ale tato technologie trpí nízkou citlivostí [59, s. 5113-5117]. Pro zlepšení citlivosti byla předkoncentrovaná moč analyzována kapilární elektroforézou s elektrochemickou detekcí nebo amperometrickou detekcí na konci. Přestože byla zlepšena citlivost detekce, tyto metody vyžadují extrakci na pevné fázi, aby se vzorky před analýzou koncentrovaly. Proto může být předúprava moči komplikovaná a časově náročná. Kromě toho má omezené použití k analýze vzorků se zvýšenými hladinami 8-OHdG [58, s. 3].

5.4.4 Alkalická eluce

Alkalická eluce je citlivá metoda pro detekci jednořetězcových a dvouřetězcových zlomů DNA indukovaných fyzikálními, chemickými a enzymatickými procesy. [60, s. 60] Metoda alkalické eluce je založena na pozorování, kdy poškozená DNA je eluována rychleji než nepoškozená DNA membránovým filtrem při vysokém pH. Od první publikace Kohna a Ewiga je metoda alkalické eluce vysoce účinnou metodou pro studium genotoxických účinků. Tento test je schopen detekovat a částečně identifikovat různé typy poškození DNA, jako jsou přetržení řetězců, místa labilní v alkalickém prostředí a křížové vazby DNA / DNA nebo DNA / protein. [61, s. 522-523]

5.4.5 Postlabelingové metody

Postlabelingové metody se používají pro měření poškození DNA v buňkách a tkáních po vystavení působení oxidačního stresu. Většina metod je založena na kapalinové chromatografii definovaných modifikací DNA po kyselé hydrolyze nebo enzymatickém štěpení DNA. V následném kroku se poškozené izolované báze buď radioaktivně značí nebo fluoreskují vlivem chemických nebo enzymatických reakcí [62, s. 343].

K detekci lézí DNA byla vyvinuta ^{32}P -postlabelingová metoda. Tato metoda využívá značení nukleotidů radioaktivním fosforem ^{32}P , z čeho plyne aj její název. Izolovaná DNA je enzymaticky hydrolyzovaná na nukleosid-3'-monofosfát, následuje purifikace nukleotidů a jejich značení zmiňovaným ^{32}P . Ten se za pomoci T4-polynukleotidkinázy dostává na 5'-hydroxylový konec modifikovaných nukleosidů. Vyhodnocení značených aduktů probíhá chromatografickými anebo elektroforetickými separačními metodami [63, s. 2772-2781].

ZÁVĚR

Vystavení pokožky oxidačnímu stresu způsobuje mnohé nežádoucí účinky, které mohou přejít až do vážných onemocnění. Jedním ze spouštěčů tvorby volných radikálů je vystavení pokožky slunečnímu záření, kterého výsledkem je tzv. fotostárnutí. Mezi další faktory, mající vliv na vznik těchto vysoce reaktivních a nestabilních molekul, patří životní styl, znečištění životního prostředí, stres, cigaretový kouř, alkohol anebo například strava. Pokožka vystavená oxidačnímu stresu zápasí se snižující se aktivitou kožních buněk, což vede k narušení kožní bariéry. Generace ROS se tak podílí na hyperpigmentaci, zánětlivých změnách a různých abnormalitách v pružnosti kůže a postupně vlivem těchto změn může dojít až k vzniku karcinomu kůže. V boji při ochraně pokožky před volnými radikály hrají velmi důležitou úlohu antioxidanty.

Antioxidanty jsou skupina sloučenin schopných působit proti oxidačnímu stresu a zmírňovat jeho účinky na zdraví jednotlivců. Lidské tělo si vyvinulo několik mechanismů proti působení volných radikálů, založených na působení enzymatických a neenzymatických antioxidačních molekulách.

Cílem této bakalářské práce bylo seznámit se se zdroji oxidačního stresu a jeho vlivem na buněčné funkce. Dále také vztahem oxidačního stresu k poškození DNA a genotoxicitě. Je stále více zřejmé, že ROS hrají ústřední roli v mnoha drahách signální transdukce a jsou přítomny ve všech tkáních. Při nadměrných koncentracích, ať už způsobených zvýšenou tvorbou nebo sníženou detoxikací, může ROS způsobit rozsáhlé a nerozlišující poškození buněk a tkání. ROS lze generovat mnoha cestami uvnitř buněk, ale nejdůležitějšími zdroji jsou mitochondrie, ER a enzymy, jako je NADPH oxidáza.

Pozornost též byla věnovaná vybraným výše zmíněným antioxidantům a jejich účinku v boji proti oxidačnímu stresu. Mezi nejvýznamnější antioxidanty chránící naše tělo patří superoxid dismutáza, glutathion, kyselina močová a skupina vitamínů jako například vitamín C anebo E.

Díky biomarkerům oxidačního stresu je možné posuzovat rozsah oxidačního poškození. Byla vyvinuta řada metod jako už přímých, tak i metod pro měření poškození konkrétních molekul (DNA, lipidy, proteiny). Významným ukazatelem je v tomto případě stanovení poškození DNA. Výběr konkrétní metodiky stanovení závisí na druhu sledovaného poškození. Může se jednat o oxidační poškození jednotlivých bází, alkylaci bází, řetězcové zlomy DNA anebo chromozómové aberace. Ke kvantitativnímu stanovení poškození DNA se nejčastěji

využívají metody stanovení 8-Hydroxy-2'-deoxiguanosinu, kometový test, alkalické eluce anebo postlabelingové metody. Důležitým parametrem pro všechny metody je, aby byly vysoce citlivé a specifické

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] LEPHART, Edwin D. Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. *Ageing Research Reviews* [online]. 2016, **31**, 36-54 [cit. 2021-05-19]. ISSN 15681637. Dostupné z: doi:10.1016/j.arr.2016.08.001
- [2] STRATIL, Pavel a Vlastimil KUBÁŇ. *Reaktivní kyslíkové radikály, přírodní antioxidanty a jejich zdravotní účinky*. 1. vydání. Český Těšín: 2 THETA, 2018. ISBN 9788086380919.
- [3] KATERJI, Meghri, Maria FILIPPOVA a Penelope DUERKSEN-HUGHES. Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2019, **2019**, 1-29 [cit. 2019-12-01]. ISSN 1942-0900. Dostupné z: doi:10.1155/2019/1279250
- [4] LUSHCHAK, Volodymyr I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2014, **224**, 164-175 [cit. 2021-05-15]. ISSN 00092797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2014.10.016
- [5] BURTON, Graham a Eric JAUNIAUX. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* [online]. 2011, **25**(3), 287-299 [cit. 2021-04-27]. ISSN 15216934. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016
- [6] DALLE-DONNE, Isabella, Ranieri ROSSI, Daniela GIUSTARINI, Aldo MILZANI a Roberto COLOMBO. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2003, **329**(1-2), 23-38 [cit. 2021-05-19]. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/S0009-8981(03)00003-2
- [7] MYATT, L. Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta* [online]. 2010, **31**, 66-69 [cit. 2021-05-19]. ISSN 01434004. Dostupné z: doi:10.1016/j.placenta.2009.12.021
- [8] RICHTER, C., J. PARK a B. AMES. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online].

- 1988, **85**(17), 6465-6467 [cit. 2021-05-19]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.85.17.6465
- [9] HALLIWELL, Barry a John GUTTERIDGE. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 1986, **246**(2), 501-514 [cit. 2019-12-09]. ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1016/0003-9861(86)90305-X
- [10] DRAELOS, Zoe Kececioglu. *Skin care and aging*. Carol Stream, IL.: Allured Books, 2011a. ISBN 1932633839.
- [11] DRAELOS, Zoe Kececioglu. *Skin care and aging*. Carol Stream, IL.: Allured Books, 2011b. ISBN 1932633839.
- [12] ČIHÁK, Radomír. *Anatomie*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Ilustroval Ivan HELEKAL, ilustroval Jan KACVINSKÝ, ilustroval Stanislav MACHÁČEK. Praha: Grada, 2011-2016. ISBN 978-80-247-5636-3.
- [13] HULÍN, Ivan. *Patofyziologie*. Ilustroval Albín BRUNOVSKÝ. Bratislava: Slovak Academic Press, 1996. ISBN 80-85665-62-X.
- [14] MURIEL, Pablo. *Liver pathophysiology: therapies and antioxidants*. London, United Kingdom: Academic Press, an imprint of Elsevier, 2017. ISBN 978-0-12-804274-8.
- [15] ŠTÍPEK, Stanislav. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. 1. vyd. Praha: Grada, 2000. ISBN 8071697044.
- [16] TROJAN, Stanislav. *Lékařská fyziologie*. Vyd. 4., přeprac. a dopl. Praha: Grada, 2003. ISBN 8024705125.
- [17] BIRBEN, Esra, Umit SAHINER, Cansin SACKESSEN, Serpil ERZURUM a Omer KALAYCI. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal* [online]. 2012, **5**(1), 9-19 [cit. 2019-07-03]. ISSN 1939-4551. Dostupné z: doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613
- [18] MULLER, Florian, Wook SONG, Yuhong LIU et al. Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2006, **40**(11), 1993-2004

- [cit. 2019-07-03]. ISSN 08915849. Dostupné z:
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.01.036
- [19] PACKER, Lester. *Biothiols, Part B: Glutathione and Thioredoxin: Thiols in Signal Transduction and Gene Regulation*. 252. New York: Academic Press, 1995. ISBN 9780080883656.
- [20] GHYSELINCK, Nobert a Jean-Pierre DUFAURE. A mouse cDNA sequence for epididymal androgen regulated proteins related to glutathione peroxidase. *Nucleic Acids Research* [online]. 1990, **18**(23), 7144-7144 [cit. 2019-07-03]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/18.23.7144
- [21] WOLFE-SIMON, Felisa, Daniel GRZEBYK, Oscar SCHOFIELD a Paul FALKOWSKI. THE ROLE AND EVOLUTION OF SUPEROXIDE DISMUTASES IN ALGAE. *J. Phycol.* [online]. 2005, **41**(6), 453-465 [cit. 2019-07-03]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.00086.x>
- [22] MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA, Iwona, Anna WITKOWSKA a Małgorzata ZUJKO. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in Medical Sciences* [online]. 2018, **63**(1), 68-78 [cit. 2019-12-09]. ISSN 18961126. Dostupné z: doi:10.1016/j.advms.2017.05.005
- [23] LIPPI, Giuseppe, Martina MONTAGNANA, Massimo FRANCHINI, Emmanuel FAVALORO a Giovanni TARGHER. The paradoxical relationship between serum uric acid and cardiovascular disease. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2008, **392**(1-2), 1-7 [cit. 2019-12-09]. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2008.02.024
- [24] MAIUOLO, Jessica, Francesca OPPEDISANO, Santo GRATTERI, Carolina MUSCOLI a Vincenzo MOLLACE. Regulation of uric acid metabolism and excretion. *International Journal of Cardiology* [online]. 2016, **213**, 8-14 [cit. 2019-12-09]. ISSN 01675273. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijcard.2015.08.109
- [25] DE MARCO, Federico, Elona BUCAJ, Cesira FOPPOLI et al. Oxidative Stress in HPV-Driven Viral Carcinogenesis: Redox Proteomics Analysis of HPV-16 Dysplastic and Neoplastic Tissues. *PLoS ONE* [online]. 2012, **7**(3) [cit. 2019-12-09]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0034366

- [26] OCK, Chan-Young. 8-Hydroxydeoxyguanosine: Not mere biomarker for oxidative stress, but remedy for oxidative stress-implicated gastrointestinal diseases. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2012, **18**(4) [cit. 2019-12-09]. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v18.i4.302
- [27] SHIGENAGA, Mark, Jeen-Woo PARK, Kenneth CUNDY, Carlos GIMENO a Bruce AMES. [54] In Vivo Oxidative DNA damage: Measurement of 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA and urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Oxygen Radicals in Biological Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants* [online]. Elsevier, 1990, s. 521-530 [cit. 2019-12-09]. Methods in Enzymology. ISBN 9780121820879. Dostupné z: doi:10.1016/0076-6879(90)86146-M
- [28] WILLIAMS, V., M. FILIPPOVA, V. FILIPPOV, K. PAYNE a P. DUERKSEN-HUGHES. Human Papillomavirus Type 16 E6* Induces Oxidative Stress and DNA Damage. *Journal of Virology* [online]. 2014, **88**(12), 6751-6761 [cit. 2019-12-09]. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.03355-13
- [29] HAIDA, Zainol a Mansor HAKIMAN. A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities. *Food Science & Nutrition* [online]. 2019, **7**(5), 1555-1563 [cit. 2019-12-09]. ISSN 2048-7177. Dostupné z: doi:10.1002/fsn3.1012
- [30] LEPHART, Edwin D. Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. *Ageing Research Reviews* [online]. 2016, **31**, 36-54 [cit. 2019-12-09]. ISSN 15681637. Dostupné z: doi:10.1016/j.arr.2016.08.001
- [31] GONZAGA, Evelyn R. Role of UV Light in Photodamage, Skin Aging, and Skin Cancer. *American Journal of Clinical Dermatology* [online]. 2009, **10**(1), 19-24 [cit. 2019-12-09]. ISSN 1175-0561. Dostupné z: doi:10.2165/0128071-200910001-00004
- [32] SUN, Dianqin, Xiaoming SUN, Yingying XU, Tianjun WU a Lixin TAO. Superoxide dismutase activity and risk of cognitive decline in older adults: Findings from the Chinese Longitudinal Healthy Longevity Survey. *Experimental Gerontology* [online]. 2019, **118**, 72-77 [cit. 2019-12-10]. ISSN 05315565. Dostupné z: doi:10.1016/j.exger.2019.01.010

- [33] IGHODARO, O.M. a O.A. AKINLOYE. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine* [online]. 2019, **54**(4), 287-293 [cit. 2019-12-10]. ISSN 2090-5068. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajme.2017.09.001
- [34] AZQUETA, Amaya, Sabine LANGIE, Elisa BOUTET-ROBINET, Susan DUTHIE, Carina LADEIRA, Peter MØLLER, Andrew COLLINS a Roger GODSCHALK. DNA repair as a human biomonitoring tool: Comet assay approaches. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* [online]. 2019, **781**, 71-87 [cit. 2020-04-09]. ISSN 13835742. Dostupné z: doi:10.1016/j.mrrev.2019.03.002
- [35] ATILA, Ümit, Yusuf BAYDILLI, Eftal SEHIRLI a Muhammed TURAN. Classification of DNA damages on segmented comet assay images using convolutional neural network. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* [online]. 2020, **186** [cit. 2020-04-09]. ISSN 01692607. Dostupné z: doi:10.1016/j.cmpb.2019.105192
- [36] KARBASCHI, Mahsa, Yunhee JI, Abdulhadi ABDULWAHED et al. Evaluation of the Major Steps in the Conventional Protocol for the Alkaline Comet Assay. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, **20**(23) [cit. 2020-04-09]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20236072
- [37] OLIVE, Peggy a Judit BANÁTH. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols* [online]. 2006, **1**(1), 23-29 [cit. 2020-04-14]. ISSN 1754-2189. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2006.5
- [38] PIZZINO, Gabriele, Natasha IRRERA, Mariapaola CUCINOTTA et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2017, **2017**, 1-13 [cit. 2021-04-27]. ISSN 1942-0900. Dostupné z: doi:10.1155/2017/8416763
- [39] BETTERIDGE, D. John. What is oxidative stress?. *Metabolism* [online]. 2000, **49**(2), 3-8 [cit. 2021-04-27]. ISSN 00260495. Dostupné z: doi:10.1016/S0026-0495(00)80077-3
- [40] BRUNBORG, Gunnar, Jørn HOLME, Erik SØDERLUND, James OMIKINSKI a Erik DYBING. An automated alkaline elution system: DNA damage induced by 1,2-

- dibromo-3-chloropropane in vivo and in vitro. *Analytical Biochemistry* [online]. 1988, **174**(2), 522-536 [cit. 2021-04-29]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2697(88)90052-8
- [41] STORER, Richard, Troy MCKELVEY, Andrew KRAYNAK, Michael ELIA, John BARNUM, Lori HARMON, Warren NICHOLS a John DELUCA. Revalidation of the in vitro alkaline elution/rat hepatocyte assay for DNA damage: improved criteria for assessment of cytotoxicity and genotoxicity and results for 81 compounds. *Mutation Research/Genetic Toxicology* [online]. 1996, **368**(2), 59-101 [cit. 2021-04-29]. ISSN 01651218. Dostupné z: doi:10.1016/0165-1218(95)00070-4
- [42] TAN, Bee, Mohd NORHAIZAN, Winnie-Pui-Pui LIEW a Heshu SULAIMAN RAHMAN. Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2018, **9** [cit. 2021-05-02]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2018.01162
- [43] UCHIYAMA, Shigehisa, Yohei INABA a Naoki KUNUGITA. Derivatization of carbonyl compounds with 2,4-dinitrophenylhydrazine and their subsequent determination by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* [online]. 2011, **879**(17-18), 1282-1289 [cit. 2021-05-04]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2010.09.028
- [44] AGUILAR DIAZ DE LEON, Jesús a Chad BORGES. Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2020, (159) [cit. 2021-05-04]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/61122
- [45] ALLEN, D., G. LAMB a H. WESTERBLAD. Skeletal Muscle Fatigue: Cellular Mechanisms. *Physiological Reviews* [online]. 2008, **88**(1), 287-332 [cit. 2021-05-04]. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00015.2007
- [46] COOPER, Nancy, Reza KHOSRAVAN, Carol ERDMANN, John FIENE a Jean LEE. Quantification of uric acid, xanthine and hypoxanthine in human serum by HPLC for pharmacodynamic studies. *Journal of Chromatography B* [online]. 2006, **837**(1-2), 1-10 [cit. 2021-05-04]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2006.02.060

- [47] CADET, Jean, Francette ODIN, Jean-François MOURET, Michel POLVERELLI, Annie AUDIC, Paolo GIACOMONI, Alain FAVIER a Marie-Jeanne RICHARD. Chemical and biochemical postlabeling methods for singling out specific oxidative DNA lesions. *Mutation Research/DNAging* [online]. 1992, **275**(3-6), 343-354 [cit. 2021-05-04]. ISSN 09218734. Dostupné z: doi:10.1016/0921-8734(92)90037-P
- [48] LI, WEIJIA, JING ZHOU a YUYIN XU. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomedical Reports* [online]. 2015, **3**(5), 617-620 [cit. 2021-05-05]. ISSN 2049-9434. Dostupné z: doi:10.3892/br.2015.481
- [49] GASCHLER, Michael a Brent STOCKWELL. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2017, **482**(3), 419-425 [cit. 2021-05-18]. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2016.10.086
- [50] LIU, Huihui, Jianyu HE, Changfeng CHI a Yifeng GU. Identification and analysis of icCu/Zn-SOD, Mn-SOD and ecCu/Zn-SOD in superoxide dismutase multigene family of *Pseudosciaena crocea*. *Fish & Shellfish Immunology* [online]. 2015, **43**(2), 491-501 [cit. 2021-05-18]. ISSN 10504648. Dostupné z: doi:10.1016/j.fsi.2015.01.032
- [51] CHANDRASEKHARAN, Bindu, Claudia MONTLLOR-ALBALATE, Alyson COLIN, Joshua ANDERSEN, Young JANG a Amit REDDI. Cu/Zn Superoxide Dismutase (Sod1) regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2021, **534**, 720-726 [cit. 2021-05-18]. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2020.11.011
- [52] ABU-QARE, Aqel a Mohamed ABOU-DONIA. Increased 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a biomarker of oxidative DNA damage in rat urine following a single dermal dose of DEET (N,N-diethyl-m-toluamide), and permethrin, alone and in combination. *Toxicology Letters* [online]. 2000, **117**(3), 151-160 [cit. 2021-05-18]. ISSN 03784274. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-4274(00)00257-5
- [53] DIKALOV, Sergey, Yuliya POLIENKO a Igor KIRILYUK. Electron Paramagnetic Resonance Measurements of Reactive Oxygen Species by Cyclic Hydroxylamine Spin Probes. *Antioxidants & Redox Signaling* [online]. 2018, **28**(15), 1433-1443 [cit. 2021-05-18]. ISSN 1523-0864. Dostupné z: doi:10.1089/ars.2017.7396

- [54] KUMARAVEL, T., Barbara VILHAR, Stephen FAUX a Awadhesh JHA. Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology* [online]. 2009, **25**(1), 53-64 [cit. 2021-05-18]. ISSN 0742-2091. Dostupné z: doi:10.1007/s10565-007-9043-9
- [55] ZHANG, Cheng, Gergana NESTOROVA, Robert RISSMAN a June FENG. Detection and quantification of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in Alzheimer's transgenic mouse urine using capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2013, **34**(15), 2268-2274 [cit. 2021-05-19]. ISSN 01730835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.201300036
- [56] RAVANAT, J.-L., B DURETZ, A GUILLER, T DOUKI a J CADET. Isotope dilution high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry assay for the measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in biological samples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 1998, **715**(2), 349-356 [cit. 2021-05-19]. ISSN 03784347. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-4347(98)00259-X
- [57] COOKE, M., R. OLINSKI a S. LOFT. Measurement and Meaning of Oxidatively Modified DNA Lesions in Urine. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* [online]. 2008, **17**(1), 3-14 [cit. 2021-05-19]. ISSN 1055-9965. Dostupné z: doi:10.1158/1055-9965.EPI-07-0751
- [58] KVASNICOVÁ, Vladimíra, Eva SAMCOVÁ, Alice JURSOVÁ a Ivan JELÍNEK. Determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in untreated urine by capillary electrophoresis with UV detection. *Journal of Chromatography A* [online]. 2003, **985**(1-2), 513-517 [cit. 2021-05-19]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(02)01527-3
- [59] YOUNG, I S. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology* [online]. 2001, **54**(3), 176-186 [cit. 2019-07-03]. ISSN 00219746. Dostupné z: doi:10.1136/jcp.54.3.176
- [60] TU, Benjamin a Jonathan WEISSMAN. Oxidative protein folding in eukaryotes. *Journal of Cell Biology* [online]. 2004, **164**(3), 341-346 [cit. 2021-05-19]. ISSN 1540-8140. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.200311055

- [61] HOOL, Livia a Ben CORRY. Redox Control of Calcium Channels: From Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling* [online]. 2007, **9**(4), 409-435 [cit. 2021-05-19]. ISSN 1523-0864. Dostupné z: doi:10.1089/ars.2006.1446
- [62] KOWALTOWSKI, Alicia, Roger CASTILHO a Anibal VERCESI. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Letters* [online]. 2001, **495**(1-2), 12-15 [cit. 2021-05-19]. ISSN 00145793. Dostupné z: doi:10.1016/S0014-5793(01)02316-X
- [63] LEIST, Marcel, Barbara SINGLE, Anna CASTOLDI, Simone KÜHNLE a Pierluigi NICOTERA. Intracellular Adenosine Triphosphate (ATP) Concentration: A Switch in the Decision Between Apoptosis and Necrosis. *Journal of Experimental Medicine* [online]. 1997, **185**(8), 1481-1486 [cit. 2021-05-19]. ISSN 0022-1007. Dostupné z: doi:10.1084/jem.185.8.1481
- [64] YAROSHEVICH, I.A., P.M. KRASILNIKOV a A.B. RUBIN. Functional interpretation of the role of cyclic carotenoids in photosynthetic antennas via quantum chemical calculations. *Computational and Theoretical Chemistry* [online]. 2015, **1070**, 27-32 [cit. 2021-05-19]. ISSN 2210271X. Dostupné z: doi:10.1016/j.comptc.2015.07.016
- [65] BERMAN, Judit, Uxue ZORRILLA-LÓPEZ, Gemma FARRÉ, Changfu ZHU, Gerhard SANDMANN, Richard TWYMAN, Teresa CAPELL a Paul CHRISTOU. Nutritionally important carotenoids as consumer products. *Phytochemistry Reviews* [online]. 2015, **14**(5), 727-743 [cit. 2021-05-19]. ISSN 1568-7767. Dostupné z: doi:10.1007/s11101-014-9373-1
- [66] YOUNG, I S. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology* [online]. 2001, **54**(3), 176-186 [cit. 2021-05-18]. ISSN 00219746. Dostupné z: doi:10.1136/jcp.54.3.176
- [67] PACHER, Pál, Joseph S. BECKMAN a Lucas LIAUDET. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological Reviews* [online]. 2007, **87**(1), 315-424 [cit. 2021-05-20]. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00029.2006
- [68] YASUI, Manabu, Yuki KANEMARU, Nagisa KAMOSHITA, Tetsuya SUZUKI, Toshiya ARAKAWA a Masamitsu HONMA. Tracing the fates of site-specifically

introduced DNA adducts in the human genome. *DNA Repair* [online]. 2014, **15**, 11-20 [cit. 2021-05-20]. ISSN 15687864. Dostupné z: doi:10.1016/j.dnarep.2014.01.003

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

NADPH	Nikotinamidadenin dinukleotidfosfát
MDA	Malondialdehyd
BER	Základní oprava excise
ROS	Reaktivní formy kyslíku
ER	Endoplazmatické retikulum
IP3R	Inositol-1,4,5, trifosfátový receptor
ATP	Adenosin trifosfát
ASK1	Kináza 1 regulující signál apoptózy
FADH2	Flavinadenin dinukleotid
RONS	Reaktivní formy kyslíku a dusíku
SOD	Superoxid dismutáza
GPx	Glutathion peroxidáza
GRx	Glutathion reduktáza
CAT	kataláza
PKC	Proteinová kináza C
MAPK	Mitogenem aktivovaná proteinkináza
ERK	Extracelulárně regulovaný signál
LDL	Lipoprotein s nízkou hustotou
DCDFA	5-(a-6)-karboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát
DCFH	2',7'-dichlorodihydrofluorescein
DCF	2', 7'-dichlorfluorescein
DHE	Dihydroethidium
PC	karbonylové skupiny v proteinu karbonylového proteinu
DNPH	2,4-dinitrofenylhydrazin
AOPP	produkty pokročilé oxidace proteinů

TBARS	Látky reaktivní s kyselinou thiobarbiturovou
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
8-OHdG	8-Hydroxy-2'-deoxyguanosin
ECD	Elektrochemický detektor
HPLC-ECD	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickým detektorem
APE	apurinická / apyrimidinová endonukleáza
MS	Hmotnostní spektrometrie
HPLC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Znázornění regenerace epidermis [4, s. 421]	11
Obrázek 2 Peroxidace lipidů [19, s. 421].....	17
Obrázek 3 Přehled reaktivních forem kyslíku a dusíku [12, s. 22].....	20
Obrázek 4 Reakce superoxidového radikálu se superoxid dismutázou [32, s. 308].....	23
Obrázek 5 Chemická struktura glutathionu [33, s. 7]	25
Obrázek 6 Přeměna hypoxantinu na kyselinu močovou [37, s. 2]	26
Obrázek 7 Chemická struktura β -karotenu [33, s. 7].....	27
Obrázek 8 Chemická struktura kyseliny askorbové [33, s. 15]	28
Obrázek 9 Chemická struktura flavonoidu [33, s. 7].....	29
Obrázek 10 Reakce DNPH s karbonylem [43, s. 1283]	32
Obrázek 11 Reakce malondialdehydu s kyselinou thiobarbiturovou [45].....	33
Obrázek 12 Chemická struktura 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosinu [49, s. 153].....	34
Obrázek 13 Znázornění poškození buňky po přidání H_2O_2 o různých koncentracích.....	36

SEZNAM ROVNIC

Rovnice 1 Fentonova reakce.....	15
Rovnice 2 Reakce oxidu dusnatého se superoxidovým aniontem.....	19
Rovnice 3 Dvoustupňová přeměna peroxidu vodíku [25, s. 177]	23