



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

APLIKACE VYBRANÝCH METOD K ANALÝZE OXIDAČNÍHO STRESU

APPLICATION OF SELECTED METHODS FOR OXIDATIVE STRESS ANALYSIS

DIZERTAČNÍ PRÁCE
DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Ing. MARTINA LÍZALOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. RNDr. ANTONÍN LOJEK, CSc.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání dizertační práce

Číslo dizertační práce:	FCH-DIZ0021/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	Ing. Martina Lízalová	
Studijní program:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (P2805)	
Studijní obor:	Chemie životního prostředí (2805V003)	
Vedoucí práce	doc. RNDr. Antonín Lojek, CSc.	
Konzultanti:		

Název dizertační práce:

Aplikace vybraných metod k analýze oxidačního stresu

Zadání dizertační práce:

V plazmě pacientů s chronickou pankreatitidou a u zdravých kontrolních jedinců:

1. Optimalizovat a aplikovat metodu HPLC-DAD k analýze produktů lipidové peroxidace - detekce malondialdehydu (MDA) a 4-hydroxynonenalu (4-HNE) v plazmě.
2. Aplikovat luminometrické a fluorimetrické metody k analýze antioxidační kapacity v plazmě.
3. Aplikovat spektrofotometrickou metodu k analýze nitritů v plazmě.
4. Stanovit hladiny pro- a protizánětlivých cytokinů, společně s myeloperoxidázou a hyaluronanem za použití ELISA metody v plazmě.
5. Markery oxidačního poškození a další biochemické a hematologické parametry u pacientů s chronickou pankreatitidou porovnat se zdravými kontrolními jedinci.
6. Průzkumem a orientovanou dotazníkovou akcí vyhodnotit potenciální vliv environmentální zátěže a životního stylu jednotlivých pacientů na změny hladin parametrů oxidačního stresu.

Termín odevzdání dizertační práce: 2.8.2010

Dizertační práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu dizertační práce. Toto zadání je přílohou dizertační práce.

Ing. Martina Lízalová
Student(ka)

doc. RNDr. Antonín Lojek, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 17.9.2007

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Hlavním cílem dizertační práce byla aplikace vybraných metod k analýze oxidačního stresu a studium markerů oxidačního stresu u pacientů s chronickou pankreatitidou (CHP) v delším časovém intervalu. Chronická pankreatitida (chronický zánět slinivky břišní) je charakterizována jako trvale progredující onemocnění pankreatu s charakteristickými ireverzibilními morfologickými změnami a s možnou trvalou ztrátou funkčnosti slinivky břišní. U pacientů s CHP bylo provedeno celkem pět odběrů, přičemž časový interval mezi jednotlivými odběry činil vždy 6 měsíců. Byla optimalizována a aplikována metoda HPLC-DAD ke stanovení sekundárních produktů lipidové peroxidace – MDA a 4-HNE, dále luminometrická metoda TRAP ke stanovení antioxidační kapacity, spektrofotometrická metoda k analýze dusitanů a ELISA metoda ke stanovení hladiny pro- a protizánětlivých cytokinů (TNF- α , TNF RI, PDGF-AB a TGF- β 1), myeloperoxidázy a hyaluronanu. Jednotlivé markery byly analyzovány v plazmě 113 pacientů s CHP a v plazmě 63 zdravých kontrolních jedinců. Současně bylo všem jedincům zahrnutým do studie provedeno základní biochemické a hematologické vyšetření. U pacientů s CHP v porovnání s kontrolními jedinci byly zjištěny zvýšené koncentrace markerů charakterizujících zánět (dusitanů, TNF RI, HA a MPO) a hematologických a biochemických parametrů (leukocytů, triglyceridů a CRP). Tyto výsledky prokázaly, že u pacientů s CHP existuje chronický zánět. Tento zánět je doprovázený oxidačním stresem, o čemž svědčí významně zvýšené hladiny produktů lipidové peroxidace (MDA a 4-HNE). Tato skutečnost odkrývá souvislost oxidačního stresu se změnami v imunologických, biochemických a hematologických parametrech. Hladiny MDA a 4-HNE společně s hladinami MPO, dusitanů, TNF RI a HA v plazmě pacientů s CHP by tedy mohly být vhodnými ukazateli charakterizujícími pacienty s CHP a mohly by mít u těchto pacientů diagnostický význam. Naproti tomu plazmatické hladiny TNF- α , PDGF-AB a TGF- β 1 byly statisticky významně změněny pouze v některých z pěti provedených odběrů. Lze říci, že tyto cytokiny nejsou vhodnými markery pro diagnózu závažnosti a rozvoje CHP. Oproti původnímu očekávání jsme nepotvrdili postupné zvyšování hladin sledovaných parametrů v časovém intervalu 2,5 let. Průzkumem a orientovanou dotazníkovou akcí byl také vyhodnocen potenciální vliv environmentální zátěže a životního stylu jednotlivých pacientů na změny sledovaných parametrů. Bylo zjištěno, že těžkou formou pankreatitidy trpí častěji muži než ženy. Zdá se, že u těžké chronické pankreatitidy je častější toxická etiologie než idiopatická. Z rizikových faktorů se ukázaly jako významné pití alkoholu, kouření, diabetes mellitus a kalcifikace kostí (ve všech případech jsou častěji vázány na těžší formu CHP). Z dosažených výsledků lze vyvodit následující hlavní závěry. Potvrdilo se, že u pacientů s CHP hraje důležitou roli chronický zánět spojený s oxidačním stresem. Na oxidační stres reaguje organismus zvýšenou produkcí antioxidantů v plazmě pacientů. Tato mírně zvýšená hladina antioxidační kapacity nicméně není schopna oxidační stres eliminovat. Koncentrace produktů lipidové peroxidace, ani zánětlivých markerů se v časovém intervalu 2,5 let neměnily. To je pravděpodobně způsobeno lékovou terapií. Na druhou stranu tato terapie není dostatečně účinná, aby úplně eliminovala oxidační stres a chronický zánět doprovázející CHP. Proto je nutné hledat jiné, ještě účinnější postupy k charakterizaci závažnosti a rozvoje chronické pankreatitidy a její efektivní léčby.

ABSTRACT

The main aim of doctoral thesis was the application of selected methods for oxidative stress analysis and for the study of oxidative stress markers in patients with chronic pancreatitis (CP) during longer time period. Chronic pancreatitis (chronic inflammation of pancreas) is characterized as permanent progressive disease of pancreas with characteristic irreversible morphological changes and with possible permanent loss of pancreas function. Altogether five blood collections were performed during 2.5 year period. HPLC-DAD method was optimised and applied for the determination of secondary lipid peroxidation products – MDA and 4-HNE. Luminometric method TRAP was used for antioxidant capacity assesment, spectrophotometric method was used for nitrite analysis and ELISA method for determination of pro- and anti-inflammatory cytokine levels (TNF- α , TNF RI, PDGF-AB and TGF- β 1), myeloperoxidase and hyaluronan. Particular markers were analysed in plasma of 113 patients with CP and in plasma of 63 healthy controls. Simultaneously, basic biochemical and haematological analyses were performed in all individuals in this study. Levels of markers characterizing inflammation (nitrites, TNF RI, HA and MPO) and haematological and biochemical parameters (leukocytes, triglycerides and C-reactive protein) were significantly higher in the plasma of CP patients, in comparison with healthy controls. These results demonstrated that the chronic inflammation is presented in patients with CP. This inflammation is accompanied with oxidative stress which is proved by significantly higher lipid peroxidation product levels (MDA and 4-HNE). It reveals connection among oxidative stress and changes in immunological, biochemical and haematological parameters. Our results indicate that plasma levels of MDA and 4-HNE along with MPO, nitrites, TNF RI and HA in patients with CP could be suitable indicators characterizing patients with CP and could have a diagnostic significancy. In contrast, TNF- α , PDGF-AB and TGF- β 1 were statistically significantly changed only in some of five performed blood collections. It is possible to state that these cytokines are not suitable markers for diagnosis of severity and progression of CP. Despite of our initial expectation, we did not confirm sequent elevating levels of monitored parameters in 2.5 year period. Effects of life-style of individual patients and influence of potential environmental stress on changes in monitored parameters were evaluated by investigation and oriented questionnaire action. It was found out that males suffer more frequently from heavy pancreatitis than females. In cases of heavy chronic pancreatitis, it seems that toxic etiology is more frequent than idiopathic one. It was demonstrated that alcohol drinking, smoking, diabetes mellitus and bone calcification belong among the most important risk factors. It can be summarized that the oxidative stress plays an important role in patients with CP. Organism responses to oxidative stress by increased antioxidant production in plasma of patients. Nevertheless, this slightly elevated antioxidant capacity level is not capable to eliminate oxidative stress. Concentrations of lipid peroxidation products and inflammatory markers have not been changed during 2.5 year period. It is probably caused by drug therapy. On the other side, this therapy is not able to eliminate oxidative stress and chronic inflammation accompanying CP totally. Therefore, it is necessary to search alternative and advanced procedures for characterization of severity and progression of CP and its effective treatment.

KLÍČOVÁ SLOVA

oxidační stres; lipidová peroxidace; chronická pankreatitida; dusitany; antioxidační kapacita; zánětlivé cytokiny

KEYWORDS

oxidative stress; lipid peroxidation; chronic pancreatitis; nitrites; total antioxidant capacity; inflammatory cytokines

LÍZALOVÁ, M. *Aplikace vybraných metod k analýze oxidačního stresu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 115 s. Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Antonín Lojek, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně a že jsem všechny použité literární zdroje správně a úplně citovala. Dizertační práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího dizertační práce a děkana FCH VUT.

.....
Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Mé poděkování patří především vedoucímu mé dizertační práce doc. RNDr. Antonínu Lojkovi, CSc. za pomoc, konzultace a přátelské vedení. Rovněž Mgr. Lukáši Kubalovi, PhD. za všestrannou neocenitelnou pomoc, odborné rady, povzbuzování a také doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za vynikající odborné konzultace, rady a podporu během mého doktorského studia. Dále děkuji paní Lence Vystrčilové za trpělivost, neocenitelné rady a velkou pomoc při realizaci experimentální části mé práce, Mgr. Michaele Pekarové a všem ostatním pracovníkům a studentům Oddělení patofyziologie volných radikálů BFÚ AV ČR za poskytnutí podpory a optimálních podmínek pro vypracování mé dizertační práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala celé své rodině a Zbyňkovi za silnou psychickou podporu během celého mého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	10
3	TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1	VOLNÉ RADIKÁLY	11
3.1.1	Definice volných radikálů	11
3.1.2	Kyslík a jeho reaktivní metabolity	12
3.1.3	Dusík a jeho reaktivní metabolity	14
3.1.3.1	<i>Oxid dusnatý</i>	14
3.1.3.2	<i>Peroxynitrit</i>	16
3.1.4	Volné radikály z životního prostředí	16
3.2	OXIDAČNÍ STRES	18
3.2.1	Úvod k oxidačnímu stresu	18
3.2.1.1	<i>Oxidační poškození lipidů</i>	19
3.2.1.2	<i>Oxidační poškození proteinů</i>	21
3.2.1.3	<i>Oxidační poškození DNA</i>	22
3.2.1.4	<i>Oxidační poškození kyseliny močové</i>	23
3.2.2	Obranný antioxidační systém	24
3.2.2.1	<i>Primární antioxidanty</i>	24
3.2.2.2	<i>Sekundární antioxidanty</i>	25
3.2.2.2.1	Enzymové antioxidační systémy	25
3.2.2.2.2	Nízkomolekulární antioxidanty	29
3.2.2.3	<i>Terciární antioxidanty</i>	33
3.2.2.3.1	Opravné enzymy DNA	33
3.2.2.3.2	Proteolytické enzymy	34
3.2.3	Chronická pankreatitida	34
3.2.3.1	<i>Oxidační stres v chronické pankreatitidě</i>	39
3.2.3.1.1	Role ROS v chronické pankreatitidě	39
3.2.3.1.2	Role RNS v chronické pankreatitidě	39
3.2.3.1.3	Role lipidové peroxidace v chronické pankreatitidě	39
3.2.3.1.4	Role MPO v chronické pankreatitidě	40
3.2.3.1.5	Role hyaluronanu v chronické pankreatitidě	40
3.2.3.2	<i>Charakteristika vybraných molekul imunitního systému v chronické pankreatitidě</i>	41
3.2.3.2.1	Cytokiny	42
3.2.3.2.2	Receptory cytokinů	44
3.2.3.2.3	Role vybraných cytokinů a receptorů v chronické pankreatitidě	45
3.2.4	Aplikované metody k analýze oxidačního stresu u pacientů s CHP	46
3.2.4.1	<i>Stanovení malodialdehydu (MDA) a 4-hydroxynonenalu (4-HNE) metodou HPLC-DAD</i>	46
3.2.4.2	<i>Metoda TRAP (Total Peroxyl Radical-Trapping Antioxidant Parameter)</i>	47
3.2.4.3	<i>Metoda ORAC</i>	48
3.2.4.4	<i>Stanovení dusitanů</i>	48
3.2.4.5	<i>ELISA</i>	48

4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	52
4.1	Chemikálie	52
4.2	Instrumentace	54
4.2.1	Kapalinový chromatograf Agilent Series 1100.....	55
4.3	Charakteristika pacientů s CHP	57
4.4	Odběr plazmy pacientům s CHP a kontrolním jedincům	57
4.5	Stanovení malondialdehydu (MDA) A 4-hydroxynonenalu (4-HNE) metodou HPLC-DAD	57
4.5.1	Předpříprava plazmy	58
4.5.2	Analýza HPLC-DAD	58
4.6	Antioxidační kapacita plazmy	59
4.6.1	Metoda TRAP	59
4.6.2	Metoda ORAC	59
4.6.3	Porovnání antioxidační kapacity metodou TRAP a ORAC	60
4.7	Stanovení dusitanů	60
4.8	ELISA	60
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	62
5.1	I. odběr pacientů s chronickou pankreatitidou	62
5.2	II. odběr pacientů s chronickou pankreatitidou	64
5.3	III. odběr pacientů s chronickou pankreatitidou	66
5.4	IV. odběr pacientů s chronickou pankreatitidou	68
5.5	V. odběr pacientů s chronickou pankreatitidou	70
5.6	Porovnání jednotlivých markerů v delším časovém intervalu	72
5.7	Porovnání vybraných hematologických a biochemických parametrů v delším časovém intervalu	78
5.8	Shrnutí výsledků a diskuze	84
5.9	Časový vývoj imunologických a biochemických parametrů pacientů s různou tíží pankreatitidy	86
6	ZÁVĚR	94
7	LITERATURA	96
8	SEZNAM ZKRATEK	105
9	PŘÍLOHY	107

1 ÚVOD

Oxidační stres, volné radikály a role antioxidantů patří do popředí dnešního zájmu biologů, biochemiků, farmaceutů a lékařů. Oxidační stres nastává v situaci, kdy dochází ve zdravém aerobním organismu k narušení rovnováhy mezi tvorbou reaktivních kyslíkových radikálů (Reactive Oxygen Species - ROS)/reaktivních dusíkových radikálů (Reactive Nitrogen Species - RNS), jejich metabolitů a obranným antioxidačním systémem. Při této nerovnováze dochází k ataku těchto reaktivních volných radikálů na živé organismy – živočichy i rostliny. Reaktivní volné radikály reagující s buněčnými systémy, mohou oxidovat biomolekuly, což může vést k poškození tkáně, k buněčné smrti nebo ke vzniku zánětlivých procesů.

Mnoho volných radikálů je nepřetržitě produkováno buňkami, kde vznikají jako produkty metabolismu, nebo také například únikem z mitochondriálního respiračního řetězce. Hladiny volných radikálů jsou zvýšeny i díky jejich přísunu z exogenních zdrojů. Jedná se o ionizující záření (z průmyslu, expozice slunečnímu záření, kosmické záření a z lékařských X-paprsků), o toxiny z životního prostředí, ze změn atmosférických podmínek (např. snížený obsah kyslíku nebo naopak zvýšený obsah kyslíku), z ozónu a z oxidu dusnatého (výfukové plyny). Také životní styl může přispět ke zvýšenému příjmu volných radikálů, je to např. kouření, zvýšený přísun alkoholu a další.

K oxidačnímu stresu v organismu dochází v důsledku ataku reaktivních volných kyslíkových a dusíkových radikálů (Reactive Oxygen and Nitrogen Species - RONS). Dochází k poškození, narušení normální funkce tkání, buněk, proteinů, lipidů, DNA a ke vzniku řady chorobných procesů a onemocnění. Negativní působení aktivních forem kyslíku spočívá vedle poškození DNA především v oxidaci buněčných organel a jejich složek. RONS ochotně reagují s již zmíněnými klíčovými biopolymery jako jsou lipidy, proteiny a DNA. Jedním z intenzivně zkoumaných procesů indukovaných volnými radikály je lipidová peroxidace, která vede k tvorbě mutagenních látek jako je malondialdehyd (MDA) a 4-hydroxynonenal (4-HNE), které poškozují přímo proteiny a DNA. Lipoperoxidace je významným mechanismem poškození buňky jak u rostlin, tak u zvířat a může být využita jako indikátor oxidačního stresu v buňkách a tkáních.

Poškození volnými radikály je důležitým faktorem v mnoha patologických a toxických procesech. Oxidační stres se velkou mírou podílí i na vzniku a rozvoji chronické pankreatitidy (chronický zánět slinivky břišní). Zánět vede k poškození buněčných organel prostřednictvím vysoce reaktivních forem kyslíku, které zahrnují superoxidový radikál, peroxid vodíku a hydroxylový radikál, a které jsou produkovány aktivovanými neutrofily a makrofágy v místě zánětu. Dalším vysoce reaktivním oxidantem je kyselina chlorná, která je tvořena myeloperoxidázou (MPO), enzymem produkovaným především u neutrofilů. Vedle reaktivních metabolitů kyslíku se v oxidačním poškození buněk a tkání, ale i v regulaci důležitých biologických dějů uplatňují také reaktivní metabolity dusíku. Tyto metabolity jsou odvozeny od oxidu dusnatého (NO). NO je důležitým mediátorem zánětu a karcinogeneze.

RONS hrají důležitou roli v rozvoji lokálního zánětu pankreatu a systematicky působí komplikace průběhu chronické pankreatitidy. Lze shrnout, že oxidační stres je nepochybně významným faktorem indukce karcinogeneze pankreatu. Ze všech těchto důvodů je užitečné monitorovat oxidační stres u pacientů s chronickou pankreatitidou.

2 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Cílem dizertační práce je studium markerů oxidačního stresu u pacientů s chronickou pankreatitidou proti kontrolním jedincům v delším časovém intervalu.

V plazmě pacientů s chronickou pankreatitidou a u zdravých kontrolních jedinců :

- o Optimalizovat a aplikovat metodu HPLC-DAD k analýze produktů lipidové peroxidace – detekce malondialdehydu (MDA) a 4-hydroxynonenalu (4-HNE).
- o Aplikovat luminometrické a fluorimetrické metody k analýze antioxidační kapacity.
- o Aplikovat spektrofotometrickou metodu k analýze dusitanů.
- o Za použití ELISA metody stanovit hladiny pro- a protizánětlivých cytokinů, myeloperoxidázy a hyaluronanu.
- o Tyto markery oxidačního poškození u pacientů s chronickou pankreatitidou společně s biochemickými a hematologickými parametry porovnat se zdravými kontrolními jedinci.
- o Průzkumem a orientovanou dotazníkovou akcí vyhodnotit potenciální vliv environmentální zátěže a životního stylu jednotlivých pacientů na změny hladin parametrů oxidačního stresu.

Práce byla prováděna na Biofyzikálním ústavu AV ČR, v.v.i. (Oddělení patofyziologie volných radikálů), ve spolupráci s Interní hepatogastroenterologickou klinikou Fakultní nemocnice Brno (Lékařská fakulta MU Brno). Tato práce byla řešena v rámci grantového výzkumného projektu AV ČR *AVOZ50040507* a podporována grantovým projektem *NR 9295-3* (IGA - Interní grantová agentura Ministerstva zdravotnictví ČR).

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 VOLNÉ RADIKÁLY

3.1.1 Definice volných radikálů

Volné radikály jsou chemické částice obsahující jeden nebo více nepárových elektronů, které mohou být součástí molekuly a s nimiž se molekula stává velmi reaktivní [1]. Jsou schopny samostatné existence (proto volné) a svůj jeden nebo více nepárových elektronů poskytují biologickému systému. Po přijetí či odevzdání elektronů se stávají stabilnějšími. Mohou reagovat jako oxidační nebo redukční činidla. Volné radikály pohotově reagují s různými biologickými strukturami – mastnými kyselinami a lipidy, aminokyselinami a proteiny, mononukleotidy a polynukleotidy (nukleovými kyselinami) i s řadou nízkomolekulárních metabolitů, koenzymů a jiných součástí živé hmoty. Díky tomu se staly významnými prostředníky přenosu energie, faktory imunitní ochrany a signálními molekulami buněčné regulace. Tyto volné radikály jsou nepřetržitě produkovány buňkami nebo vznikají jako produkty metabolismu nebo také například únikem z mitochondriálního respiračního řetězce [2, 3].

Za určitých okolností však působí jako toxické látky, jako dezinformační agens a tak mohou organismus poškodit a dokonce ho i usmrtit. Stejně cytotoxické vlastnosti vykazují volné radikály z vnějšího prostředí a vnější faktory – UV-záření, ionizující záření, znečištěné životní prostředí, kouření a další. Poškození volnými radikály je důležitým faktorem v mnoha patologických a toxických procesech.

Nejvýznamnějšími volnými radikály v aerobních organismech jsou kyslík a řada jeho reaktivních forem (ROS) a dusík a jeho reaktivní formy (RNS). Přehled nejdůležitějších reaktivních forem kyslíku a dusíku je shrnut v (Tab. 1). Tyto látky mají značný fyziologický i patogenetický význam.

Volné radikály		Látky neradikálové povahy	
Reaktivní formy kyslíku			
Superoxid	O ₂ •	Peroxid vodíku	H ₂ O ₂
Hydroxylový radikál	HO•	Kyselina chlorná	HOCl
Alkoxylový radikál	RO•	Ozon	O ₃
Peroxylový radikál	ROO•	Singletový kyslík	¹ O ₂
Reaktivní formy dusíku			
Oxid dusnatý	NO•	Peroxynitrit	ONOO•
Oxid dusičitý	NO ₂ •	Dusitany	NO ₂ ⁻
		Dusičnany	NO ₃ ⁻
		Nitrosyl	NO ⁺

Tab. 1 Přehled reaktivních forem kyslíku a dusíku [4].

3.1.2 Kyslík a jeho reaktivní metabolity

Volné radikály poskytuje především metabolismus kyslíku, který generuje tyto reaktivní intermediáty [5]. K vlastní oxidaci, tj. spotřebě kyslíku, dochází ve specializovaných organelách buňky tzv. peroxisomech, což jsou drobné vezikuly s jednou membránou, které jsou charakteristické přítomností oxidáz, jejichž aktivita vede k tvorbě peroxidu vodíku (H_2O_2) a kataláz, které peroxid vodíku rozkládají. Nejobvyklejší cesta metabolismu molekulárního kyslíku zahrnuje jeho kompletní redukci na H_2O přijetím čtyř elektronů. Avšak jedoelektronovou redukcí může vzniknout několik typů volných radikálů a H_2O_2 , jak je ukázáno v následující tabulce (Tab. 2) [6]:

$\text{O}_2 + \text{e}^- \rightarrow \text{O}_2^{\bullet -}$	<i>superoxidový radikál</i>
$\text{O}_2^{\bullet -} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HO}_2^{\bullet} + \text{OH}^-$	<i>hydroperoxylový radikál</i>
$\text{HO}_2^{\bullet} + \text{e}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	<i>peroxid vodíku</i>
$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{e}^- \rightarrow \text{OH}^{\bullet} + \text{OH}^-$	<i>hydroxylový radikál</i>

Tab. 2 Formování reaktivních forem kyslíku [6].

První sloučeninou vznikající částečnou redukcí kyslíku, tj. přijetím jednoho elektronu, je zmiňovaný superoxid. Jako volný radikál není zvláště poškozující, ale hraje důležitou roli jako reduktant přechodných kovových iontů v přírodě a jeho hlavní význam spočívá v tom, že je zdrojem peroxidu vodíku. Svou reakcí s NO, kterou se prokázala přítomnost relaxačního faktoru endothelia, dokazuje svůj fyziologický význam. Při nízkém pH je superoxid protonován na hydroperoxylový radikál, který je reaktivnější a oxidovatelnější. Při fyziologickém pH nižší než 7,1 se vyskytuje v protonované formě [3]. Superoxid má oxidační i redukční vlastnosti. Podléhá dismutaci, při které jedna jeho molekula poskytuje elektron druhé, takže superoxid se vlastně zároveň oxiduje i redukuje a produkty reakce jsou kyslík a peroxid vodíku:

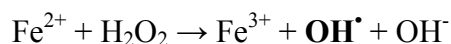


Přestože ve vodném prostředí reakce probíhá velkou rychlostí, v biologických systémech je ještě urychlována enzymem superoxidodismutázou.

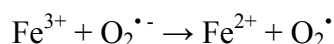
Další redukcí superoxidu vzniká peroxid vodíku. Svou molekulární strukturou se podobá vodě a je velice difuzibilní uvnitř i mezi buňkami. H_2O_2 může regulovat expresi určitých genů (přímo či nepřímo) a to tak, že způsobí přemístění inhibiční podjednotky z transkripčního faktoru NF- κ B [7]. H_2O_2 v mikromolárních dávkách vykazuje velmi nízkou reaktivitu, ale ve vyšších hladinách ($>50 \mu\text{M}$) může atakovat buněčné cíle [8]. H_2O_2 se vyskytuje v chloroplastech, mitochondriích, cytosolu, glyoxysomech a extracelulárně [9].

Superoxid, ani peroxid vodíku nejsou považovány za nejreaktivnější ROS, ale jejich společný výskyt může vést ke vzniku vysoce reaktivního hydroxylového radikálu, který nespecificky atakuje biomolekuly v difuzí-limitovaných reakcích, a je tudíž schopný poškozovat polysacharidy, proteiny a nukleové kyseliny. Hydroxylový radikál reaguje téměř se všemi molekulami v živých buňkách [10]. Hydroxylový radikál vzniká také při expozici

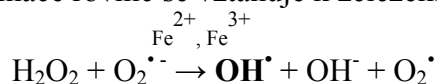
živých organismů ionizujícímu záření, kdy dochází ke štěpení O-H můstků ve vodě, což dává vzniknout $\text{H}^\bullet$ a $\text{OH}^\bullet$. Existují důkazy, že většina škodlivých účinků nadměrného vystavení živého organismu ionizujícímu záření je iniciována poškozením proteinů, DNA, uhlovodíků a lipidů vlivem působení hydroxylového radikálu [2]. Hydroxylový radikál je příčinou mnoha buněčných poruch. Jeho tvorba je velmi zrychlována v přítomnosti železnatých či měďnatých iontů. Je potvrzeno [2, 11], že hydroxylový radikál je v biologickém systému generován z peroxidu vodíku tzv. *Fentonovou reakcí*:



Fe^{2+} může být regenerován reakcí se superoxidovým anionem ($\text{O}_2^{\bullet -}$).



Kombinace rovnic se vztahuje k železem katalyzované *Haber-Weissově reakci*:



Hydroxylové radikály mohou rovněž vznikat tehdy, když redukováná forma přechodných iontů kovů jako je měď, přijde do kontaktu s H_2O_2 , např.:



Produkce hydroxylového radikálu závisí na volných iontech železa a mědi a je tedy ovlivňována procesem vzniku chelátů. Efektivními chelatačními činidly železa jsou EDTA, DTPA a některé biologicky významné sloučeniny jako je ATP, ADP, sukcinát, citrát apod.

Nejdůležitější reakce volných radikálů v aerobních buňkách zahrnují tedy molekulární kyslík a jeho radikálové deriváty. Velikost reaktivity volných radikálů může být odhadnuta z extrémně krátkého poločasu rozpadu jednotlivých radikálů (*Tab. 3*). Tato reaktivita stoupá s nestabilní elektronovou konfigurací.

Druh	Symbol	Poločas rozpadu při 37 °C [s]
Superoxid	$\text{O}_2^{\bullet -}$	1×10^{-6}
Hydroxylový radikál	$\text{OH}^\bullet$	1×10^{-9}
Alkoxylový radikál	$\text{RO}^\bullet$	1×10^{-6}
Peroxylový radikál	$\text{ROO}^\bullet$	1×10^{-2}
Singletový radikál	$\text{O}_2^\bullet$	1×10^{-6}
Molekulární kyslík	O_2	$> 10^2$

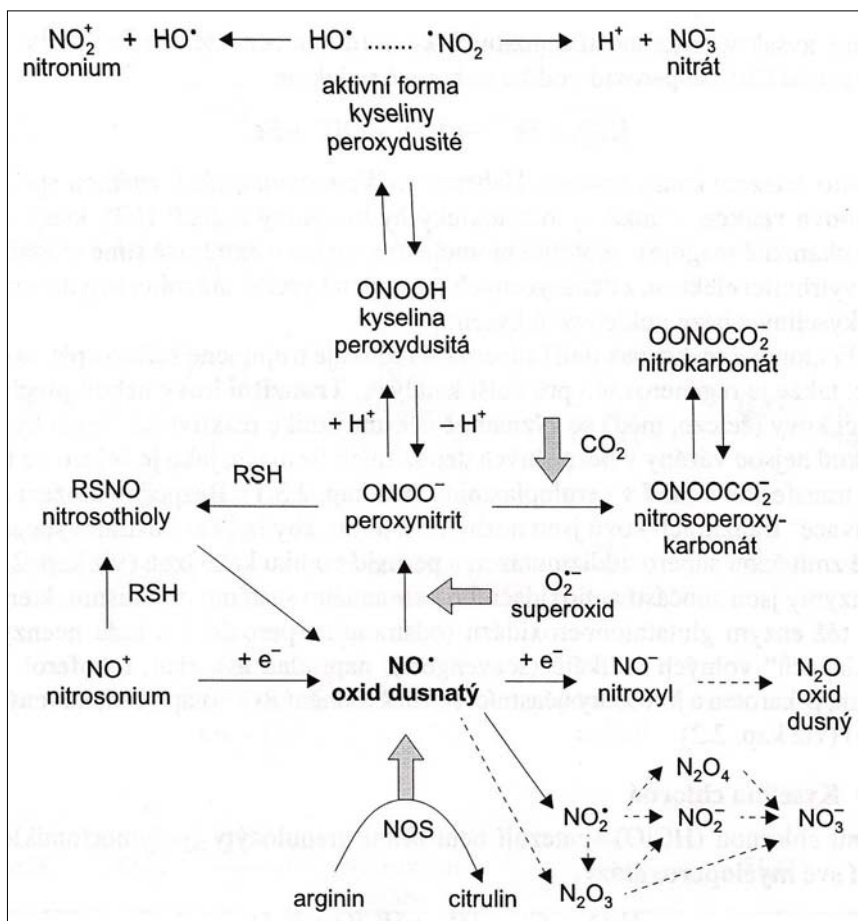
Tab. 3 Poločasy života volných radikálů v biologických systémech [12].

3.1.3 Dusík a jeho reaktivní metabolity

3.1.3.1 Oxid dusnatý

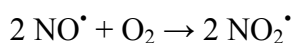
Oxid dusnatý je bezbarvý plyn. Není dobře rozpustný ve vodě (rozpustný v koncentraci vyšší než 2 mM při 20 °C), více je rozpustný v organických rozpouštědlech. Oxid dusnatý má jeden nepárový elektron v antivazebném orbitalu π^*2p . Tudíž se jedná o paramagnetickou molekulu a současně o volný radikál $\text{NO}^\bullet$ [5]. Přesto $\text{NO}^\bullet$ při svých koncentracích *in vivo* reaguje velmi pomalu s většinou biomolekul včetně kyslíku, neboť difúze oxidu dusnatého do krve a jeho inaktivace hemoglobinem je mnohem rychlejší než uvažované reakce. *In vivo* reaguje dostatečně rychle jen s přechodnými kovy a radikály. Metabolity $\text{NO}^\bullet$ však jsou velmi reaktivní.

Přestože je oxid dusnatý $\text{NO}^\bullet$ velmi jednoduchá molekula, syntetizuje se v těle poměrně složitým enzymovým mechanismem. Teprve v 80. letech byla objevena a nyní je studována jeho funkce v buněčné signalizaci. Oxid dusnatý a jeho metabolity jsou za určitých podmínek prudce jedovatými látkami (Obr. 1).



Obr.1 Metabolismus oxidu dusnatého. Převzato z [13].

Molekula NO[•] si získala pověst vysoce reaktivní a toxické molekuly na základě dvou pozorování *in vitro*: 1) Ve vysoké koncentraci oxid dusnatý rychle reaguje s kyslíkem na oxid dusičitý (NO₂[•]) a posléze na dusitan:

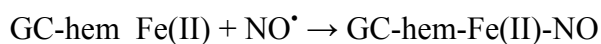


2) Další zkušenost říká, že NO[•] má krátký poločas rozpadu v pokusech s perfuzí orgánů. Je pravda, že v nasyceném vodném roztoku, tedy v koncentraci 2 mM má poločas rozpadu kratší než 1 s. Avšak fyziologické koncentrace NO[•] dosažené konstitutivními syntázami se pohybují v nM a poločas oxidu dusnatého v reakci s kyslíkem se prodlužuje s ředěním NO[•] tak, že by se *in vivo* pohyboval kolem 70 s. Nízká koncentrace oxidu dusnatého *in vivo* postačuje k jeho regulačním funkcím a přitom neškodí.

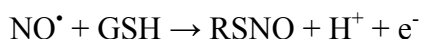
Je nutno uvést, že přes poměrně malou příležitost k reakci *in vivo* má NO[•] i v nízké fyziologické koncentraci biologický poločas rozpadu pouze několik sekund. Příčinou však není interakce s biomolekulami, nýbrž skutečnost, že je pohotově a průběžně vychytáván v erythrocytech. Pohotově totiž reaguje s železem oxyhemoglobinu. Vzniká methemoglobin a dusičnan a jde o jeden z nejúčinnějších způsobů inaktivace NO[•] a o jednu z podmínek jeho regulační funkce *in vivo*:



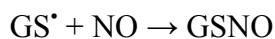
Oxid dusnatý se stejně ochotně váže na hemové železo enzymu guanylátcyklázy (GC), což je podstata stimulace syntézy cGMP, vedoucí k relaxaci hladkého svalstva cév (vazodilatace) a k mechanismu dalších regulací.



In vivo v přítomnosti akceptorů elektronů (NO₂[•], přechodných kovů) se oxid dusnatý snadno slučuje s fenoly (tyrozinem), thioly (cysteinem, GSH, albuminem) a se sekundárními aminy:



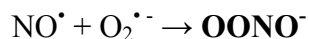
Glutathion (GSH) se snadno metabolizuje na radikál GS[•] a ten s NO[•] dává nitrosothiol:



Reakcí s thiolovými skupinami (-SH) cysteinu, glutathionu, albuminu a dalších látek tak oxid dusnatý tvoří o něco stálější nitrosothioly. Tyto látky s biologickým poločasem rozpadu kolem 40 min jsou zřejmě transportní formou NO[•]. Mohou totiž předávat nitrosyl NO⁺ jiným molekulám a tak sloužit jako přenašeče biologicky aktivního oxidu dusnatého.

3.1.3.2 Peroxynitrit

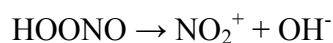
Patologicky je nejvýznamnější reakce $\text{NO}^\bullet$ se superoxidem, kdy vzniká toxický peroxynitrit:



Fyziologické podmínky (pH 7) nejsou pro vznik peroxynitritu výhodné vzhledem k nízké koncentraci $\text{NO}^\bullet$ a zejména superoxidu, avšak při intenzivní syntéze $\text{NO}^\bullet$ a $\text{O}_2^{\bullet -}$ (např. aktivovanými polymorfonukleáry) může koncentrace peroxynitritu dosáhnout významné mikromolární koncentrace. $\text{NO}^\bullet$ je jediná biologická molekula produkovaná v koncentraci postačující ke kompetici o superoxid se superoxiddismutázou. Peroxynitrit je oxidačním činidlem. Obecně se soudí, že za fyziologického pH se protonovaný peroxynitrit rozkládá na hydroxylový radikál a oxid dusičitý (také volný radikál):



Peroxynitrit (spíše než $\text{NO}^\bullet$) je *in vivo* odpovědný za nitraci a hydroxylaci aminokyseliny tyrozinu. Přechodné kovy včetně kovů aktivních center superoxiddismutázy a myeloperoxidázy katalyzují jeho heterolytické štěpení na hydroxidový anion a nitroniový kation, kterému je připisována schopnost napadnout fenolové sloučeniny a *in vivo* v proteinech měnit například tyrozin na 3-nitrotyrozin:



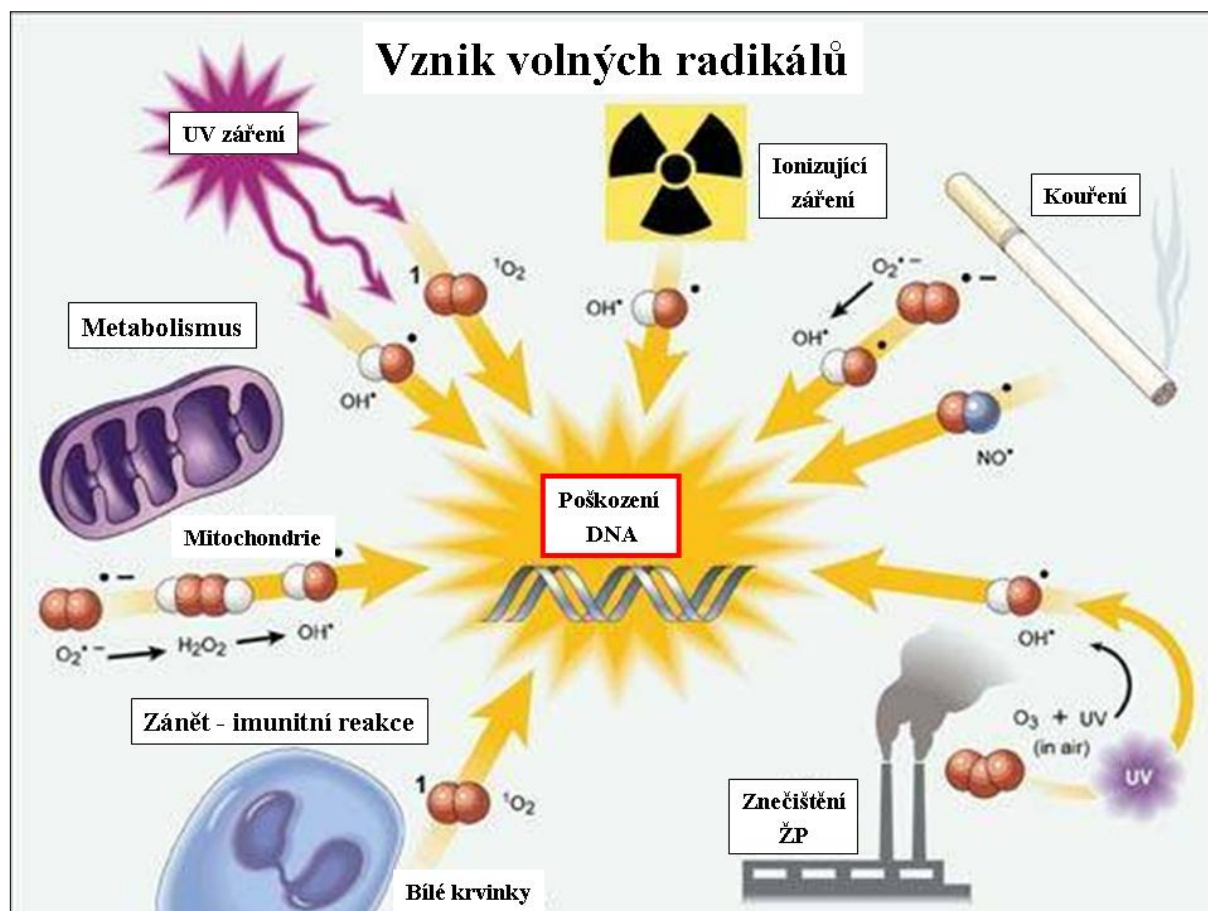
Lze však namítnout, že NO_2^+ se rychle slučuje s vodou na kyselinu dusičnou a za fyziologického pH má příliš krátký poločas, než aby mohl efektivně nitrovat biomolekuly. Existuje úvaha [14], že katalyzátorem nitrace je oxid uhličitý, který rychle reaguje s peroxynitritem za vzniku oxidujících a nitrujících meziproductů včetně $\text{NO}_2^\bullet$ a $\text{CO}_3^{\bullet -}$. Kromě toho se tyto radikály ve vodném prostředí snadno přeměňují na dusitany (NO_2^-), dusičnany (NO_3^-), CO_2 a H_2O_2 .

3.1.4 Volné radikály z životního prostředí

Na vzniku volných reaktivních radikálů se podílí i znečištěné životní prostředí (Obr. 2). Zdrojem volných radikálů je ionizující záření, UV-záření, kouření a ozón.

Velmi důležitým zdrojem, který dává vzniknout nebezpečným kyslíkovým radikálům, je ozón. Ozón vstupuje do listů rostlin průduchy a již v intercelulárách, v kontaktu s vlhkými buněčnými stěnami se velmi rychle rozkládá. Průnik nerozloženého ozónu přes plazmatickou membránu probíhá velice obtížně a pomalu. Při rozkladu ozónu vzniká nejen molekulový kyslík, ale jako meziproducty i reaktivní superoxid, peroxid vodíku a hydroxylový radikál. Tyto sloučeniny v první řadě způsobují nekatalyzovanou oxidaci složek buněčné stěny (zejména proteinů a fenolických látek) a složek plazmatické membrány (lipidů a proteinů). Dochází k narušení buněčné stěny a při dlouhodobém působení ozónu může dojít k poškození

a smrti buněk. Odumírání buněk pod vlivem vyšších dávek ozónu nemusí být způsobováno pouze „programovanou“ hypersenzitivní reakcí, ale i neregulovaným způsobem po vážném narušení integrity plazmatické membrány peroxidací lipidů. Jedná se o tzv. lipidovou peroxidaci, která dává vznik mutagenním reaktivním aldehydům (více Kap. 3.2.1.1) [15, 16].



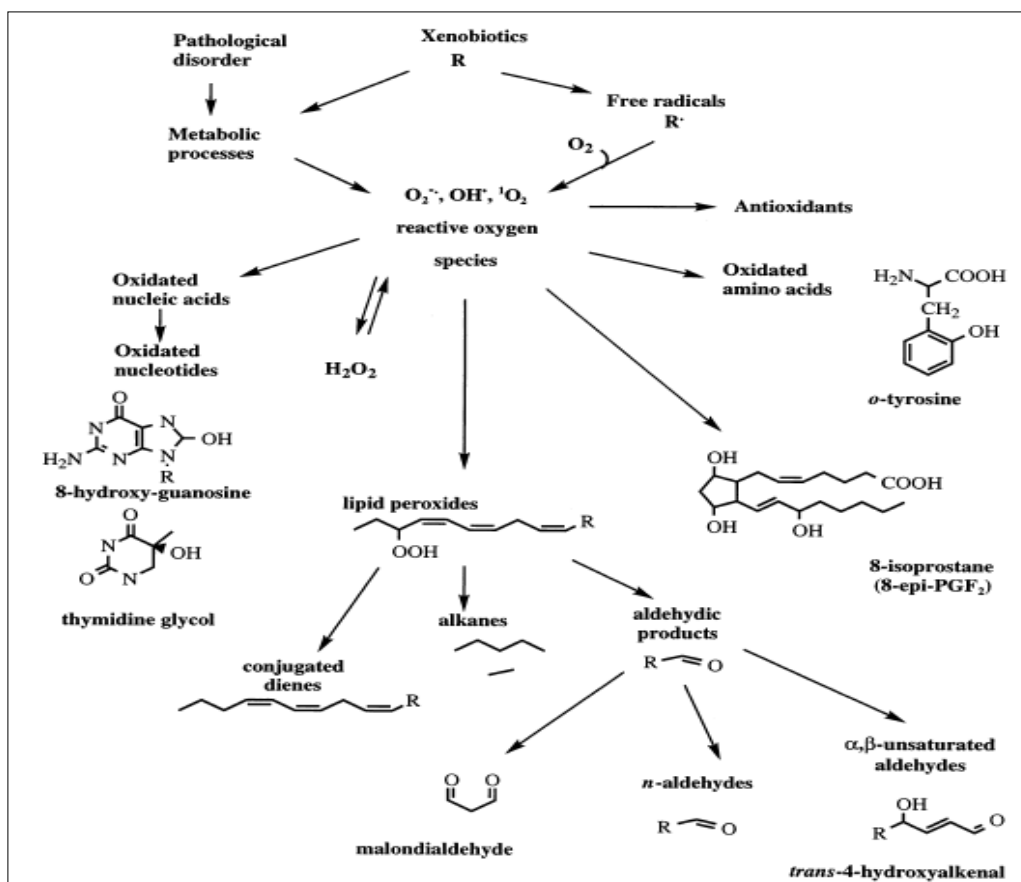
Obr. 2 Vznik volných radikálů. Převzato z [17].

3.2 OXIDAČNÍ STRES

3.2.1 Úvod k oxidačnímu stresu

Oxidační stres nastává ve zdravém aerobním organismu, když dochází k narušení rovnováhy mezi tvořícími se reaktivními kyslíkovými radikály (ROS)/reaktivními dusíkovými radikály (RNS) a obranným antioxidačním systémem. Reaktivní částice jsou v převaze a nedostatečnost antioxidačních procesů způsobí, že organismus není schopen je zneškodnit a eliminovat. Tento stav může být způsoben tím, že je v organismu porušena tvorba a distribuce antioxidantů, případně dochází k nadbytečnému příjmu ROS z vnějšího prostředí nebo je organismus vystaven nějakému typu stresu (zátěžovému faktoru). Při špatné regulaci této nerovnováhy může nadbytek ROS/RNS způsobit poškození buněčných struktur a to lipidů, proteinů, DNA a také může negativně ovlivnit správnou funkci kyseliny močové. Z těchto zásadních typů poškození vyplývá, že oxidační stres způsobuje vznik a rozvoj lidských onemocnění a stejně tak přispívá k procesům stárnutí buněk [2, 18].

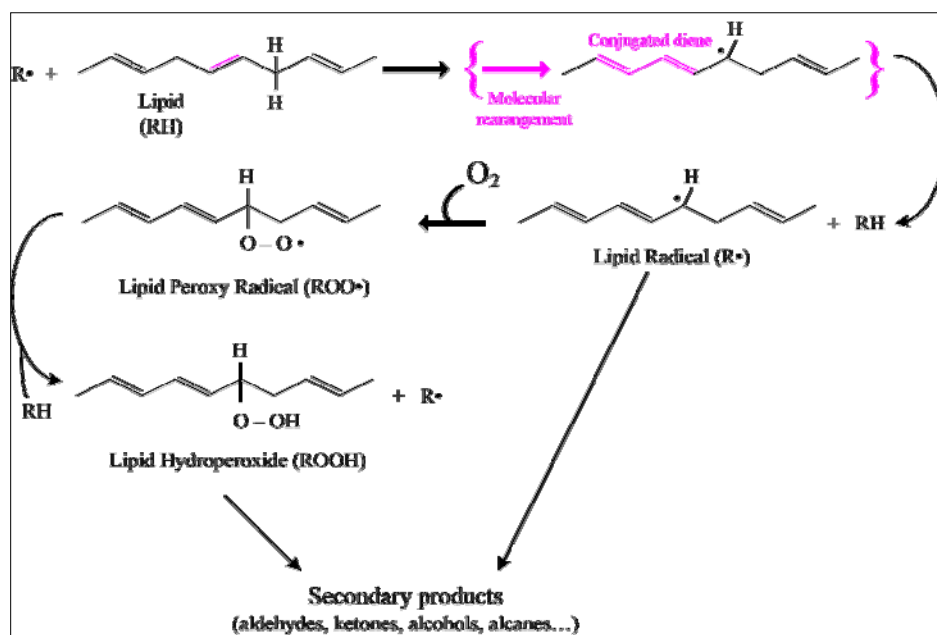
Je prokazatelné, že cílem oxidačního poškození, resp. ataku ROS/RNS, jsou zvířata a lidé *in vivo*. Reaktivní volné radikály reagující s buňkou mohou oxidovat biomolekuly, což může vést k buněčné smrti nebo ireversibilnímu poškození tkáně. Cílem poškození jsou již zmíněné buněčné membrány (lipidy), proteiny, DNA a funkce kyseliny močové (Obr. 3).



Obr. 3 Schéma ataku volných radikálů; tvorba primárních a sekundárních metabolitů. Převzato z [5].

3.2.1.1 Oxiдаční poškození lipidů

Negativní působení aktivních forem kyslíku spočívá především v podílu na oxidačních a peroxidačních reakcích. Při oxidačním poškození lipidů dochází k jejich peroxidaci – lipidové peroxidaci (resp. oxidaci fosfolipidů). Peroxidace lipidů je vedle poškození DNA jedním z nejintenzivněji zkoumaných procesů indukovaných volnými radikály. Tento proces je znázorněn na (Obr. 4).



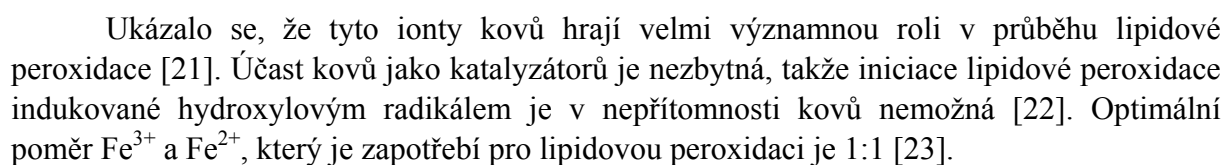
Obr. 4 Schéma lipidové peroxidace. Převzato a upraveno z [5].

Lipidová peroxidace je chemický proces, při kterém jsou polynenasycené mastné kyseliny (Polyunsaturated Fatty Acids - PUFAs) lipidů poškozovány působením volných radikálů a kyslíku za vzniku hydroperoxidů. Z hydroperoxidů pak dalšími reakcemi vznikají následné sekundární produkty. Nejvíce náchylné jsou membránové lipidy s vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin. Reaktivní formy kyslíku napadají především dlouhé mastné kyseliny obsažené ve fosfolipidech, které jsou součástí membrán. Hlavními mastnými kyselinami, které podléhají lipidové peroxidaci v buněčných membránách jsou kyselina linoleová, arachidonová a dokosahexanová. Během ataku reaktivními formami kyslíku, dochází ke zkracování struktury kyselin [19].

Je třeba připomenout, že pod pojmem peroxidace lipidů se většinou uvažuje o neenzymovém a nekontrolovaném procesu přeměny lipidů. V řadě buněk však probíhá i enzymová peroxidace lipidů, která vede k tvorbě biologicky aktivních produktů, důležitých pro regulaci buněčných pochodů (např. prostaglandiny a leukotrieny).

V průběhu neenzymové peroxidace lipidů jsou rozlišovány 3 fáze: iniciace, propagace a terminace. Pochod *iniciace* zahrnuje reakci, při níž je molekula mastné kyseliny atakována volným reaktivním radikálem (hydroxylovým, alkoxylovým nebo peroxylovým radikálem). Největší význam se připisuje působení hydroxylového radikálu, iniciaci však v závislosti na podmínkách mohou vyvolat i radikály jiné. Nejcitlivějším místem pro atak radikálu v molekule mastné kyseliny je $=CH-$ skupina s dvojnou vazbou. To vysvětluje, proč především

Hydroperoxidy jsou pouze primárními produkty peroxidace. V následných reakcích, z nichž některé jsou opět radikálové, se mění na řadu dalších, sekundárních produktů. Tvorba některých sekundárních produktů a fáze iniciace může být urychlena a usnadněna volnými ionty kovů, zejména železa a mědi [20]. Následný krok propagace také vyžaduje zapojení kovů na podporu rozkladu lipidových hydroperoxidů, které přecházejí v další volné radikály, jako jsou alkoxylový nebo peroxylový radikál [6]:


$$\text{LH} \xrightarrow{\text{R}^\bullet} \text{L}^\bullet \xrightarrow{\text{O}_2} \text{LOO}^\bullet \xrightarrow{\text{L'H}} \text{LOOH} \xrightarrow{\text{Fe}^{2+}} \text{LO}^\bullet + \text{OH}^\bullet$$

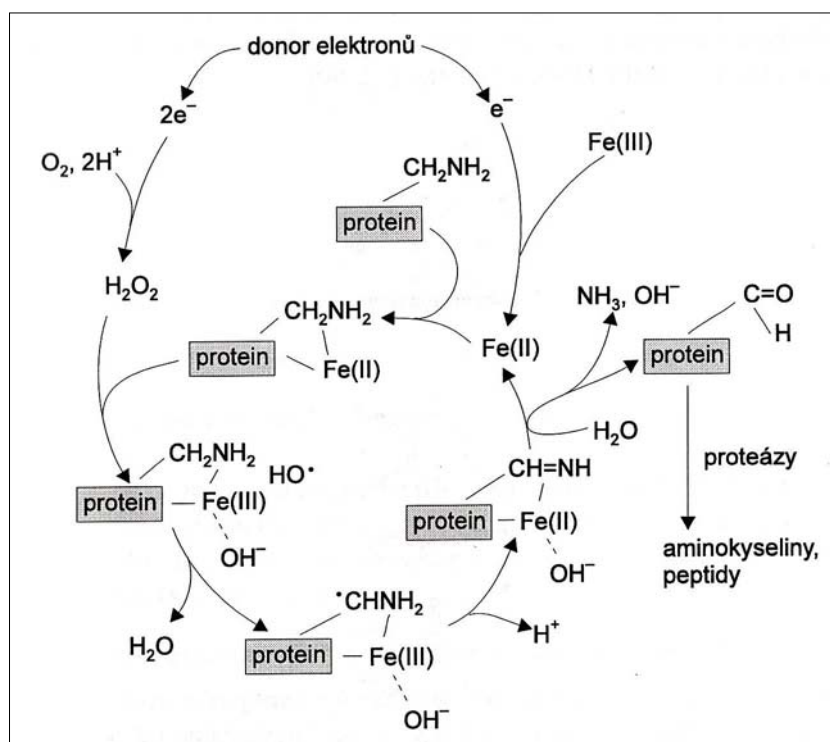
$$\text{L}^\bullet \xrightarrow{\text{O}_2} \text{L'OO}^\bullet \text{ etc.}$$

Lipoperoxidy jsou nestabilní a rozkládají se za vzniku širokého komplexu různých sloučenin včetně reaktivních karbonylových sloučenin, jako jsou především některé aldehydy (malondialdehyd (MDA), 4-hydroxynonenal (4-HNE)) [24, 25, 26], které jsou toxické a navazují se na volné aminoskupiny proteinů. V důsledku toho proteiny agregují, sítují se a stávají se méně citlivé k proteolytické degradaci.

Lipidová peroxidace mění fluiditu membrán (narušení semipermeability membrán), zvyšuje se propustnost pro ionty, mění se membránový potenciál a dochází až k lyzi buněk [27]. V tkáních dochází k akumulaci tzv. stárnoucích pigmentových skvrn. Objevují se aterosklerotické léze a v tělních tekutinách (zahrnující např. plazmu, moč) jsou přítomny zvýšené hladiny konečných produktů peroxidace (např. MDA, 4-HNE, izoprostany) [2].

3.2.1.2 Oxidační poškození proteinů

Významným cílem reaktivních radikálů ROS/RNS jsou proteiny. Oxidace proteinů je senzitivním markerem oxidačního stresu u rostlin [28]. Studium oxidačního poškození aminokyselin poskytuje užitečné informace o změnách v makrostruktuře proteinů, které jsou způsobeny oxidačním stresem. Oxidace aminokyselin v proteinech vede k nevratným fyziologickým změnám v proteinech samotných. Tyto fyziologické změny jsou kategorizovány do tří skupin: fragmentace, agregace (denaturace) a citlivost k proteolytickému štěpení (vlivem konformačních změn) [29]. Citlivost proteinů vůči oxidaci je ovlivňována také přítomností iontů kovů schopných katalyzovat reakci Fentonova typu. Jedná se o navázané železo na protein, čímž dochází k oxidačnímu poškození proteinu (*Obr. 6*). Schéma (*Obr. 6*) vysvětluje význam Fentonovy reakce při vzniku karbonylové skupiny $>C=O$ z aminokyseliny $-NH_2$ [11]. Lysylový zbytek v proteinu ($R-CH_2-NH_2$) slouží jako jeden z mnoha ligandů schopných vázat $Fe(II)$, takže s peroxidem dává Fentonovu reakci a hydroxylový radikál $HO^\bullet$ ihned v místě svého vzniku vytvoří z $R-CH_2-NH_2$ alkylový radikál $R^\bullet-CH-NH_2$. Přesun elektronu na $Fe(III)$ zregeneruje $Fe(II)$ a z radikálu vznikne skupina $R-CH=NH$, která se spontánně hydrolyzuje na $R-CHO$ a NH_3 . Modifikovaný protein je substrátem pro řady nespecifických proteáz, které ho odstraní.



Obr. 6 Oxidační poškození proteinu v místě navázaného železa. Převzato z [4].

Po oxidační modifikaci N-konce bílkovinného řetězce s reaktivním kyslíkem způsobující štěpy na peptidech a z reakcí peptidů s oxidačními produkty uhlovodíků mohou vzniknout oxidační produkty proteinů a karbonylové deriváty proteinů. Je zřejmé, že přítomnost karbonylových skupin v proteinech může indikovat to, že proteiny jsou vystavovány poškození volnými kyslíkovými radikály. Řada aminokyselin je hydroxylována hydroxylovým radikálem a nitrována peroxynitritem (tryptofan, fenylalanin, tyrozin). V kontrastu s labilitou většiny karbonylových sloučenin, jsou některé produkty fenylalaninu a tyrozinu stabilní. S většinou biomolekul peroxynitrit reaguje pomalu, je selektivním oxidantem. V proteinech se mění tyrozin na nitrotyrozin, který je velmi stálý a lze jej detekovat v aterosklerotických lézích, v lidské plazmě a moči. Jeho vyšší koncentrace jsou stanoveny v tělních tekutinách a tkáních u pacientů s chronickým zánětlivým onemocněním. Oxidace fenylalaninu vede ke vzniku ortho-tyrosinu [2, 4, 30]. S membránovými proteiny a s lipoproteiny reagují kromě reaktivních ROS/RNS také alkoxylové a peroxylové radikály lipidů ($LO^{\bullet}$, $LOO^{\bullet}$), které vznikají při lipidové peroxidaci. Následkem toho se proteiny agregují a síťují. Stupeň karbonylace proteinů lze stanovit a použít jako ukazatel oxidačního poškození těchto biomolekul [31].

Následky těchto reakcí jsou pro funkci buněk velmi závažné. Enzymy mění svou aktivitu, pumpy neudrží iontovou homeostázu buňky. V cytosolu se hromadí vápenaté ionty, čímž se aktivují proteázy a fosfolipázy. Modifikace aminokyselin vedou ke vzniku nových antigenních determinantů a autoimunitním reakcím.

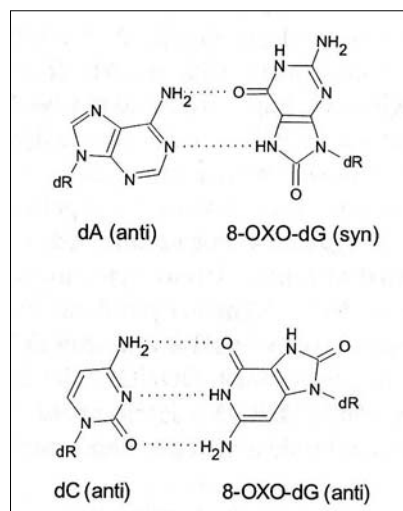
3.2.1.3 Oxidační poškození DNA

Reaktivní druhy kyslíku mohou atakovat téměř každou buněčnou strukturu či molekulu. Avšak vzhledem ke klíčovému postavení v biologii je DNA považována za jeden z hlavních cílů [32]. Reaktivní druhy kyslíku mohou způsobit změny ve struktuře DNA, narušení proteinové kostry, poškození deoxyribóza–fosfátové kostry, stejně jako vznik specifických chemických modifikací purinových a pyrimidinových bází. Oxidační modifikace bází se mohou projevit jako mutace, oxidace deoxyribózové části může indukovat uvolnění báze nebo řetězcové zlomy DNA nebo se mohou vytvořit křížové vazby DNA s proteiny [4, 33, 34].

Stejně jako lipidy a proteiny také nukleové kyseliny jsou poškozovány především hydroxylovým radikálem $HO^{\bullet}$. Z pěti hlavních komponent DNA jsou na poškození hydroxylovým radikálem nejvíce citlivé následující nukleotidy: thymin, cytosin, následuje adenin, guanin a deoxyribóza [35]. Primární reakcí hydroxylového radikálu s DNA je odstranění vodíkového atomu z deoxyribózy, což vede k destrukci sacharidu a přerušení řetězce. $HO^{\bullet}$ je schopen adovat se k purinovým a pyrimidinovým bázím a tak je změnit na hydroxyderiváty a oxoderiváty. Ze všech čtyř bází generuje mnohonásobné produkty: 5-hydroxymetyluracil, 8-hydroxyadenin, thymidinyglykol, zatímco singletový kyslík přednostně modifikuje guanin 8-hydroxylací na 8-hydroxyguanin [36]. Následky vzniku 8-hydroxyguaninu jsou nejvíce prostudovány, v menší míře jsou k dispozici informace o efektu 8-hydroxyadeninu. Z derivátů pyrimidinových je častý 5-hydroxycytozin a analogický derivát uracilu, dále 5,6-dihydroxythymin a další deriváty. Tyto modifikované báze jsou vylučovány močí ve formě nukleosidů, jako je 8-hydroxydeoxyguanozin, 8-hydroxydeoxyadenozin, 5-

hydroxydeoxycytidin a analogický derivát uridinu, dále 5,6-dihydroxydeoxythymidin a další deriváty. *In vivo* poškozená DNA je opravena endonukleázami a glykosylásami uvolněnými deoxynukleotidy a bázemi. Oxidované nukleotidy jako je např. 8-OH-dG a dTG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosin a thymidin glykol) mohou být využity jako biomarkery pro oxidační poškození DNA.

Následkem takových změn je chybné párování bází při replikaci DNA a zavedení chyby do genetické informace (např. záměna páru GC za AT s následnou transverzí GC na TA (*Obr. 7*). Poškození DNA se projeví apoptózou, mutagenezí, karcinogenezí a stárnutím buněk [4].



Obr. 7 Dvojitý způsob párování 8-oxoguaninu - vznik mutace. Převzato z [4].

Rovněž mitochondriální DNA je často poškožována působením volných radikálů. Mitochondrie jsou majoritním zdrojem kyslíkových radikálů, takže jejich DNA je vystavena vysokým hladinám radikálů. Probíhají zde jen v malé míře reparační procesy a mitochondriální DNA je též často preferována jako cíl pro mnohá xenobiotika [37, 38].

3.2.1.4 Oxidační poškození kyseliny močové

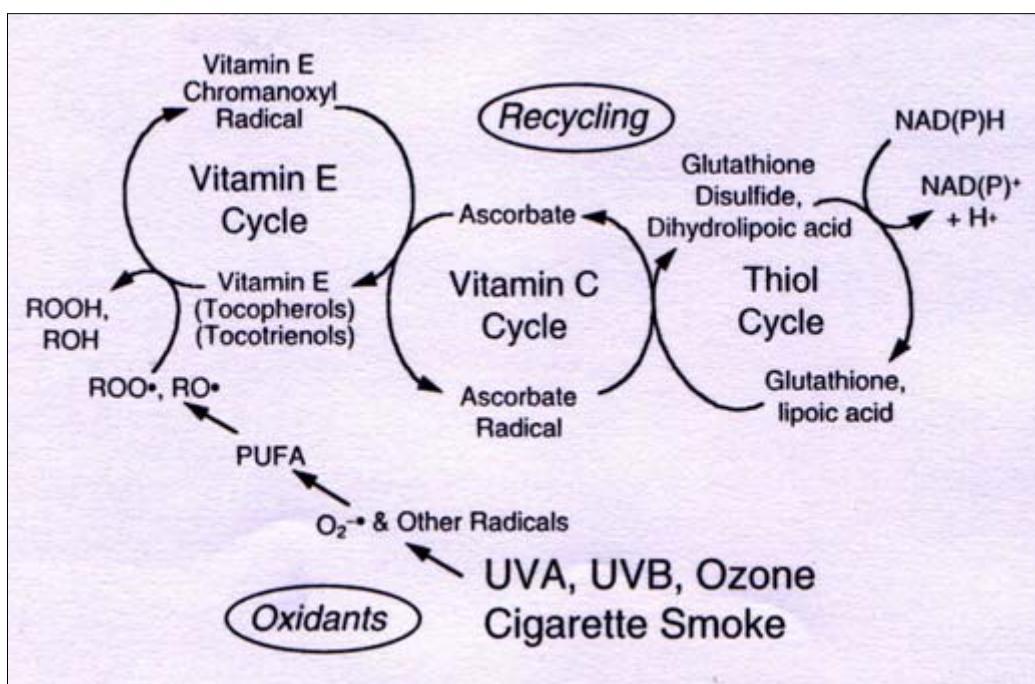
Atak ROS vede ke vzniku alantoinu, kyseliny kyanurové, kyseliny oxonové a dalších produktů. Jsou přítomny v tělních tekutinách, kde jsou jejich hladiny významně zvýšeny v případě chronických zánětů a u poškození kovovými ionty [2].

3.2.2 Obranný antioxidační systém

Pro prevenci vzniku volných radikálových formací a pro omezení efektů poškození volnými radikály mají buňky vyvinutý komplexní mechanismus antioxidační obrany (*Obr. 8*). Zapojené mechanismy zahrnují enzymy a další nízkomolekulární složky s antioxidačním účinkem, které působí v propojené víceúrovňové síti. Vyvinuly se z naléhavé potřeby organismů s nejvyššími koncentracemi intracelulárního kyslíku ze všech aerobních organismů během selektivního tlaku a evoluce.

Antioxidant je látka, která oddaluje nebo inhibuje oxidační poškození cílové molekuly. Antioxidant musí mít schopnost reagovat s biologicky odpovídajícími oxidanty a radikály, produkt odvozený z její reakce s radikálem musí být fyziologicky méně nebezpečný než odstraněný radikál a musí být přítomna v dostatečně vysoké koncentraci alespoň v určitých tkáních, aby mohla zajistit kvantitativně odpovídající úroveň reakce [39].

Antioxidanty lze rozdělit na primární, sekundární a terciární.



Obr. 8 Oxidační stres aktivuje antioxidační systém. Převzato z [1].

3.2.2.1 Primární antioxidanty

Primární antioxidanty jsou vysokomolekulární endogenní antioxidanty, které fungují jako prevence, tj. zabráňují tvorbě volných radikálů. Vyvazují ionty přechodných kovů (železo a měď) a mění jejich oxidoredukční vlastnosti tak, že tyto prvky přestanou katalyzovat radikálové reakce. V tomto smyslu se mezi antioxidanty řadí *trasferrin* (Fe) v plazmě a *laktoferrin* (Fe) polymorfonukleárních leukocytů. Tyto proteiny pevně vážou železo ve formě Fe(III) a tím ho zbavují možnosti vstupovat do Fentonovy reakce.

Dalším proteinem separujícím železo v buňce je *feritin*, který působí antioxidačně hlavně svou feroxidázovou aktivitou, která skladované železo udržuje v oxidovaném stavu, dokud ho odtud neuvolní silně redukující látka (askorbát).

Prooxidačně nebezpečnou formou železa je hemoglobin uvolněný z erytrocytů a hem uvolněný z hemoproteinů včetně hemoglobinu a myoglobinu. Proto můžeme za antioxidant považovat také *haptoglobin*, vychytávající extracelulární hemoglobin, a *hemopexin*, vázající uvolněný hem.

Významným antioxidačním proteinem plasmy je *ceruloplasmin*. Tento protein váže měď, která je podstatná pro feroxidázovou aktivitu ceruloplasminu oxidujícího Fe(II) na Fe(III.). Umožňuje tak uvolnění železa z buněk a jeho předání transferrinu. Současně se kyslík oxiduje čtyřmi elektrony na vodu, aniž by vznikaly toxické meziprodukty.

Reaktivitu volných radikálů významně ovlivňují také thiolové skupiny některých proteinů. *Albumin* váže ion Cu(I), který se peroxidem vodíku oxiduje na Cu(II) a v této formě poškozuje okolní struktury albuminu.

Metalothioneiny jsou proteiny obsahující mnoho cysteinů a žádné aromatické aminokyseliny. Hrají významnou roli v buněčném jádře. Prostřednictvím síry chelatují ionty kovů. Při oxidačním stresu se zvýší jejich syntéza.

Reparační funkci mají i *chaperony*. Základní funkcí těchto proteinů je navázat na sebe ještě nesvinuté proteiny a pomáhat při jejich posttranslačním prostorovém uspořádání a začlenění do buněčných organel. Oxidační stres indukuje syntézu chaperonů, které zřejmě rozpoznají oxidací poškozené proteiny, vážou je na sebe a urychlí jejich odstranění v proteozomech.

3.2.2.2 Sekundární antioxidanty

Sekundární antioxidanty obstarávají kompartmentalizaci volných radikálů, tj. jejich odstranění. Sekundárními antioxidanty jsou antioxidační enzymy, které využívají kyslík a transportní řetězce elektronů. Sekundární antioxidanty mohou být rozděleny podle mechanismu účinku na vychytávače (scavengery), kteří zachycené ROS přemění na neradikálové molekuly, dále na lapače (trappers), kteří přeměňují ROS na relativně stabilní radikály a nakonec na zhášecí (quenchers), kteří zháší vytvořené ROS tím, že jim nabídnou volný elektron k jejich stabilizaci. Podle biologické funkce se dělí na enzymové antioxidační systémy (superoxiddismutáza, glutathionperoxidáza, glutathiontransferáza, kataláza) a na nízkomolekulární antioxidanty (kyselina askorbová, tokoferoly, karotenoidy, flavonoidy, glutathion, kyselina lipová, koenzym Q, bilirubin, kyselina močová).

3.2.2.2.1 Enzymové antioxidační systémy

3.2.2.2.1.1 Superoxiddismutáza

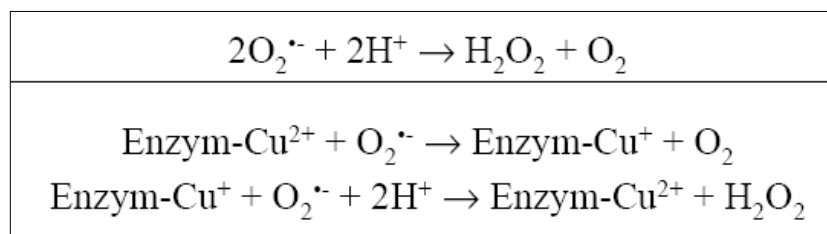
Jedním z hlavních enzymů je *superoxiddismutáza* – *SOD*, katalyzující přeměnu superoxidu na peroxid vodíku, který může být dále rozkládán *katalázou*. Ačkoliv obrana proti oxidačnímu stresu v rostlinách zahrnuje komplexní metabolická uspořádání, primární kontrola probíhá právě prostřednictvím *SOD*. Superoxiddismutázy jsou klasifikovány dle

jejich kofaktoru pro kov a dle jejich subcelulární lokalizace (Tab. 4). Rozhodujícími formami SOD jsou mitochondriální superoxiddismutáza Mn-SOD, cytosolická Cu,Zn-SOD a chloroplastová Fe-SOD [40].

SOD	Výskyt u organismů	Subbuněčná lokalizace u člověka
Cu, Zn-SOD	téměř všichni aerobní eukaryoti, některé bakterie	cytosol, jádro, snad peroxizómy
Mn-SOD	mnohé bakterie, většina aerobních eukaryotů	mitochondrie, někdy též v cytosolu
Fe-SOD	mnohé bakterie, některé vyšší rostliny	u člověka není přítomna

Tab. 4 Klasifikace superoxiddismutázy [39].

Spontánní dismutace superoxidu na bimolekulární kyslík a peroxid vodíku (Obr. 9) probíhá při pH 7,4 pomaleji a SOD ji urychluje 10 000x. Cu,Zn-SOD se skládá ze dvou identických podjednotek, z nichž každá má molekulovou hmotnost 16 000 a v každé je jeden atom mědi a jeden atom zinku. Je to velmi stabilní enzym, katalyzuje při pH 4,5 – 9,5. Vyskytuje se v cytosolu a v mezimembránovém prostoru mitochondrií. Přenos elektronů z jedné molekuly superoxidu na druhou obstarává atom mědi. Cu(II) se redukuje na Cu(I) a pak zase oxiduje. Zn(II) má stabilizační funkci, katalýzy se neúčastní. Gen pro tuto SOD se nachází na 21. chromozomu.



Obr. 9 Reakce superoxidismutázy [39].

Mn-SOD a Fe-SOD se vyskytují u prokaryot jako dimery. Mn-SOD je enzymem mitochondriální matrix. Prokaryotická Fe-SOD nebyla nalezena v živočišných buňkách. Podjednotky těchto enzymů mají molekulovou hmotnost kolem 20 000. Nejsou tak stabilní jako Cu, Zn-SOD.

3.2.2.2.1.2 Glutathionperoxidázy

Intracelulární peroxidy vodíku (hydroperoxidy) jsou odstraňovány dvěma glutathionperoxidázami – cytosolovou a fosfolipidhydroperoxidovou.

Cytosolová GSH-glutathionperoxidáza (cGPx) rozkládá několik typů hydroperoxidů mastných kyselin, které však musí být nejdříve uvolněny z poškozených lipidů fosfolipázou A₂. Je velice aktivní i v dismutaci H₂O₂ a tak v buňkách spolupracuje s katalázou při odstraňování H₂O₂ (např. v erytrocytech).

Enzym fosfolipidhydroperoxid-GSH-peroxidáza (PHGPx) dokáže redukovat fosfolipidové hydroperoxydy na neškodné hydroxyderiváty přímo v membránách, bez uvolnění mastných kyselin. PHGPx zabraňuje neenzymové peroxidaci lipidů následujícím mechanismem: peroxylové radikály mastných kyselin jsou v membránách nejdříve redukovány α -tokoferolem na odpovídající hydroperoxydy a ty jsou pak redukovány enzymem PHGPx za současné oxidace GSH. Tím se znemožní rozklad hydroperoxidů na alkoxylové radikály a dochází k odstartování nového řetězce radikálových reakcí v membráně. Předpokládá se, že tímto mechanismem se PHGPx kromě antioxidační ochrany účastní také regulace syntézy prostaglandinů a leukotrienů. Protože PHGPx dokáže reagovat i s proteiny, spekuluje se o tom, že tento enzym se účastní přenosu elektronů mezi peroxidy a thiolovými skupinami proteinů a mohl by tak být článkem oxidoredukční signalizace.

Zatímco PHGPx je monomer, ostatní izoenzymy se skládají ze čtyř podjednotek. Všechny čtyři formy GPx jsou selenoproteiny, obsahující selenocysteinový zbytek jako součást peptidového řetězce. Selenocystein je součástí aktivního centra enzymu. Redukuje peroxid dvěma elektrony na hydroxylovou skupinu (a vodu) a sám se oxidační na selenol. Ten se pak regeneruje dvěma elektrony dvou glutathionů zpět na selenocystein. Rovnice shrnuje výslednou reakci:



Oxidovaný glutathion se musí redukovat zpět na GSH. Reakci katalyzuje *glutathionreduktáza*, která posléze přijme dva elektrony od NADPH produkovaného v pentózovém cyklu glukóza-6,6-fosfátdehydrogenázou a 6-fosfoglukonátdehydrogenázou. Výsledná reakce glutathionreduktázy:

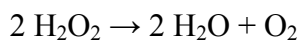


3.2.2.2.1.3 *Glutathiontransferázy*

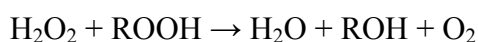
Celá rodina cytosolových enzymů zvaných *glutathiontransferázy* (GST) katalyzuje konjugační reakci, při které je sulfohydrylová skupina GSH navázána na elektrofilní organickou látku. Tímto způsobem jsou detoxikovány některé xenobiotika. V posledních letech se ukázalo, že GST jsou významnou ochranou před následky peroxidace lipidů. Jejich substrátem je totiž 4-hydroxynonenal, který je konjugací s GSH inaktivován a vyloučen z těla. GSH je tedy spotřebováván při ochranných redukčních reakcích, ale také při odstraňování produktů peroxidace.

3.2.2.1.4 Kataláza

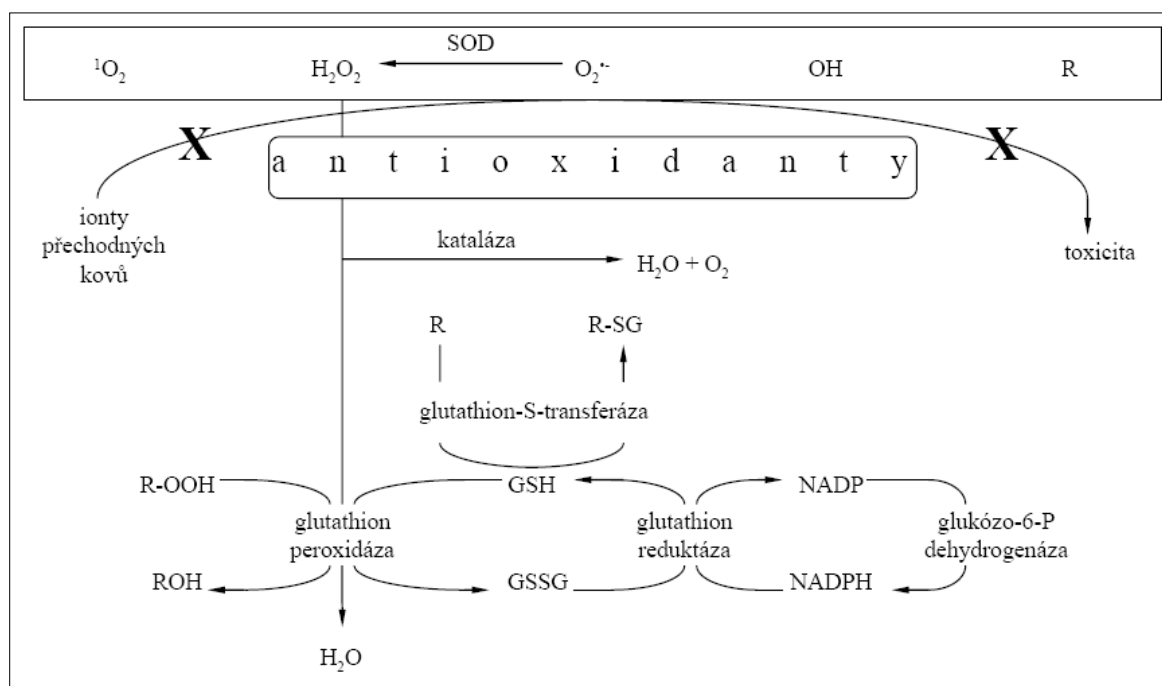
Kataláza (H_2O_2 : H_2O_2 -oxidoreduktáza, KAT) má čtyři tetraedricky uspořádané podjednotky, v každé jednu prostetickou protoporfyrinovou skupinu s Fe^{3+} . Kromě dvouelektronové dismutace peroxidu na bimolekulární kyslík a na vodu:



Může katalyzovat peroxidázové reakce typu:



Zatímco první reakce má jistě význam pro inaktivaci H_2O_2 v peroxizómech, druhá reakce se v antioxidační ochraně asi neuplatňuje vzhledem k nízké reaktivitě katalázy s alkylperoxyd (ROOH). Tuto ochranu zajišťují glutathionperoxidázy (Obr. 10).



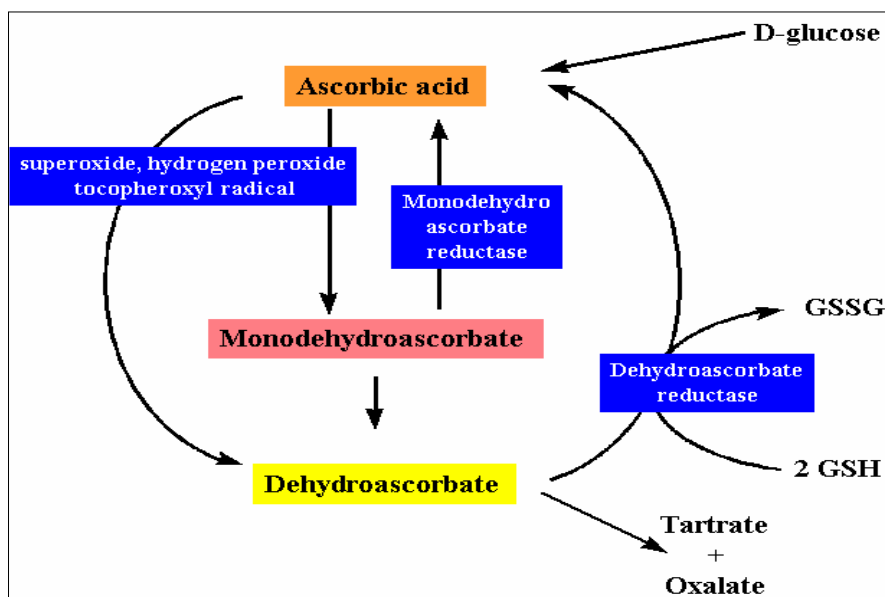
Obr. 10 Schéma mechanismu glutathionperoxidáz. Převzato z [39].

3.2.2.2.2 Nízkomolekulární antioxidanty

3.2.2.2.2.1 Askorbát (vitamín C)

Nejvýznamnějším nízkomolekulárním redoxním systémem je kyselina L-askorbová a její oxidované deriváty. Názvem vitamín C se označuje celý reversibilní oxidačně-redukční systém. Askorbát je nutný kofaktor enzymů při syntéze kolagenu a při přeměně dopaminu na noradrenalin. V plazmě se jeho koncentrace pohybuje mezi 40 – 140 μM . Kromě toho je důležitým redukčním činidlem. Redukuje Fe(III) na Fe(II) a Cu(II) na Cu(I) . Umožňuje tak vstřebávání železa ze střeva a využití přechodných kovů v aktivním centru hydroxyláz. Antioxidační účinek askorbátu spočívá v tom, že redukuje anorganické i organické radikály jako $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\text{HO}_2^{\cdot}$, $\text{HO}^{\cdot}$, hydrofilní $\text{RO}_2^{\cdot}$, $\text{NO}_2^{\cdot}$ a reaguje s O_2 a HClO . Askorbát také regeneruje tokoferyllový radikál (oxidovaná forma vitamínu E) na redukovanou formu - vitamín E, čímž zabezpečuje ochranu vitamínu E a lipidů membrán před oxidací. Při těchto reakcích ztratí elektron a změní se na *semidehydroaskorbát* neboli *askorbylový radikál*, který je mnohem méně reaktivní než vyjmenované radikály. Regeneruje se speciální dehydrogenázou za účasti NADH zpět na askorbát nebo dismutuje na askorbát a *dehydroaskorbát* (Obr.11). Dehydroaskorbátreduktáza za účasti GSH regeneruje dehydroaskorbát na askorbát [4].

Askorbát může přímo vychytávat ROS i bez pomoci enzymů. Ochrannou funkci má vitamín C i pro labilní formy kyseliny listové. Inhibuje také tvorbu nitrosaminů a působí tak jako modulátor mutagenese a karcinogeneze. Mnoho dalších aktivit vitamínu C je dosud známo jen částečně [42].



Obr. 11 Syntéza a degradace kyseliny askorbové v rostlinné tkáni. Převzato z [42].

3.2.2.2.2 Vitamín E (α -tokoferol)

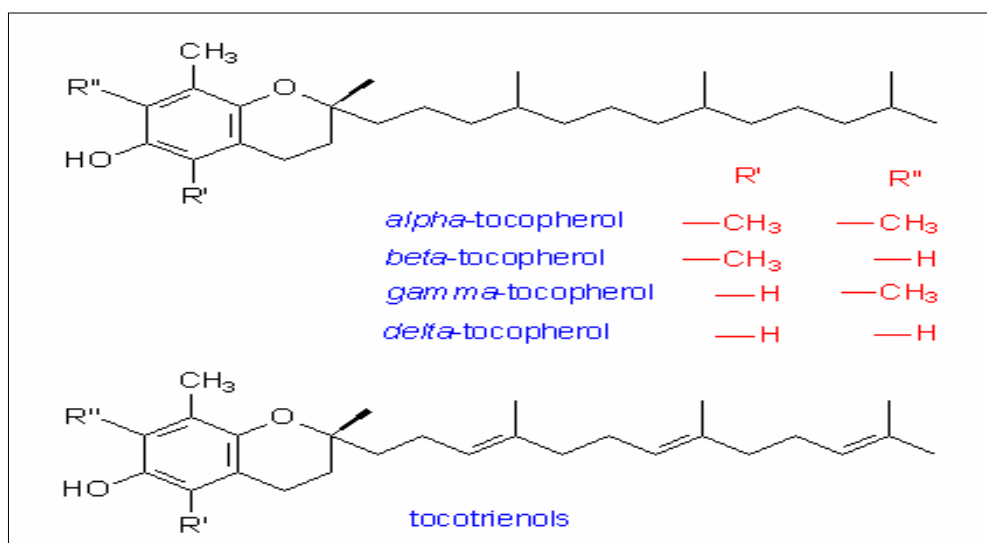
Vitamín E je skupina osmi izomerů, z nichž biologicky nejučinnější je α -tokoferol. Vitamín E je nejvýznamnějším antioxidantem membrán, jenž působí u eukaryotických buněk jako ochrana nenasycených mastných kyselin v lipidech a fosfolipidech před poškozením volnými radikály. Jeho izoprenová struktura je lipofilní. Spolu s β -karotenem a ubichinony chrání strukturu a integritu biomembrán, tedy cytoplazmatické membrány a zejména membrán vnitrobuněčných organel (buněčné jádro, mitochondrie, lysosomy, endoplazmatické retikulum).

Při peroxidaci lipidů přeměňuje alkylperoxylové radikály $\text{LOO}^\bullet$ na hydroperoxydy, se kterými si poradí GPx. Zneškodní tak peroxylové radikály mastných kyselin dříve, než mohou atakovat sousední „zdravé“ lipidy. Tokoferol se přitom mění na *tokoferolový radikál*, který je stabilnější než látky, s nimiž tokoferol reaguje. Askorbát aspoň z části tokoferolový radikál redukuje zpět na tokoferol. Popsaný antioxidační cyklus tokoferolu tlumí propagaci radikálových reakcí v lipidech membrán a lipoproteinů (LDL, HDL).

Aktivitu vitamínu E vykazuje osm základních strukturně příbuzných derivátů chromanu. Strukturním základem společným všem sloučeninám vykazujícím aktivitu vitamínu E (tzv. vitagenům) jsou tokol a tokotrienol, které obsahují chromanový cyklus s nasyceným nebo nenasyceným isoprenoidním postranním řetězcem o 16 atomech uhlíku. Přítomnost funkčních skupin na chromanovém cyklu je nezbytná pro biologickou aktivitu všech osmi vitamerů.

Čtyři formy vitamínu E s nasyceným terpenoidním postranním řetězcem odvozeným od tokolu se nazývají tokoferoly, čtyři formy s nenasyceným postranním řetězcem odvozené od tokotrienolu se nazývají tokotrienoly (Obr. 12). Jednotlivé tokoferoly a tokotrienoly se liší polohou a počtem methylových skupin v chromanovém cyklu.

Antioxidační funkce tokoferolu spočívá v přeměně alkylperoxidových radikálů $\text{LOO}^\bullet$ na hydroperoxydy při peroxidaci lipidů. Zneškodní tak peroxylové radikály mastných kyselin dříve, než mohou reagovat s dalšími lipidy. Tokoferol se přitom mění na tokoferolový radikál, který je stabilnější než látky, se kterými tokoferol reaguje. Vzniklé hydroperoxydy jsou deaktivovány pomocí glutathionperoxidázy [4, 42].



Obr. 12 Struktura tokoferolů a tokotrienolů. Převzato z [42].

3.2.2.2.3 Ubichinon (koenzym Q)

Ubichinon (koenzym Q, CoQ) je ve skutečnosti celá rodina benzochinonů, lišících se délkou lipofilního izoprenového řetězce. U savců je nejrozšířenější CoQ₁₀ s deseti pětiuhlíkovými izoprenovými jednotkami. CoQ₁₀ je dobře znám jako přenašeč elektronů v dýchacím řetězci v mitochondriích. Vyskytuje se však ve všech membránách, kde tlumí radikálové reakce ve spolupráci s tokoferolem. Ubichinon pomáhá při regeneraci vitamínu E z tokoferolových radikálů.

Koenzym Q se může chovat prooxidačně i antioxidačně. Jednak se může účastnit tvorby superoxidového radikálu, avšak za fyziologických podmínek tato reakce probíhá velmi pomalu a je tedy nevýznamná. Naopak antioxidační schopnosti koenzymu Q jsou velice významné. Redukovaná forma koenzymu Q může reagovat přímo se superoxidovým radikálem, lipidovým radikálem nebo peroxylovým radikálem. Současné poznatky o koenzymu Q vyplývají pouze z nepřímých pozorování. Přesto je zřejmé, že patří mezi významné antioxidanty, které chrání membrány proti toxickému působení ROS.

3.2.2.2.4 Karotenoidy, β -karoten a vitamín A

Karotenoidy jsou významnými lipofilními barvivy mnoha druhů ovoce a zeleniny. Vyskytují se ve všech fotosyntetizujících rostlinných pletivech, kde jsou přítomny jako fotochemicky aktivní složky chromoplastů. Jejich přítomnost v zelených částech rostlin bývá často maskována chlorofylem. Sekundárně se karotenoidy vyskytují také v potravinách živočišného původu. Živočichové však nejsou schopni syntetizovat karotenoidy, pouze přeměňují potravou získané rostlinné pigmenty na látky odlišné struktury nebo je skladují jako takové [43].

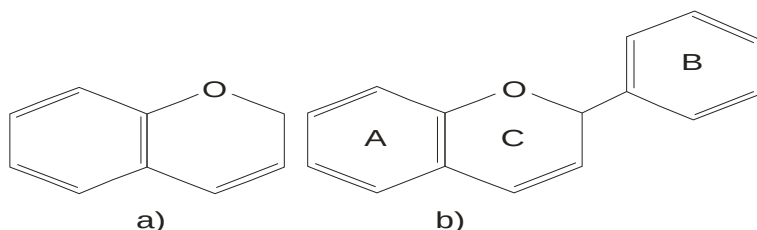
Většina karotenoidních látek se řadí mezi tetraterpeny obsahující osm isoprenoidních jednotek. Za svoji barevnost vděčí řetězci konjugovaných dvojných vazeb, který se vyskytuje v několika základních strukturách a jejich kombinacích. Asi 50 přirozeně se vyskytujících sloučenin ze skupiny karotenoidů vykazuje aktivitu provitamínu A. Nejvýznamnějším provitaminem A je β -karoten, následovaný α -karotenem, γ -karotenem a dalšími provitamíny A [44, 45]. V antioxidační ochraně se karotenoidy uplatňují při odstraňování radikálů centrovaných na uhlík a alkylperoxidových radikálů ROO• v lipidech. Mechanismus jejich působení je dosud nejasný, pravděpodobně se uplatňují prostřednictvím tokoferolu. Mohou též zhaset singletový kyslík.

Z některých karotenů vznikají vitamíny A₁ - retinol a A₂ - dehydroretinol. Retinol oxidován na retinal hraje významnou úlohu v sítnici, podporuje dobrý zrak [4].

3.2.2.2.5 Flavonoidy

O flavonoidech se dlouho předpokládalo, že slouží pouze jako květní pigmenty k lákání hmyzu, jako signální molekuly nebo jako antimikrobiální látky. Flavonoidní látky neboli flavonoidy jsou značně rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů obsahujících v molekule dva benzenové kruhy spojené tříuhlíkovým řetězcem. Jedná se o uspořádání C₆-C₃-C₆. Svými vlastnostmi se velmi liší od jiných fenolových pigmentů a proto jsou uváděny jako samostatná

skupina rostlinných barviv. U většiny flavonoidů je C_3 řetězec součástí cyklického (pyranového) kruhu. Jsou tedy odvozeny od kyslíkatých heterocyklických sloučenin 2H-chromenu, substituovaného v poloze C_2 fenylovou skupinou, který se nazývá flavan (*Obr. 13*).



Obr. 13 Struktura a) 2H-chromenu a b) flavanu. Převzato z [2].

Dnes je známo více než 4000 flavonoidních látek a stále se v různých rostlinných zdrojích nacházejí další sloučeniny. Některé z flavonoidů jsou významnou součástí přírodních barviv, podílejících se na biochemických procesech. Mechanismus účinků flavonoidů není dosud přesně znám, pravděpodobně inhibují metabolickou dráhu vzniku superoxidu. Dále inhibují agregaci krevních destiček a tím zabraňují vzniku krevních sraženin. Díky své schopnosti inhibovat lipoperoxidaci brání rozvoji aterosklerózy. Nejvýznamnější je ale antikarcinogenní působení flavonoidů, přičemž inhibiční účinek se projevuje hlavně v počáteční fázi rakoviny. Flavonoidy mají antimutagenní schopnosti a zabraňují navíc vazbě karcinogenu na DNA [2]. Jako antioxidanty působí také protizánětlivě a zasahují do buněčného signálování. Flavonoidy chelatují železo, takže i tímto mechanismem by mohly tlumit oxidační stres tkáně [4].

3.2.2.2.6 Kyselina lipoová (lipoát)

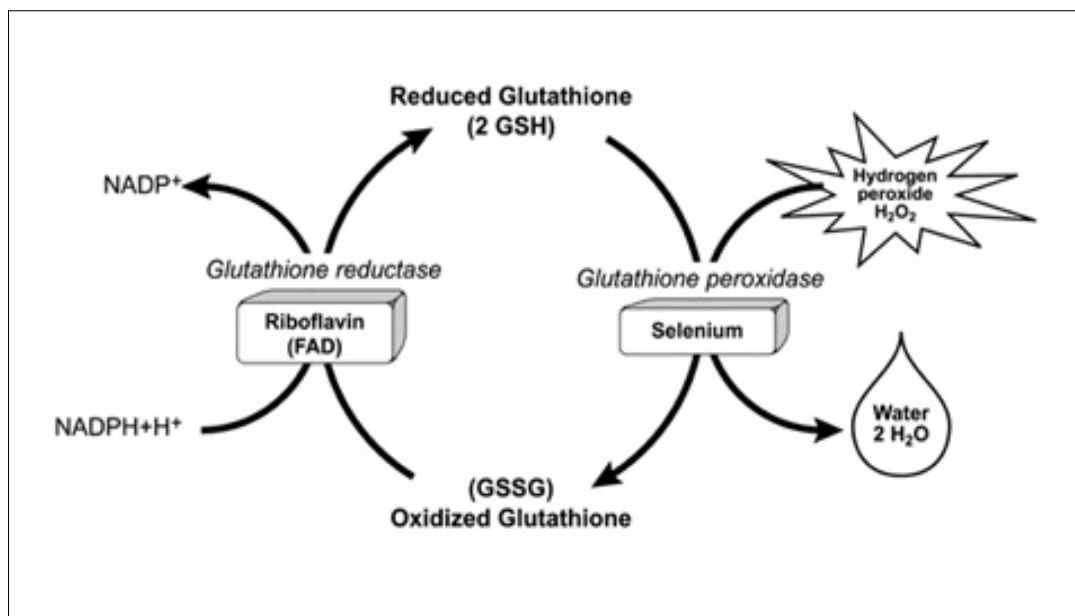
K dalším nízkomolekulárním antioxidantům se řadí kyselina lipoová, která je široce rozšířeným koenzymem obsahujícím sulfidovou skupinu a vyskytuje se v prokaryotických i eukaryotických mikroorganismech, u rostlin i živočichů. Antioxidační aktivita kyseliny lipoové se projevuje několika způsoby a to přímou reakcí s ROS, vazbou přechodných kovů za současné tvorby chelátů, recyklací jiných antioxidantů (tokoferylový radikál) a ovlivněním genové exprese. Kyselina lipoová reaguje s alkylperoxylovými radikály, askorbylovými radikály, tokoferylovými radikály a s kyselinou chlornou. Tokoferylový radikál regeneruje přímo nebo pomocí askorbátu [4].

3.2.2.2.7 Glutathion (GSH, GSSG)

Glutathion je tripeptid (γ -glutamyl-cysteinyl-glycin), patří k multifunkčním intracelulárním neenzymatickým thiolům. Do systému antioxidační ochrany se zapojuje rovněž několika způsoby: je kofaktorem některých enzymů, které zasahují do detoxikačních mechanismů oxidačního stresu, např. glutathionperoxidáza, glutathiontransferáza. Účastní se

přenosu aminokyselin přes buněčnou membránu, je lapačem hydroxylového radikálu a singletového kyslíku, detoxikuje peroxid vodíku a lipoperoxidy a přímo nebo nepřímo redukuje tokoferolový radikál

Oxidovaný glutathion je redukován glutathionreduktázou. Poměr oxidovaného a redukováného glutathionu je vhodným ukazatelem oxidačního poškození organismu (*Obr. 14*) [2].



Obr. 14 Cyklus glutathionu. Převzato z [45].

Kromě výše uvedeného přehledu nejvýznamnějších skupin nízkomolekulárních antioxidantů lze jmenovat ještě celou řadu metabolicky aktivních látek, jako je bilirubin, kyselina močová, melatonin, albumin apod., jejichž hlavní funkcí je i jiná než antioxidační aktivita, jelikož vykazují i redukční vlastnosti [2].

3.2.2.3 Terciární antioxidanty

3.2.2.3.1 Opravné enzymy DNA

Volné radikály a další ROS, které jsou běžně generovány v organismu, způsobují oxidační poškození DNA, což pravděpodobně přispívá ke vzniku a rozvoji rakoviny. Oxidační poškození DNA se tedy může považovat za biomarker rizika vzniku a rozvoje tohoto onemocnění. Dosud bylo identifikováno více než sto typů defektů DNA. Nejčastěji se jedná o modifikace nebo ztrátu bází, jedno- a dvouřetězcové zlomy, poškození deoxyribózy atd. [2].

Poškozená DNA může být opravena několika způsoby: úplnou opravou, opravou poškozeného místa do původního stavu, excizní opravou tzn. vyštěpením poškozeného místa, které se uskutečňuje excizní opravou bází nebo nukleotidů nebo opravou chybného párování, tolerantní opravou, kdy dochází k obnově funkce DNA, aniž by bylo odstraněno původní

poškození. Při této opravě se poškození způsobené zlomy a rekombinací obchází replikací [46].

4.2.2.3.2 *Proteolytické enzymy*

Jako proteolytické enzymy (proteázy) označujeme všechny enzymy, které katalyzují hydrolýzu peptidových vazeb v proteinech a peptidech. Proteázy patří do enzymové třídy hydroláz. Vzhledem k jejich funkci při biodegradaci proteinů, která vede k opětovnému využívání či odbourávání aminokyselin, jsou proteázy v živých systémech široce zastoupeny. Podle místa působení na polypeptidový řetězec se proteázy dělí do dvou skupin: na endoproteázy, které katalyzují hydrolýzu vazeb uvnitř peptidového řetězce, přičemž vznikají peptidy různé velikosti, a exoproteázy, které katalyzují hydrolytické odštěpení samotné koncové aminokyseliny z polypeptidového řetězce. Podle chemické povahy aktivního centra se proteázy dělí na serinové, thiolové, kyselé a metaloproteázy. Mezi nejznámější proteolytické enzymy patří pepsin, trypsin, chymotrypsin, papain a bromelin [47].

3.2.3 Chronická pankreatitida

Chronická pankreatitida (chronický zánět slinivky břišní; CHP) je charakterizována jako trvale progredující onemocnění pankreatu s charakteristickými ireverzibilními morfologickými změnami, způsobující charakteristické bolesti a trvalou ztrátu funkčnosti slinivky břišní, kdy je funkční parenchym pankreatu nahrazován vazivovou tkání. Konečným výsledkem tohoto procesu je vznik progresivní exokrinní a endokrinní pankreatické nedostatečnosti [48, 49, 50, 51, 52]. Z praktického pohledu dochází k poruše trávení základních živin, především lipidů a v důsledku nedostatečné produkce inzulínu ke vzniku diabetu, který je označován jako pankreatogenní diabetes. Porucha trávení a vstřebávání vede ke ztrátě tělesné hmotnosti, malasimilaci, hypoproteinemii, hypoalbuminemii. Strukturu a funkci pankreatu znázorňuje (*Obr. 15*).

Fibrogeneze pankreatu je známým mechanismem vzniku CHP. Ve fibrogenезi hrají zásadní roli hvězdicovité acinární buňky ve stěně pankreatu, pankreatické stelátové buňky (PSCs; Pancreatic Stellate Cells). Iniciální krok v procesu fibrogenезe je poškození PSCs, vznik nekróz, aktivace makrofágů, agregace trombocytů v zánětlivé tkáni, uvolnění růstových faktorů (např. TGF- β , PDGF) a dalších prozánětlivých cytokinů. A zvláště významným je vznik oxidačního stresu, který hraje zřejmě zásadní roli v procesu aktivace stelátových buněk se stimulací extracelulární matrix a redukcí degradace matrix. Právě stelátové buňky představují hlavní buněčný zdroj extracelulární matrix u osob s chronickou pankreatitidou [53]. Vznik chronického zánětu pankreatu je znázorněn na (*Obr. 16*) a (*Obr. 17*). Schémata (*Obr. 16 a 17*) znázorňují první fázi poškození pankreatu, kdy podněcující a dráždivé faktory (alkohol, toxický metabolický stres, genetické predispozice) aktivují PSCs a dochází k opakovanému vzniku zánětu. Pronikající zánět do pankreatu produkuje TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand; ligand vedoucí buňku k apoptóze), prozánětlivé cytokiny a chemokiny. PSCs způsobí destrukci parenchymu vedoucí k fibrogenезi pankreatické tkáně a dochází ke vzniku CHP. Finálně jsou v CHP pankreatické ducty ucpané, zdeformované,

rozšířeny a zvýší se intraduktální tlak. Dlouhotrvající duktální změny aktivují tzv. *Notch a Hedgehogovu cestu*, která vede k acinoduktální metaplasii (ADM; Acinoductal Metaplasia), k pankreatické intraepiteliální neoplasii (PanIN; Pancreatic Intraepithelial Neoplasia) a je dána predispozice k rozvoji karcinomu pankreatu. [54, 55, 56]

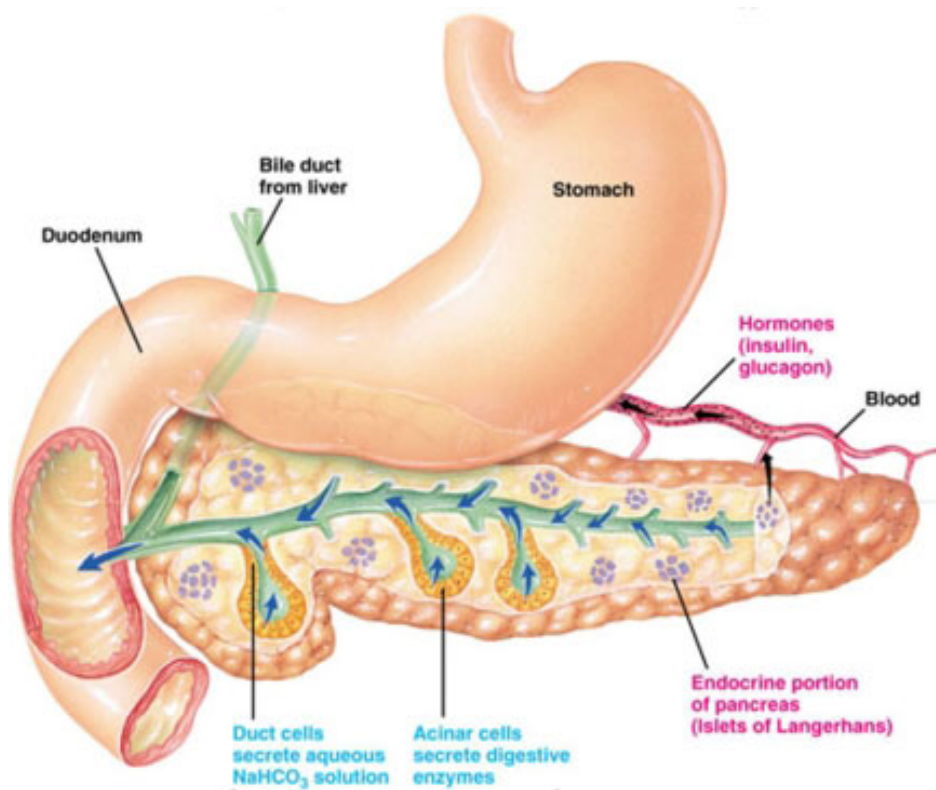
Chronický zánět pankreatu je tedy významným faktorem, který vede k procesu pankreatické karcinogeneze. Lze předpokládat, že významné onkogeny jsou aktivovány cytokiny liberalizovanými v průběhu chronického zánětu. Oxidační stres a proces fibrogenese jsou dva hlavní předpokládané faktory iniciace karcinogeneze, tedy vznik pankreatického karcinomu [57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67].

O etiologii CHP vypovídá skutečnost, že nejčastější příčinou vzniku tohoto onemocnění je alkohol [68]. Mezi méně časté příčiny patří faktory metabolické a významné genetické predispozice. Velice vzácná je autoimunní etiologie a konečně častým je tzv. obstruktivní typ chronické pankreatitidy, při kterém vzniká CHP v důsledku obstrukce pankreatického vývodného systému, jehož příčinou je přítomnost např. intraduktálního konkrementu, ale i metabolické změny vedoucí ke změně viskozity pankreatického sekretu a k tvorbě proteinových zátek, do nichž vypadávají soli uhličitanu vápenatého, rovněž za vzniku kaménků. Tyto skutečnosti odráží i poslední dělení CHP dle etiologie, jak ukazuje (Tab. 5). Z uvedených etiologických možností je zřejmé, že CHP je onemocnění mladší a střední věkové kategorie.

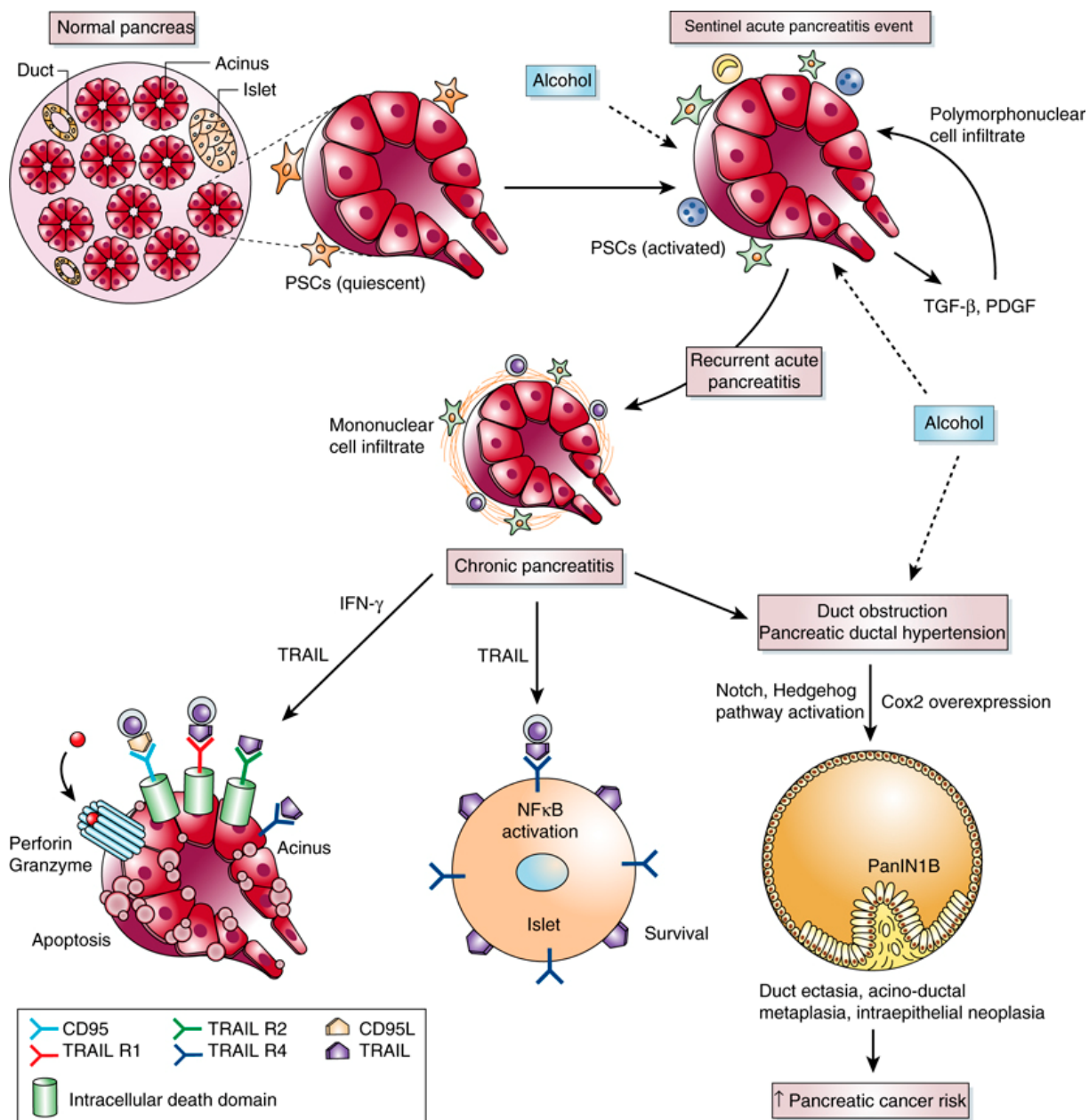
Klasifikace FIGARO
T - toxonutritivní
I – idiopatická
G - genetická
A - autoimunitní
R – recidivující akutně
O - obstruktivní

Tab. 5 Etiologická klasifikace chronické pankreatitidy [69].

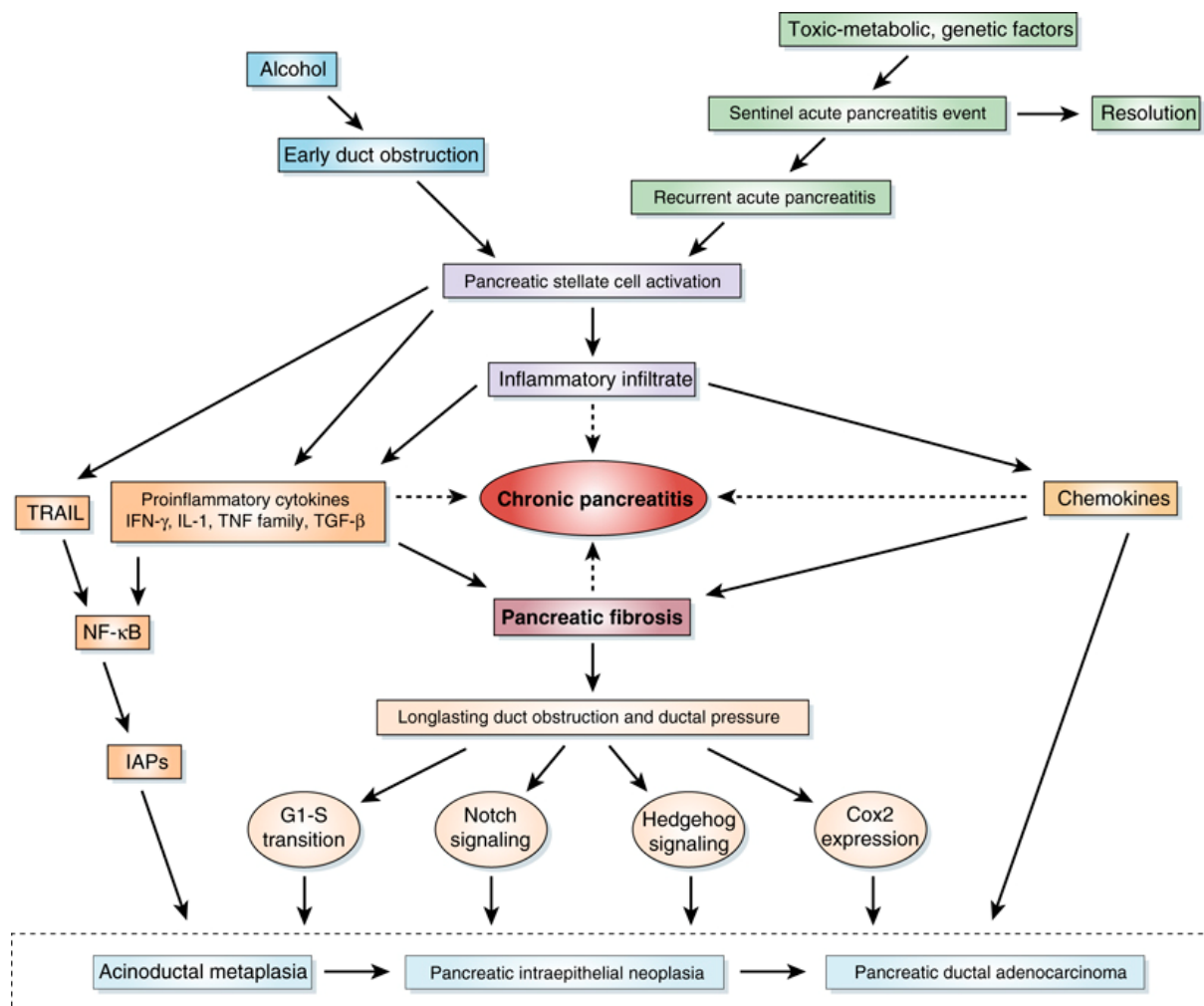
Klinické příznaky CHP jsou charakterizovány především bolestí. Bolest bývá stálá, úporná, trvající hodiny i dny, ale typickou je její vyvolání nebo zhoršení jídlem, takže nemocní se bojí najíst. Tím lze vysvětlit, kromě samozřejmě nedostatečného trávení, i další typický příznak CHP a tím je hubnutí. Lze říci, že CHP je chronické onemocnění s trvalou progresí a významně negativně ovlivňuje kvalitu života nemocných.



Obr. 15 Pankreas. Převzato z [70].



Obr. 16 Mechanismus poškození pankreatického parenchymu a signální dráhy v rozšířeném duktu u chronické pankreatitidy: důsledkem je karcinogeneze pankreatu. Převzato z [71].



Obr. 17 Mechanismus poškození pankreatického parenchymu a signální dráhy v rozšířeném duktu u chronické pankreatitidy: důsledkem je karcinogeneze pankreatu. Převzato z [71].

3.2.3.1 Oxidační stres v chronické pankreatitidě

Na vzniku a rozvoji chronické pankreatitidy se velkou mírou podílí i oxidační stres.

3.2.3.1.1 Role ROS v chronické pankreatitidě

Oxidační stres je ve většině případů doprovázen vznikem zánětu [49, 72]. Zánět je zdrojem poškozených buněčných organel. Ty jsou atakovány a poškozovány vysoce reaktivními formami kyslíku (ROS), které jsou produkovány aktivovanými neutrofily a makrofágy v místě zánětu [41, 73, 74, 75]. ROS jsou generovány během endogenního oxidačního stresu nebo během chemického stresu ze znečištěného životního prostředí nebo z životního stylu jedince např. příjem xenobiotik do organismu [49, 76, 77]. Předpokládá se, že ROS jsou schopny indukovat poškození sekrečních pankreatických buněk prostřednictvím počinající autodigesce.

3.2.3.1.2 Role RNS v chronické pankreatitidě

Vedle reaktivních metabolitů kyslíku se v oxidačním poškození buněk, tkání a v místech zánětu, ale i v regulaci důležitých biologických dějů uplatňují také reaktivní metabolity dusíku (RNS), které hrají také důležitou úlohu. Tyto metabolity jsou odvozeny od oxidu dusnatého (NO). NO je důležitým mediátorem lokálního zánětu a karcinogeneze a hraje klíčovou roli v signálování v rámci vaskulárního systému. Současně významně přispívá k oxidačnímu poškození důležitých biomolekul v zánětlivých procesech. Protože NO radikál existuje v plynném skupenství, velice rychle reaguje s O_2 a s radikálem superoxidového aniontu za vzniku vysoce reaktivního NO_2 , peroxynitritu ($ONOO^-$) nebo dusitanů a dusičnanů [78, 79 a viz. Kap. 3.1.3]. Vzhledem k jeho velice krátkému poločasu rozpadu, je velice obtížné NO detekovat přímo v krevní plazmě. Proto je rutinně stanovován nepřímou metodou a to stanovením nitritů jako jednoho z finálních produktů metabolismu NO. NO jako volný radikál je produkován enzymem – syntázou oxidu dusnatého (NOS). Jedna ze tří izoform NOS je inducibilní syntáza oxidu dusnatého (iNOS), která je exprimována mnohými typy rakovinových buněk a aktivovanými makrofágy. Zvýšená exprese (iNOS) byla u pankreatických nádorových buněk popsána též.

3.2.3.1.3 Role lipidové peroxidace v chronické pankreatitidě

Zánětlivý proces je doprovázen zvyšující se produkcí oxidantů. Mnohé RONS vyvolávají lipidovou peroxidaci, která vede k tvorbě sekundárních produktů lipidové peroxidace a současně mutagenních látek jako jsou malondialdehyd (MDA) a 4-hydroxynonenal (4-HNE), které poškozují přímo proteiny a DNA. V patologii rozličných zánětlivých onemocnění je evidentní, jak významnou roli má lipidová peroxidace [74, 80, 81, 82, viz. Kap. 3.2.1.1]. Stanovení MDA a 4-HNE v krevní plazmě jako produktů lipidové peroxidace je běžně prováděno [83, 84, 85, 86, 87, 88]. MDA i 4-HNE jsou považovány za

markery systémového poškození lipidovou peroxidací a potažmo oxidačního stresu [89, 90, 91, 92].

3.2.3.1.4 Role MPO v chronické pankreatitidě

Dalším biomarkerem oxidačního stresu, který přispívá k zánětlivé odpovědi organismu je myeloperoxidáza (MPO). MPO je lyzozomální enzym polymorfonukleárních granulocytů (neutrofilů; PMN), patřící do rodiny peroxidáz s hem prostetickou skupinou ve své molekule. MPO přispívá k zánětlivé odpovědi organismu a je uvolňovaná do extracelulárního prostředí aktivovanými PMN. Proto je současně i specifickým markerem PMN aktivace v zánětlivých procesech, které figurují v patologii onemocnění jako například kardiovaskulárního systému a nepřímo může souviset s těhotenskou cukrovkou a vysokým krevním tlakem v těhotenství. MPO produkuje řadu reaktivních oxidantů a radikálových částic schopných difúze [93, 94, 95]. Polymorfonukleární granulocyty jsou první buňky v lidském organismu, které jsou aktivované v hostitelském obranném systému proti infekci. Takto stimulované buňky se přesouvají pomocí chemotaktických podnětů k místům zánětu, kde rozeznávají a následně fagocytují bakterie a další vnější mikroorganismy. Cizí patogeny jsou vystaveny souboru hydrolytických enzymů a proteinů ničících bakterie, které jsou uloženy v granulích (jako právě MPO). Neutrofiley ji obsahují v poměrně velkém množství. Společně s NADPH-oxidázou je myeloperoxidáza zapojena do tvorby reaktivních kyslíkových radikálů a oxidace biologického materiálu. Ve stimulovaných neutrofilech NADPH-oxidáza redukuje molekulový kyslík, z něhož následnými reakcemi vzniká peroxid vodíku, což je právě hlavní substrát pro myeloperoxidázu [96, 97].

Bylo prokázáno, že antimikrobiální schopnost MPO se uplatňuje prostřednictvím tvorby kyseliny chlorné (HClO) a dalších toxických látek, které jsou součástí prostředí ve fagolyzosomech neutrofilů, kteří inhibují a usmrcují invadující mikroorganismy. MPO používá H_2O_2 k ovlivnění posttranslačních modifikací cílových molekul [98]. Poslední poznatky naznačují, že MPO je zcela zapojena do regulace buněčné homeostázy a hraje klíčovou roli v iniciaci a propagaci akutního a chronického vaskulárního zánětu [99, 100]. Chronický zánět pankreatu se může transformovat v karcinom pankreatu a i v tomto případě může hrát významnou roli MPO, která jako enzym reguluje ROS a obsahuje nukleotidové polymorfismy, které udělují pozměněnou enzymovou aktivitu [101].

3.2.3.1.5 Role hyaluronanu v chronické pankreatitidě

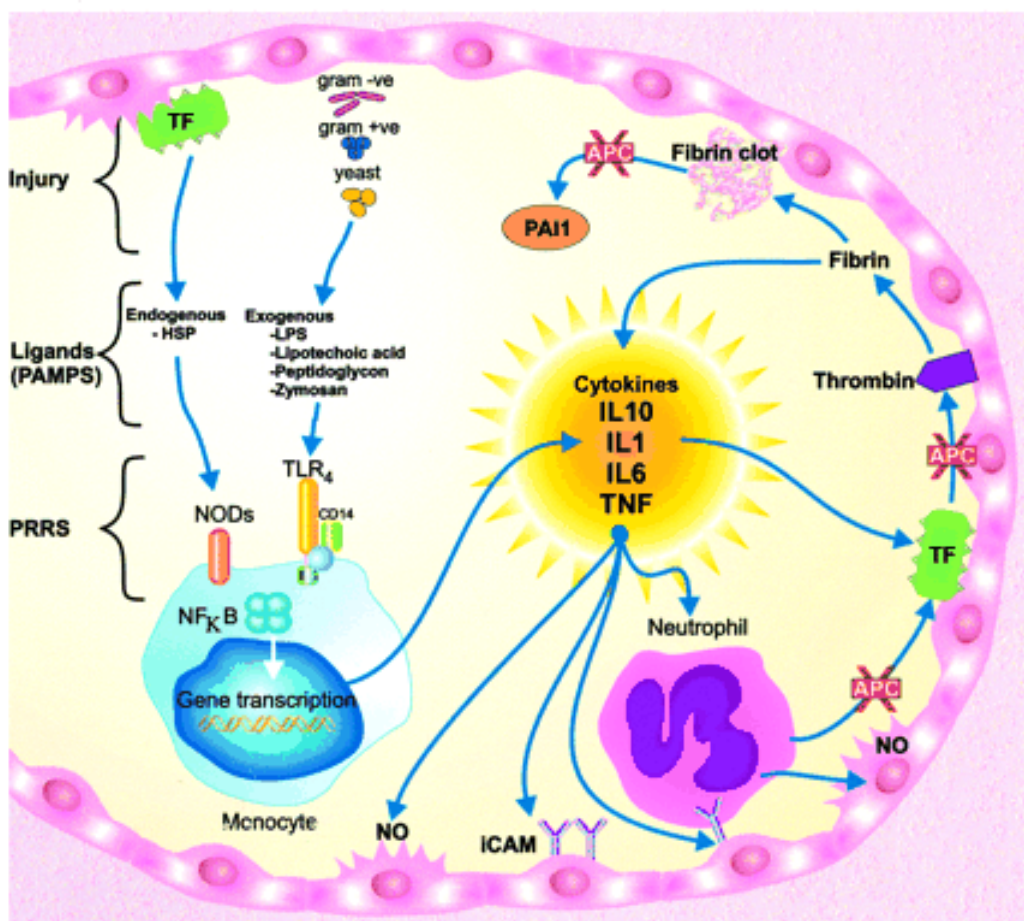
Hyaluronan (HA) je jednou ze složek extracelulární matrix a zaujímá významnou část z látek v epitelové tkáni (krycí tkáň). Zajišťuje její hydrataci. [102, 103]. HA je všudypřítomný vysokomolekulární polysacharid – glykosaminoglykan, který má významné biologické vlastnosti. Hraje významnou roli v mnoha klíčových fyziologických a patofyziologických procesech – zejména v buněčné plasticitě (tvárnosti buněk), která se uplatňuje u zánětu, imunitních reakcí, angiogenezi, procesů hojení ran, distribuce růstových faktorů, regulace migrace u endotheliálních buněk, buněčné proliferace, nádorových onemocněních kardiovaskulárního systému, transportu látek ke tkáním [104, 105, 106, 107].

Hlavním membránovým receptorem pro HA je CD44. Zvýšená hladina receptoru CD44 je obecně přijímána jako marker aktivace buněk v lymfocytech. HA přispívá k růstu nádorových buněk v důsledku adhezních interakcí s CD44. Ačkoli se HA váže na receptor CD44, je známo, že signální dráha pro degradační produkty HA jde přes Toll-like receptor 2 (TLR 2), TLR 4 nebo oba a TLR 4 v makrofázích a dendritických buňkách. TLR a HA hrají významnou roli v přirozené imunitě. HA jako vysokomolekulární polymer má v zánětlivých procesech odlišné biologické chování, vlastnosti a funkce, které závisí na jeho velikosti, na jeho molekulové hmotnosti. Vysokomolekulární HA je anti-angiogenní, protizánětlivý a imunosupresivní. Zatímco nízkomolekulární HA vykazuje vlastnosti angiogenní, zánětlivé a působí jako imunostimulant. HA je významně zapojen do odvádění leukocytů v místě zánětu (role receptoru CD44).

Rozvoj fibrogenese je charakteristický pro chronickou pankreatitidu. HA jakou součást extracelulární matrix, v níž je uložen, je uvolňován do krevního oběhu nebo do pankreatické šťávy. Proto lze předpokládat, že během vývoje zánětu dochází k jeho zvýšenému uvolňování [108, 109].

3.2.3.2 Charakteristika vybraných molekul imunitního systému v chronické pankreatitidě

V imunitním systému působí množství různých molekul, které mají dvě základní funkce – výkonnou a regulační. Výkonná funkce se projevuje v bezprostřední obraně proti patogenním bakteriím. Takto působí některé toxické peptidy nebo volné ROS, které jsou schopné usmrtit bakterie fagocytované profesionálními fagocyty. Typickými regulačními molekulami jsou imunohormony a cytokiny, které primárně regulují průběh imunitních reakcí, ale spolupracují i s ostatními fyziologickými systémy organismu [110]. Ukázkou imunitní odpovědi na poškozenou tkáň a vzniklou infekci v tkáni znázorňuje (*Obr. 18*).



Obr. 18 Diagram vrozené imunitní odpovědi na infekci a poškozenou tkáň zahrnující zánětlivé cytokiny a koagulační kaskádu; -ve = negativní; +ve = pozitivní; PAI = destičky aktivační inhibitor-1; ICAM = intracelulární adhezní molekula. Převzato z [111].

3.2.3.2.1 Cytokiny

Cytokiny jsou definovány jako sekreční regulační proteiny a glykoproteiny s molekulovou hmotností menší než 80 kDa, které kontrolují přežívání, růst, diferenciaci a efektorové funkce somatických buněk. Jejich nejdůležitější funkcí je regulace imunitních reakcí, přenos dorozumívacích signálů mezi imunitním systémem a ostatními orgány a zajištění homeostázy za normálních i patologických podmínek.

Cytokiny nacházíme především extracelulárně, kde reakcí s příslušným receptorem na cílových buňkách přenášejí informaci o stavu organismu a vyvolávají příslušnou biologickou odpověď. Přesněji - po vazbě na membránové receptory, které mají vnitřní kinasovou aktivitu, dochází k fosforylaci substrátu nesoucího tyrosin nebo serin a tím ke spuštění biochemické kaskády přenášející membránový signál do nitra buňky. Mechanismus působení jednotlivých cytokinů si je velmi podobný. Dá se říci, že buňka produkující cytokiny přitom slouží jako jakýsi biologický senzor, který prostřednictvím cytokinu přenáší informaci na receptor citlivých buněk, vlastních efektorů biologické odpovědi. Senzorem může být kyslíkový senzor regulující produkci erytrocytů, senzory pro mikrobiální produkty, jejichž přítomnost indukuje dělení, funkci a chemotaxi leukocytů, senzory probíhající imunitní reakce, senzory

produktů vzniklých poškozením nervových nebo epiteliálních buněk. I když převod signálu po vazbě cytokinů je stereotypní, konečné důsledky jsou rozdílné a závisí na fázi diferenciačního stavu zásahových buněk. Rozdíly jsou dány i větvením buněčných linií, účinek cytokinů se projeví rozdílně při vývoji makrofágů, granulocytů, lymfocytů nebo NK-buněk. Zda dojde pod vlivem růstových faktorů k dělení, proliferaci nebo ke zrání buněk, závisí nejen na stupni jejich zrání, ale na kvantitativním působení cytokinů. Předpokládá se, že jejich vlivem dochází nejprve k proliferaci, teprve po určitém počtu dělení přecházejí buňky do fáze, kdy cytokin ovlivňuje terminální zrání. Buňky mohou přejít i do stadia, kdy nejsou na regulačním působení cytokinů závislé. Předpokládá se [112], že cytokiny dávají prvotní signál, ale po iniciaci se další děje odvíjejí na základě vlastního buněčného programování. Mezi cytokiny řadíme skupiny látek označovaných jako růstové faktory, kolonie stimulující faktory, interleukiny, lymfokiny, tumor nekrotizující faktor, monokiny, stresové proteiny, chemokiny a interferony [110, 113, 114; (*Obr. 19*)].

Většina cytokinů je secernována klasickými sekrečními dráhami. Některé cytokiny se však vyskytují také vázané na membránu buněk, jíž jsou produkovány a vyžadují tak přímý buněčný kontakt. Další cytokiny nacházíme navázány na extracelulární matrix. Až na výjimky (TNF- α a PDGF v destičkách) nejsou cytokiny shromažďovány v zásobě v buňkách, ale jejich produkce bývá transientní v aktivovaných buňkách a je regulována na úrovni genové exprese podle okamžité potřeby organismu nebo tkáně. Některé cytokiny vykazují také konstitutivní expresi. Konstitutivní produkce těchto cytokinů udržuje rovnovážný stav obnovujících se tkání, v případě nervového či krvevorného systému je vyžadována pro zajištění funkce a přežití buněk.

Téměř všechny cytokiny mají mnoho různých účinků (pleiotropní účinky) a biologické aktivity mnoha cytokinů se do značné míry překrývají. Extrémním příkladem jsou LIF a TGF- β , které působí na téměř všechny somatické buňky a to často s odlišným účinkem, ale i u některých vysoce specializovaných cytokinů bylo nalezeno širší spektrum účinků. Na druhé straně se zdá, že je jen málo účinků, jež jsou zprostředkovány pouze jedním cytokinem a že většina jich je shodně vyvolána několika různými cytokiny.

Řada pokusů na „knock-out“ myších s vyřazeným genem pro určitý cytokin ukazuje, že jen minimum cytokinů je absolutně nezbytných pro přežití nebo pro správnou funkci efektorových buněk. Toto zjištění nevypovídá o zbytečnosti jednotlivých cytokinů, ale spíše o tom, že jejich funkce může být nahrazena jinou molekulou s podobnými účinky. Mnoho cytokinů vykazuje stimulační nebo inhibiční účinky, které mohou působit synergicky nebo antagonisticky s dalšími faktory. O vzájemně provázaném účinku různých cytokinů v organismu, který zajišťuje i průběh velmi složitých procesů, mluvíme jako o cytokinní regulační síti.

Význačným rysem cytokinů je jejich účinek v extrémně nízkých koncentracích (10^{-9} - 10^{-12} M). Určitý cytokin může vyvolat v některých případech opačný účinek. Záleží na typu cílových buněk, na obklopujícím mikrostředí, na koncentraci cytokinu a době jeho působení, na stavu buňky (v klidové/růstové fázi), na přítomnosti dalších cytokinů, dokonce na časové sekvenci, v jaké buňka s jednotlivými cytokiny reagovala. Zatímco primární struktura různých cytokinů bývá obvykle velmi odlišná, jednotlivé cytokiny bývají v průběhu fylogeneze značně konzervovány (až z 90 i více procent). Mnoho cytokinů vykazuje krosreaktivitu u řady savčích druhů (člověk-myš-krysa-prase apod.). Přesto jsou některé cytokiny druhově specifické.

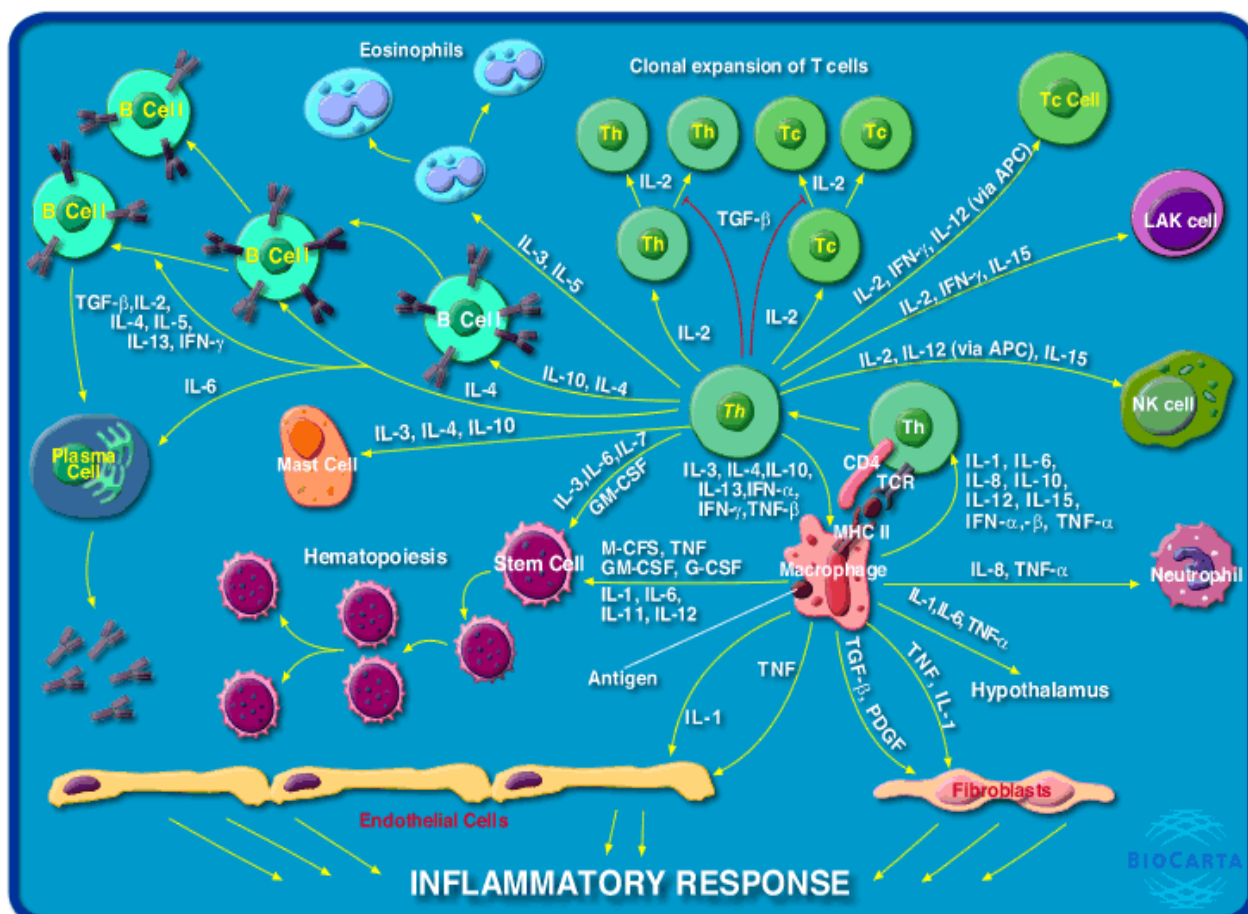
Nejčastější dělení cytokinů bývá podle jejich nejvýznamnějšího zdroje nebo podle základní funkce. Toto rozdělení je třeba chápat poměrně volně, protože většina cytokinů je produkována řadou buněčných typů a také funkce daného faktoru mohou zasahovat do více skupin.

3.2.3.2.2 *Receptory cytokinů*

Cytokinové receptory se obvykle skládají ze dvou, někdy i tří podjednotek: jedna z nich je zodpovědná za specifickou vazbu cytokinu, zatímco druhá či třetí zajišťuje spojení se signalizačními intracelulárními molekulami. Tato signalizační podjednotka bývá sdílena několika různými cytokinovými receptory. Na základě toho lze receptory pro cytokiny sdružit do několika skupin. Jednu takovou receptorovou "rodinu" tvoří receptory pro interleukiny: IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15 a IL-21, které všechny sdílejí podjednotku zvanou γ_c (CD132). Podobně receptory pro IL-3, GM-CSF a IL-5 sdílejí společnou podjednotku β (KH97; CDw131). Receptory pro IL-6, LIF, onkostatin a ciliární neurotrofní faktor (CNTF) používají shodnou signalizační podjednotku (gp130; CD130). Strukturně podobné jsou si receptory pro interferony a receptor pro IL-10. Charakteristickou strukturu mají receptory pro chemokiny – jejich polypeptidový řetězec prochází sedmkrát membránou a je asociován s trimerními G-proteiny. Další velkou skupinu receptorů představují ty, které váží cytokiny podobné TNF, tj. receptory pro TNF, LT, NGF atd. Do této skupiny patří také receptory CD27, CD30, CD40, OX-40 (CD134) a mnoho dalších. Tyto receptory jsou tvořeny oligomery (obvykle trimery) jedné podjednotky, která je v intracelulární části spojena se signalizačními molekulami.

Vazba cytokinu na specifický povrchový receptor způsobí v receptorové molekule konformační změnu (obvykle jde o agregaci alespoň dvou receptorových molekul), která se projeví v intracelulární části receptoru a zahájí přenos signálu do buňky. Většina cytokinových receptorů (receptory pro většinu interleukinů, interferony, G-CSF, GM-CSF, některé růstové faktory) je v intracelulární části nekovalentně asociována s cytoplazmatickými proteinkinázami, enzymy fosforylujícími jiné proteiny. Po navázání cytokiny dojde k agregaci receptorových molekul, přiblížení asociovaných kináz, jejich vzájemné fosforylaci a tím aktivaci. Aktivované kinázy pak fosforylují další proteiny a tak spouští signalizační kaskády. Tyto děje jsou v podstatě podobné signalizačním reakcím spouštěnými jinými receptory. Většina cytokinových receptorů je asociována s proteinkinázami skupiny Jak. Receptory pro chemokiny jsou asociovány s trimerními G-proteiny, u nichž je princip funkce odlišný. Receptory pro IL-1 a pro cytokiny ze skupiny TNF signalizují pomocí jiných, dosud ne zcela charakterizovaných kináz a jiných cytoplazmatických signalizačních molekul.

Výsledky signalizace přes cytokinové receptory závisí na typu buňky, typu signálu (tj. povaze receptoru) a na spolupůsobení jiných signálů. Konečným důsledkem může být v principu cokoli od stimulace buněčného dělení a diferenciaci přes spouštění efektorových mechanismů (degranulace, sekrece cytokinů a jiných mediátorů, aktivace membránových enzymů, buněčný pohyb – chemotaxe) až po zablokování buněčného cyklu a indukci apoptózy [113].



Obr. 19 Cytokiny a zánětlivá odpověď. Převzato z [115].

3.2.3.2.3 Role vybraných cytokinů a receptorů v chronické pankreatitidě

V chronické pankreatitidě jsme se zaměřili na následující cytokiny: $\text{TNF-}\alpha$; PDGF-AB ; $\text{TGF-}\beta$ a receptor: TNF RI .

$\text{TNF-}\alpha$ (Tumor Necrosis Factor) je hlavním zástupcem skupiny zánětlivých (prozánětlivých) cytokinů, neboť reguluje zánětlivé reakce. Působí jako endogenní pyrogeny a aktivuje endotelie. Reguluje také expresi dalších cytokinů, receptorů a proteinů akutní fáze. Podílí se na boji proti infekci a na eliminaci nádorových buněk jako protinádorová obrana.

Cytokin PDGF-AB (Platelet Derived Growth Factor) je destičkovým růstovým faktorem, pocházející z α -granulí trombocytů. Je také mitogen pro fibroblasty, hladkosvalové, epiteliální, endoteliální buňky, tedy jeho hlavní funkcí je hojení ran. Vyznačuje se také jako chemotaktický faktor a stimuluje mitózu.

Cytokin $\text{TGF-}\beta$ (Transforming Growth Factor) se řadí do skupiny transformujících růstových faktorů, skupina imunoregulačních cytokinů a podle své funkce se řadí do skupiny cytokinů s převážně inhibičním účinkem na zánětlivé reakce (protizánětlivé). Jeho hlavní funkce spočívají v regulaci růstu buněk a embryonálního vývoje, ovlivňuje proliferaci, diferenciaci a aktivaci širokého spektra buněk (zejména lymfocytů). Zvyšuje syntézu proteinů extracelulární matrix, adhezních molekul (integrinů), má roli v hojení ran a kostí, chemotaxi,

reguluje produkci dalších cytokinů, inhibuje proliferaci a aktivitu T a B-lymfocytů, i některé funkce monocytů. V tkáňové kultuře je účinný v koncentraci 1 - 10 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$, podaný subkutánně *in vivo* v dávce 100 - 1 000 ng [110, 113, 114].

3.2.4 Aplikované metody k analýze oxidačního stresu u pacientů s CHP

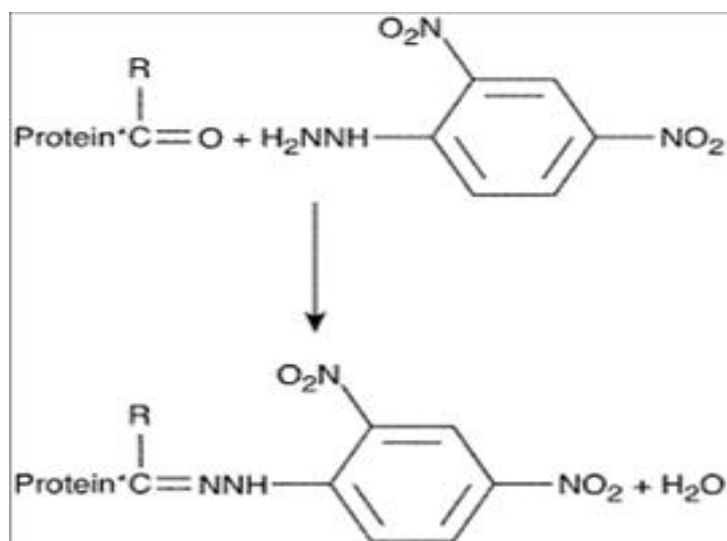
Ke sledování plazmatických hladin markerů oxidačního stresu u pacientů s chronickou pankreatitidou proti kontrolním jedincům v delším časovém intervalu byly použity následující metody:

- o Metoda HPLC-DAD: stanovení MDA a 4-HNE jako produktů lipidové peroxidace.
- o Metoda TRAP: stanovení antioxidační kapacity.
- o Metoda ORAC: stanovení antioxidační kapacity.
- o Metoda stanovení dusitanů pomocí Griessova činidla.
- o Metoda ELISA: stanovení TNF- α , TNF RI, PDGF-AB, TGF- β 1, MPO a HA

Princip metod je popsán v kapitolách 3.2.4.1 – 3.2.4.5. Přesné postupy metod jsou popsány v Experimentální části.

3.2.4.1 Stanovení malodialdehydu (MDA) a 4-hydroxynonenalu (4-HNE) metodou HPLC-DAD

Produkty lipidové peroxidace – MDA a 4-HNE v plazmě pacientů s chronickou pankreatitidou a v plazmě kontrolních jedinců byly stanoveny metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie se spektrofotometrickým UV-VIS detektorem Diode-Array (HPLC-DAD). Použitá metoda stanovení MDA a 4-HNE na HPLC-DAD byla převzata z primárního zdroje [116]. Byla optimalizována a aplikována s malými modifikacemi na naše laboratorní možnosti a podmínky. Supernatant deproteinizované, hydrolyzované plazmy vstupuje do reakce s reakčním činidlem dinitrofenylhydrazinem (DNPH) dle (*Obr. 20*) za vzniku příslušných derivatizačních produktů MDA a 4-HNE. Principem metody je stanovení absorpance derivatizačního produktů MDA-DNPH při vlnové délce 310 nm a 4-HNE-DNPH při vlnové délce 350 nm.



Obr. 20 Reakce s DNPH za vzniku derivatizačních produktů MDA-DNPH a 4-HNE-DNPH.

3.2.4.2 Metoda TRAP (Total Peroxyl Radical-Trapping Antioxidant Parameter)

Metodou TRAP je stanovena hodnota celkové antioxidační kapacity, která vyjadřuje koncentrační zastoupení všech antioxidantů vzorku jako celku. Metody stanovení celkové antioxidační kapacity jsou založeny na arteficiální tvorbě radikálů v testovaném biologickém materiálu. Měří se pak schopnost systému radikálové reakce zastavit nebo zpomalit [4].

Metoda TRAP podle [117, 118, 119, 120] a její modifikace patří mezi nejpoužívanější testy antioxidační aktivity. TRAP je luminometrická (chemiluminiscenční) metoda – měří přímo antioxidační kapacitu proti peroxylovému radikálu. Princip chemiluminiscenčních metod spočívá v tom, že luminiscenční proba (v našem případě luminol) reaguje s oxidantem za vzniku intermediátu v excitovaném stavu. Excitované elektrony přecházejí zpět na původní hladinu a při přechodu vyzáří určité kvantum světla, které je zesíleno fotonásobičem a detekováno fotodetektořem luminometru. Světelný signál je převeden na signál elektrický, který je vyjádřen v milivoltech anebo v relativních luminiscenčních jednotkách (RLU) – podle typu přístroje.

Základem metody TRAP je produkce peroxylového radikálu termální dekompozicí ABAP (2,2-azobis-(2-aminodinopropan)hydrochlorid) při 37 °C. Detekce vznikajících radikálů se projeví zesílenou chemiluminiscencí (CL), která je zprostředkována přidavkem luminiscenční proby - luminolem (hydrazid kyseliny 3-aminoftalové) na luminometru. Přidáním vzorku s antioxidačními vlastnostmi dochází k tomu, že antioxidační látky ve vzorku vychytávají peroxylový radikál a zamezují tak oxidaci luminolu. To se projeví jako pokles chemiluminiscenčního signálu na úroveň pozadí. Jakmile se antioxidační látky ve vzorku vyčerpávají, signál začíná stoupat, až dosáhne vrcholu píku a znovu se ustálí na stabilní úrovni až do vyčerpání zdroje peroxylového radikálu. Tato doba je přímo úměrná antioxidační kapacitě testované látky. Z CL křivky je jako parametr této kapacity odčítána doba dosažení 50%

původního signálu. Pro posouzení antioxidační kapacity extraktu je používáno standardní množství troloxu, který vychytává peroxylové radikály (jedna molekula troloxu neutralizuje dva peroxylové radikály). Z hodnot dosažení 1/2 píku (50% CL signál) pro daný vzorek a pro Trolox se vypočte celková antioxidační kapacita vzorku [121].

3.2.4.3 Metoda ORAC

Je fluorescenční metoda – měří přímo antioxidační kapacitu proti peroxylovému radikálu generovaného z AAPH 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihydrochlorid při 37 °C. Jako fluorescenční proba je použit fluorescein (FL). Ztráta fluorescence (FL) indikuje stupeň poškození vzorku (plazmy) z reakce s peroxylovým radikálem. Protektivní účinek antioxidantu je vyhodnocen z plochy pod naměřenou fluorescenční křivkou a je srovnán proti blanku, ve kterém není antioxidant přítomen. Jako standard je použit 1 μM Trolox. Výsledek je vyjádřen jako ekvivalent Troloxu. Fluorimeter detekuje při nastavení: excitační vlnová délka = 485 nm a emisní vlnová délka = 520 nm. Výsledné naměřené hodnoty jsou ve skutečném čase měření v minutách a jsou přepočítány (vztaženy, tedy poděleny) k počáteční hodnotě fluorescence. Poté jsou jednotky AUC spočítány dle:

$$AUC = 1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + \dots + f_n/f_0$$

$$ORAC \text{ hodnota} = [(AUC_{\text{vzorek}} - AUC_{\text{blank}})/(AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{\text{blank}})] \times (\text{molarita Troloxu/molarita vzorku})$$

3.2.4.4 Stanovení dusitanů

Dusitany (NO₂⁻) v krevní plazmě byly stanoveny spektrofotomerickou metodou při vlnové délce 546 nm po reakci plazmy s Griessovým činidlem dle [122].

3.2.4.5 ELISA

Stanovení TNF-α, TNF RI, PDGF-AB, TGF-β1, MPO a HA bylo provedeno metodou ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). ELISA je jednou z nejpoužívanějších imunologických metod sloužících k detekci protilátek a dalších látek bílkovinné povahy. Metoda funguje na bázi imunoenzymatické reakce. Tato metoda, stejně jako všechny ostatní imunochemické metody, využívá interakce antigenu se specifickými protilátkami *in vitro* za tvorby imunokomplexu antigen-protilátka. Stanovení tohoto komplexu je umožněno navázáním vhodné značky (v tomto případě enzymu) na jednoho z imunoreaktantů. ELISA využívá dvou základních vlastností imunoglobulinů (IgG_x - nejhojnější třída protilátek v krvi a tkáňovém moku savců). Za prvé je to schopnost proteinů (tedy imunoglobulinů) vázat se na povrch umělých hmot (např. na jamky Maxisorb mikrotitrační desky) a v druhé řadě pak

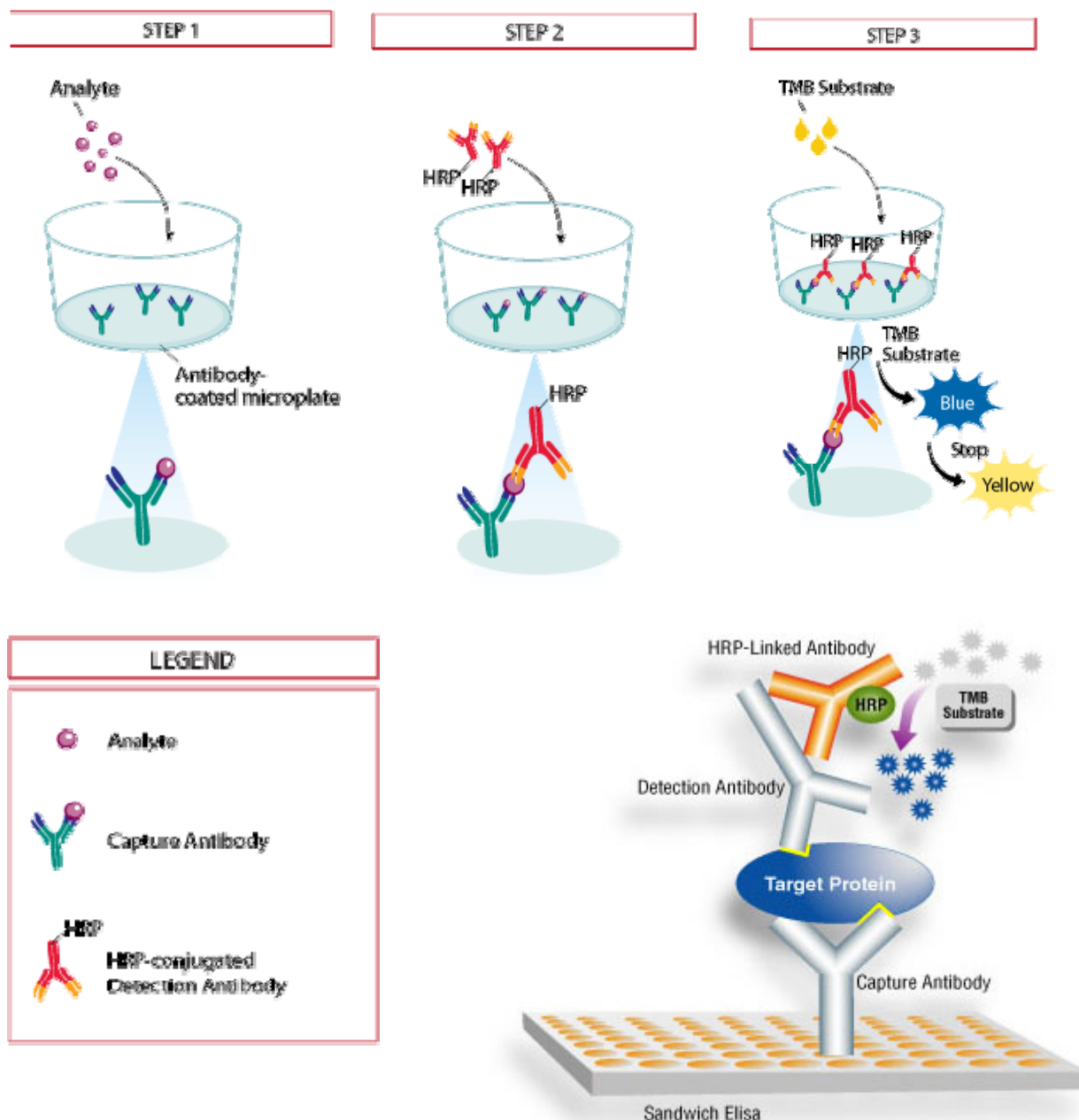
schopnost vázat enzymy na Fc fragmenty imunoglobulinových molekul. Pro průkaz specifických protilátek i antigenů existuje široké spektrum různých modifikací ELISA testu:

- *Přímá ELISA* - pro detekci antigenu.
- *Nepřímá ELISA* - pro detekci specifických protilátek.
- *Přímá sendvičová ELISA* - pro detekci antigenu.
- *Nepřímá sendvičová ELISA* - pro detekci specifických protilátek.

Základními složkami ELISA analýzy jsou:

1. *Antigen*: detekovaný v testovaném vzorku nebo známý (komerčně připravovaný).
2. *Protilátka*: detekovaná v testovaném séru nebo známá (komerčně připravovaná).
3. *Konjugát*: jedná se opět o protilátku proti protilátce (konkrétně proti druhově specifickým imunoglobulinům příslušného izotypu (proti IgG, IgM, IgA), na kterou je navázaný enzym (konjugovaná enzymem).
4. *Substrát*: je chemická látka, která reaguje s enzymem – kolorimetrická reakce.

Pro všechny zmíněné markery byla použita nepřímá sendvičová ELISA analýza a její princip je znázorněn na (*Obr. 21*).



Obr. 21 Princip metody ELISA. Převzato z [123, 124].

V prvním kroku je mikrotitrační deska potažena „Capture Antibody“ (1. protilátka), která se naadsorbuje na stěny jamek. Následně jsou do jamek přidány vzorky plazmy a standardy. Přítomný analyt je zachycen a navázán na zafixovanou 1. protilátku. Nenavázaný materiál je z jamek odmyt. V druhém kroku je do jamek přidána „Detection Antibody“ (2. protilátka) značená HRP (Horseradish Peroxidase) - křenovou peroxidázou, která se naváže na zachycený analyt. 2. protilátka, která se nenaváže, je z jamek odmyta. Ve třetím kroku je do jamek přidán TMB substrát (tetramethylbenzidin) a dojde k barevné reakci, kdy se obsah jamky zbarví modře a intenzita zbarvení je úměrná množství přítomného analytu ve vzorku.

Přídavkem kyseliny sírové je reakce analytu s TMB substrátem zastavena a dojde opět k barevné reakci, kdy se modrá zbarví ve žlutou. Finálním krokem je spektrofotometrické stanovení absorbance této žluté barvy při vlnové délce 450 nm s nastavenou referenční vlnovou délkou 575 nm [124].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie

Během jednotlivých metod ke stanovení vybraných parametrů oxidačního stresu byly používány chemikálie uvedené v Tab. 6.

Všechny reakční činidla a chemikálie, které byly použity během analýz, byly vysoké analytické čistoty. Všechna použitá organická rozpouštědla byly HPLC kvality.

Tab. 6 Seznam chemikálií použitých v jednotlivých metodách.

Metoda	Chemikálie	Výrobce
Analýza HPLC-DAD (MDA; 4-HNE)	voda CHROMASOLV [®] Plus (pro HPLC)	Sigma-Aldrich Ltd.; USA
	methanol G CHROMASOLV [®] (pro gradientovou eluci, ACS)	Sigma-Aldrich Ltd.; USA
	acetonitril CHROMASOLV [®] (pro gradientovou eluci, pro HPLC)	Sigma-Aldrich Ltd.; USA
	kyselina trichloroctová (TCA)	Fluka-Biochemika (Sigma-Aldrich Ltd.; USA)
	2,4 – dinitrofenylhydrazin (DNPH)	Lachema; ČR
	dihydrogenfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄)	Lachema; ČR
	kyselina chlorovodíková (HCl)	Penta; ČR
TRAP	roztok fosfátového pufru (PBS): hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát p.a. (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	Penta; ČR
	kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8- tetramethyl-chrome-2-karboxylová (Trolox)	Sigma-Aldrich Ltd.; USA
	2,2-azobis(2-aminopropan)- -hydrochlorid (ABAP)	Sigma-Aldrich Ltd.; USA

ORAC	3-aminoftalhydrazid (Luminol)	Sigma-Aldrich Ltd.; USA
	fluorescein disodný (FL- Na_2)	
	fosfátový pufr (75 mM směs $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ a Na_2HPO_4 ; pH 7,4)	Penta; ČR
	2,2-azobis(2-aminopropan)- -hydrochlorid (ABAP)	Sigma-Aldrich Ltd.; USA
Stanovení dusitanů v plazmě	kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8- tetramethyl-chrome-2-karboxylová (Trolox)	Sigma-Aldrich Ltd.; USA
	Griessovo činidlo	Sigma-Aldrich Ltd.; USA
	dusitan sodný (NaNO_2)	Sigma-Aldrich Ltd.; USA
	bovinné fetální sérum	Sigma-Aldrich Ltd.; USA
ELISA stanovení (TNF- α , TNF RI, PDGF-AB, TGF- β 1 hyaluronanu, myeloperoxidázy)	fosfátový pufr (PBS):	
	chlorid sodný p.a. (NaCl)	Penta; ČR
	chlorid draselný p.a. (KCl)	Lachema; ČR
	hydrogenfosforečnan disodný	Penta; ČR
	dodekahydrát p.a. ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	
	dihydrogenfosforečnan draselný p.a.	Lachema; ČR
	bovinný serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Ltd.; USA
	Tween 20 [®]	Fluka-Biochemika (Sigma-Aldrich Ltd.; USA)
	kyselina sírová p.a. (H_2SO_4 ; 95%)	Onex; ČR
	s(HS)tetramethylbenzidin substrát (s(HS) TMB substrát)	SDT; Německo
	ELISA soupravy	R&D Systems; USA
	19G8 – monoklonální protilátka	Sigma-Aldrich Ltd.; USA
	Anti-Myeloperoxidase Rabbit pAb (polyklonální)	Calbiochem; Německo

Antirabbit IgG protilátka	Sigma-Aldrich Ltd.; USA
MPO free plasma	Hytest Ltd.; Finsko
standard MPO	PNP (Planta Natural Products); Rakousko

4.2 Instrumentace

Během jednotlivých metod ke stanovení vybraných parametrů oxidačního stresu byly použity přístroje a pomůcky uvedené v Tab. 7.

Tab. 7 Seznam přístrojů použitých v jednotlivých metodách.

Metoda	Přístroj	Výrobce
Analýza HPLC-DAD (MDA; 4-HNE)	kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series with Diode Array Detector	Agilent Technologies; USA
TRAP	luminometr Orion Microplate Luminometer	Berthold; Německo
ORAC	fluorimetr Tecan INFINITE M200	SLT TECAN; Rakousko
Stanovení dusitanů v plazmě	spektrofotometr Thermo Spectra RAINBOW	SLT TECAN; Rakousko
ELISA stanovení:	promývačka SLT Labinstruments Columbus β109.000	SLT TECAN; Rakousko
Další laboratorní přístroje, pomůcky a materiál	magnetická míchačka LAVAT Chotutice MM4	LAVAT; ČR
	vortex MS 3 basic	IKA®; Německo
	centrifuga 5417 R	Eppendorf; Německo
	pH metr	HANNA Instruments; Itálie

HANNA Instruments pH 211

EDTA odběrové zkumavky
na plnou krev (7,5 ml)

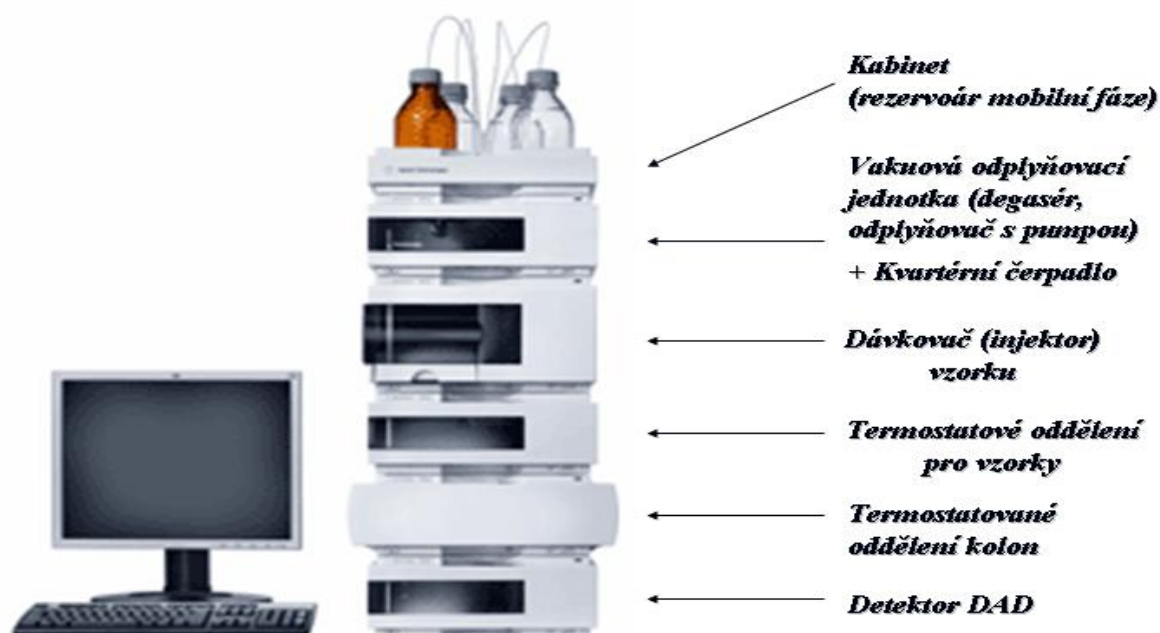
Sarstedt; Německo

SPE kolonky – DSC-C18
(50mg)

Discovery®;
Sigma-Aldrich Ltd.; USA

4.2.1 Kapalinový chromatograf Agilent Series 1100

Kapalinový chromatograf Agilent Series 1100 je zobrazen na (Obr. 22).



Obr. 22 Kapalinový chromatograf (Agilent Technologies 1100). Převzato z [125].

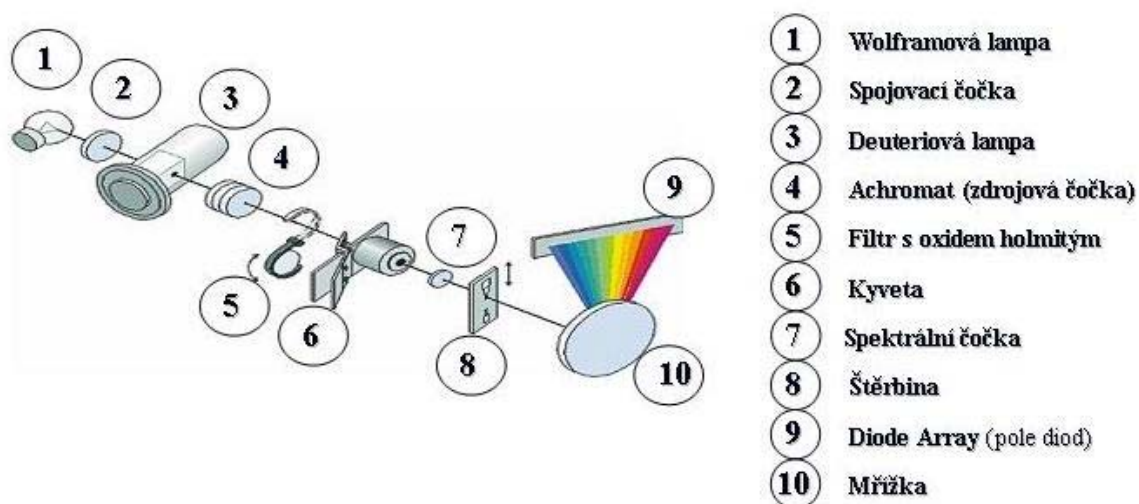
Vakuová odplyňovací jednotka – degasér obsahuje čtyřkanálový vakuový kontejner s plastickými membránami a vakuové kvartérní čerpadlo, které vytvoří ve čtyřech kanálech kontejneru podtlak. Vakuum se měří tlakovým čidlem, které zapíná a vypíná čerpadlo podle zjištěného stavu vakua. Kvartérní čerpadlo nasává rozpouštědla ze zásobních lahví v kabinetu do speciálních plastických trubkových membrán vakuového kontejneru. Průchodem těmito

trubicemi se z rozpouštědel odsávají plyny do vakua. Na výstupu z degaséru jsou rozpouštědla zbavena prakticky úplně všech rozpuštěných plynů.

Kvatérní čerpadlo obsahuje vysokorychlostní proporcionální ventil a jednotku čerpadla. Provádí gradientové mísení rozpouštědel za nízkého tlaku.

Termostatové oddělení kolon je určeno k regulaci teploty, tedy k řízenému vytápění nebo ochlazování chromatografických kolon s cílem dosáhnout co nejlepší reprodukovatelnost retenčních časů.

Spektrofotometrický detektor Diode-Array (DAD) je schopen kontinuálně sledovat celé spektrum UV-VIS v rozmezí vlnových délek 190 – 950 nm. Neboť pracuje s deuteriovou (pro UV oblast), s wolframovou lampou (pro VIS oblast a blízkou infračervenou oblast). Tyto lampy s vysokou intenzitou zajišťují nízké detekční limity. Principem metody HPLC-DAD je detekovaná absorbance stanoveného analytu. Schéma optického systému DAD je uvedeno na (Obr. 23) [126].



Obr. 23 Optický systém DAD. Převzato z [125].

4.3 Charakteristika pacientů s CHP

Do naší studie bylo zahrnuto 113 pacientů s chronickou pankreatitidou, kteří jsou stálými pacienty Interní hepatogastroenterologické kliniky Fakultní nemocnice Brno (Lékařské fakulty MU Brno) a 63 zdravých jedinců jako kontrolních subjektů. Soubor pacientů sestává z 39 žen a 74 mužů průměrného věku $47,6 \pm 12,5$ let. Etiologie pacientů byla 90 případů s idiopatickou formou CHP, 22 případů s alkoholickou CHP a 1 případ s hereditární formou CHP. U všech pacientů bylo provedeno endosonografické vyšetření pankreatu a dle stupně závažnosti poškození pankreatu lze pacienty rozřadit na 73 případů s lehkou CHP a 40 případů s těžkou CHP. Kontrolní skupina sestávala z 42 žen a 21 mužů průměrného věku $41,6 \pm 9,9$ let. Tato studie byla schválena Institucionální etickou komisí Fakultní nemocnice v Brně, ČR a od všech účastníků studie byl získán souhlas s poskytováním informací o získaných výsledcích.

4.4 Odběr plazmy pacientům s CHP a kontrolním jedincům

Plná krev byla odebírána pacientům a všem kontrolním jedincům z loketní žíly do odběrových EDTA zkumavek (Sarstedt, Germany). Vzorky plné krve byly ihned centrifugovány (5 000 G, při pokojové teplotě, po dobu 10 min), získaná plazma byla odebrána, alikvotně rozplněna do plastových mikrozkušavek (Eppendorf, Německo; s přísadkou 1,96 mM BHT pro stabilizaci vzorku plazmy pro analýzu HPLC-DAD), okamžitě zamrzena v tekutém dusíku a následně uchovávána při teplotě -80°C až do následných analýz.

U pacientů s CHP bylo provedeno celkem pět odběrů, přičemž časový interval mezi jednotlivými odběry činil vždy šest měsíců.

Současně byla pacientům a všem kontrolním jedincům z loketní žíly odebírána také krev na základní biochemické vyšetření a krevní obraz. Tyto parametry byly stanoveny standardními analýzami v laboratořích Interní hepatogastroenterologické kliniky Fakultní nemocnice Brno. Po odborné konzultaci byly vybrány následující parametry, které jsou rozhodující v zánětlivém procesu CHP a to: z hematologických parametrů - leukocyty (WBC = White blood cells) a z biochemických parametrů - pankreatická amyláza (PAMS), amyláza (AMS), CB protein, cholesterol, triglyceridy (TG), HDL-cholesterol (HDL-chol), LDL-cholesterol (LDL-chol) a C-reaktivní protein (CRP). Tyto hematologické a biochemické parametry byly vyhodnoceny a porovnány s kontrolními jedinci a s markery oxidačního stresu ovlivňujícího průběh CHP.

4.5 Stanovení malondialdehydu (MDA) A 4-hydroxynonenalu (4-HNE) metodou HPLC-DAD

Produkty lipidové peroxidace – MDA a 4-HNE v plazmě pacientů s chronickou pankreatitidou a u kontrolních jedinců byly stanoveny metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie se spektrofotometrickým UV-VIS detektorem Diode-Array (HPLC-DAD) na kapalinovém chromatografu Agilent Series 1100 (viz. Kap. 4.2.1, Obr. 22). Použitá metoda

stanovení MDA a 4-HNE na HPLC-DAD byla převzata z primárního zdroje [83]. Byla optimalizována a aplikována s malými modifikacemi na naše laboratorní možnosti a podmínky. Principem metody je stanovení absorbance derivatizačního produktu MDA-DNPH při vlnové délce 310 nm a 4-HNE-DNPH při vlnové délce 350 nm.

4.5.1 Předpříprava plazmy

Plazma pacientů s chronickou pankreatitidou byla deproteinizována (15% TCA) a hydrolyzována kyselinou chlorovodíkovou (HCl). Tato reakční směs byla inkubována ve vodní lázni při 60 °C po dobu 40 min. Poté byla centrifugována (16 000G, 4 °C, 10 min) a získaný supernatant byl následně použit k analýze na HPLC-DAD.

4.5.2 Analýza HPLC-DAD

100 µl nebo 200 µl reakčního činidla DNPH (5 mM DNPH/2 M HCl) bylo přidáno k 600 µl supernatantu pro vznik derivatizačních produktů MDA-DNPH nebo k 1 000 µl supernatantu pro vznik derivatizačních produktů 4-HNE-DNPH. Tato reakční směs byla inkubována po dobu 60 min při laboratorní teplotě bez přístupu světla. 4-HNE-DNPH produkty byly extrahovány pomocí SPE kolonek (DSC-C18; 50 mg; Discovery®; Sigma-Aldrich Ltd.; USA), které bylo nutno nejdříve kondicionovat 1 ml methanolu (G CHROMASOLV®; Sigma-Aldrich Ltd.; USA) a poté 1 ml 25 mM KH₂PO₄ pro potvrzení kyselé matrice vzorku supernatantu o pH 3. Zakoncentrované 4-HNE-DNPH produkty byly eluovány 300 µl acetonitrilu (CHROMASOLV®; Sigma-Aldrich Ltd.; USA). Poté byly použity stejně jako produkty MDA-DNPH, které nebylo nutno zakoncentrovávat, pro přímý nástřik na kolonu Cogent™ Bidentate C18 (4,2 µm, 4,6 x 150 mm, I.D.) s předkolonkou MetaGuard Polaris-C18 (5 µm, 4,6 mm). Základní složení mobilní fáze (MF) bylo acetonitril (CHROMASOLV®; Sigma-Aldrich Ltd.; USA) - voda CHROMASOLV® Plus; Sigma-Aldrich Ltd.; USA) – 0,2 % kyselina octová. Podmínky separace obou DNPH-derivátů aldehydů (MDA-DNPH and 4-HNE-DNPH) jsou uvedeny v Tab. 8.

Tab. 8 Podmínky stanovení MDA (MDA-DNPH) a 4-HNE (4-HNE-DNPH).

Parametr	MDA (MDA-DNPH)	4-HNE (4-HNE-DNPH)
Průtok MF	1 ml.min ⁻¹	1 ml.min ⁻¹
Eluce	izokratická	gradientová
Složení MF	40 : 60 : 0,1 v/v/v (ACN : H ₂ O : CH ₃ COOH)	50 : 50 : 0,2 v/v/v (ACN : H ₂ O : CH ₃ COOH) (gradient: 0 min: 50 : 50 : 0,2 v/v/v 20 min: 80 : 20 : 0,2 v/v/v)
Teplota na koloně	30 °C	30 °C
Temperování vzorků	20 °C	20 °C
Nástřik na kolonu	100 µl	100 µl
Vlnová délka	310 nm	350 nm

Koncentrace MDA a 4-HNE byly vyhodnoceny z odečtených ploch příslušných píků chromatogramů za použití externí kalibrace. Kalibrační křivka standardů MDA byla v koncentracích : 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 40 a 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Kalibrační křivka standardů 4-HNE byla v koncentracích : 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 5; 10; 20; 25; 50 a 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Koncentrace MDA a 4-HNE v plazmě byly vyjádřeny v jednotkách $\mu\text{mol.l}^{-1}$.

4.6 Antioxidační kapacita plazmy

4.6.1 Metoda TRAP

Reakční směs – 160 μl PBS, 16,8 μl luminolu a 6,8 μl vzorku plazmy/standardu Troloxu byla preinkubována v luminometru při 37 °C. Po inkubaci bylo do reakční směsi přidáno 16,8 μl ABAPU. ABAP se začne tepelně rozkládat a produkovat peroxylový radikál. Antioxidační látky ve vzorku začnou vychytávat peroxylový radikál a zamezují oxidaci luminolu. Vyhodnocení antioxidační kapacity z luminiscenční křivky je popsán v Kap. 3.2.4.2. Pro získání hodnoty TRAPu jsme použili následující výpočet: $\frac{1}{2}$ pík-time vzorku / $\frac{1}{2}$ pík-time Troloxu * koeficient (dle objemu vzorku – v našem případě koeficient činí 800). Pro odečtení $\frac{1}{2}$ pík-timu byl použit program a funkce makra. Jako kontrola slouží samotný ABAP, který je odečítán od vzorků plazmy. Koncentrace antioxidační kapacity plazmy byly vyjádřeny v jednotkách $\mu\text{mol.l}^{-1}$.

4.6.2 Metoda ORAC

Reakční směs – 170 μl FL- Na_2 ($6,3 \cdot 10^{-2}$ $\mu\text{mol.l}^{-1}$) a 10 μl vzorku plazmy/standardu Troloxu byla preinkubována ve fluorimetru Tecan INFINITE M200 (SLT TECAN; Rakousko) při 37 °C. Byl změřen optimální „gain“ fluorimetru pro analyzované vzorky plazmy a po přidavku 20 μl ABAPU bylo zahájeno měření vzorků. Jako negativní kontrola sloužilo 200 μl fosfátového pufru bez přidavku ABAPU a jako pozitivní kontrola sloužilo 170 μl FL ($6,3 \cdot 10^{-2}$ $\mu\text{mol.l}^{-1}$) s 30 μl fosfátového pufru také bez přidavku ABAPU. Jako blank sloužila reakční směs - 170 μl FL ($6,3 \cdot 10^{-2}$ $\mu\text{mol.l}^{-1}$), 10 μl fosfátového pufru a 20 μl ABAPU. Kalibrační křivka standardů Troloxu byla v koncentracích: 12,5; 25; 50; 100 a 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Měření trvalo 60 min a každou minutu byla změřena fluorescence vzorků. Vyhodnocení antioxidační kapacity vzorků z fluoroscenční křivky je popsán v Kap. 3.2.4.3, přičemž je do vyhodnocení zahrnuta i externí kalibrace Troloxu. Koncentrace antioxidační kapacity plazmy byly vyjádřeny v jednotkách $\mu\text{mol.l}^{-1}$.

4.6.3 Porovnání antioxidační kapacity metodou TRAP a ORAC

V rámci aplikací metod určených k analýze oxidačního stresu jsme srovnali metodu TRAP a ORAC v biologickém materiálu. Oběma těmito metodami byla stanovena a porovnána antioxidační kapacita ve 108 vzorcích plazmy pacientů s CHP z I. odběru. Po vyhodnocení a porovnání dat bylo zřejmé, že metoda TRAP je citlivější ve srovnání s metodou ORAC. **Proto byla v dalších analýzách používána pouze metoda TRAP.**

4.7 Stanovení dusitanů

Vzorky plazmy byly deproteinizovány centrifugací (16 000 G, při laboratorní teplotě, 15 min) a následně ihned pipetovány do mikrotitrační desky. Reakční směs – 150 μl deproteinizovaného vzorku plazmy/standardu NaNO_2 a 150 μl Griessova činidla (Sigma-Aldrich Ltd.; USA) byla inkubována při pokojové teplotě po dobu 30 min v temnu a poté byla změřena absorbance vzorků na spektrofotometru Thermo Spectra RAINBOW (SLT TECAN; Rakousko) při vlnové délce 546 nm. Koncentrace dusitanů ve vzorcích plazmy byly vyhodnoceny pomocí externí kalibrace. Kalibrační křivka standardu NaNO_2 byla ředěna v bovinném fetálním séru v koncentracích: 0; 0,41; 0,81; 1,63; 3,25; 6,5; 13 a 26 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Koncentrace dusitanů v plazmě byly vyjádřeny v jednotkách $\mu\text{mol.l}^{-1}$.

4.8 ELISA

Metodou ELISA bylo provedeno stanovení $\text{TNF-}\alpha$, TNF RI , PDGF-AB , $\text{TGF-}\beta 1$, MPO a HA v krevní plazmě. Na příslušné cytokiny, receptor a HA byly použity komerčně vyrobené ELISA soupravy (R&D Systems; USA) a postupovalo se dle přiložených protokolů od firmy R&D Systems. Princip těchto stanovení byl popsán v Kap. 3.2.4.5. Koncentrace $\text{TNF-}\alpha$, TNF RI , PDGF-AB , $\text{TGF-}\beta$ a HA ve vzorcích plazmy byly vyhodnoceny pomocí externí kalibrace. Kalibrační křivka standardu $\text{TNF-}\alpha$ byla ředěna v koncentracích: 0; 2,5; 5; 10; 30; 90; 270 a 540 pg.ml^{-1} . Kalibrační křivka standardu TNF RI byla ředěna v koncentracích: 0; 20; 40; 80; 160; 320; 640 a 960 pg.ml^{-1} . Kalibrační křivka standardu PDGF-AB byla ředěna v koncentracích: 0; 10,4; 20,8; 41,7; 83,3; 166,7; 333,3 a 500 pg.ml^{-1} . Kalibrační křivka standardu $\text{TGF-}\beta 1$ byla ředěna v koncentracích: 0; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1 000 a 2 000 pg.ml^{-1} . Kalibrační křivka standardu HA byla ředěna v koncentracích: 0; 8,8; 13,2; 19,8; 29,6; 44,4; 66,7 a 100 ng.ml^{-1} .

Pouze stanovení MPO vyžadovalo optimalizaci ELISA protokolu, neboť nebylo provedeno komerčně zakoupenou soupravou. Princip stanovení zůstává stejný viz. popis v Kap. 3.2.4.5, přičemž jako „Capture Antibody“ byla použita 19G8 – monoklonální protilátka (Sigma-Aldrich Ltd.; USA) v koncentraci 3,3 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, jako „Detection Antibody“ byla použita Anti-Myeloperoxidase Rabbit pAb (polyklonální; Calbiochem; Německo) v koncentraci 6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a na místo Streptavidinu-HRP byla použita 3. protilátka Antirabbit IgG protilátka (Sigma-Aldrich Ltd.; USA) v koncentraci 5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Koncentrace MPO ve

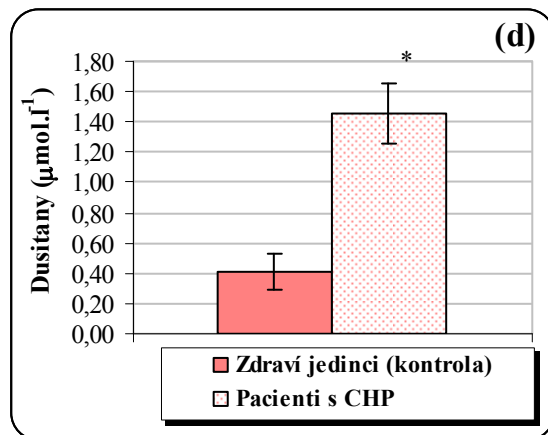
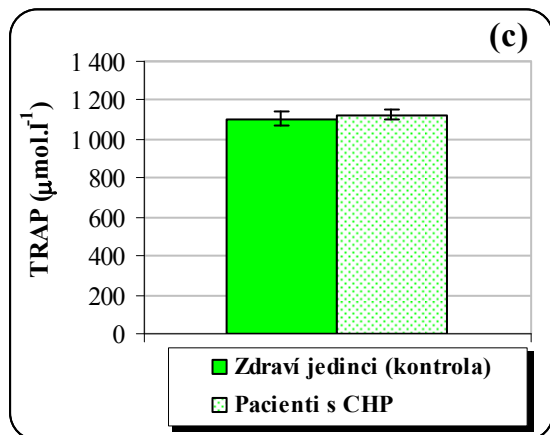
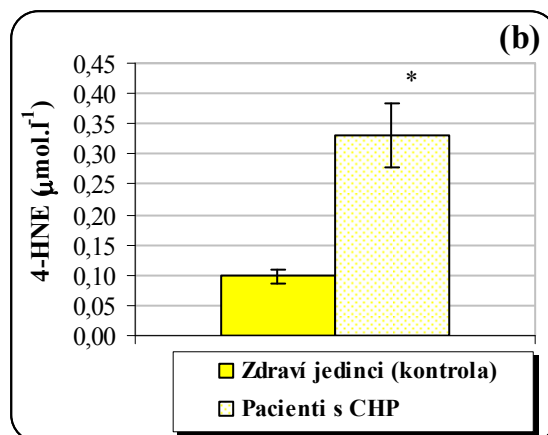
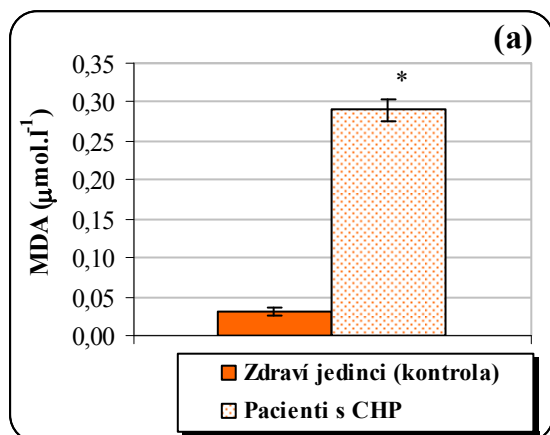
vzorcích plazmy byly vyhodnoceny pomocí externí kalibrace. Kalibrační křivka standardu MPO byla ředěna v MPO free séru (v bezmyeloperoxidázovém séru) v koncentracích: 0; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 a 20 ng.ml⁻¹. Koncentrace MPO, HA a všech ostatních cytokinů a receptoru v plazmě byly vyjádřeny v jednotkách ng.ml⁻¹.

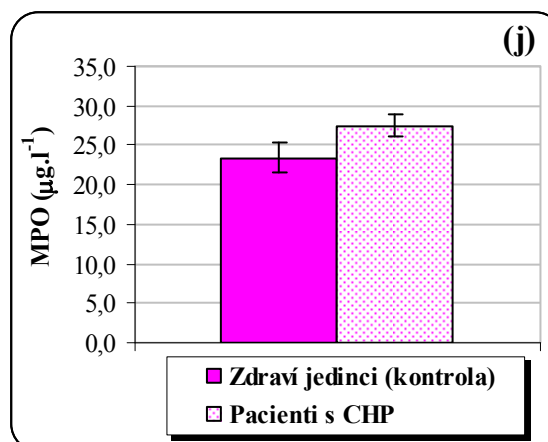
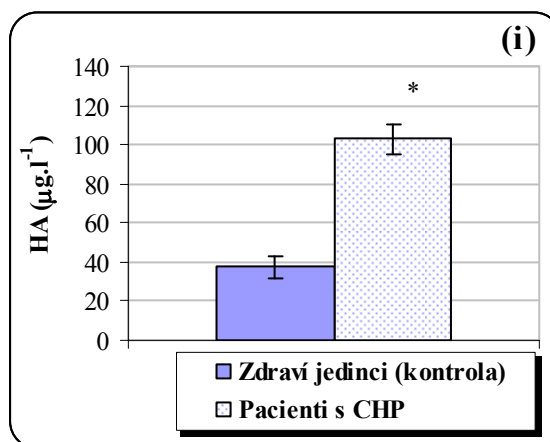
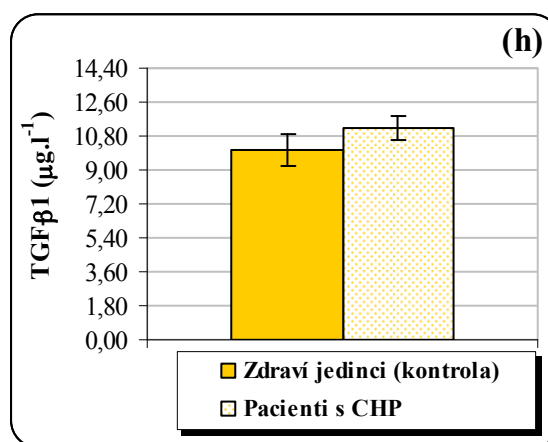
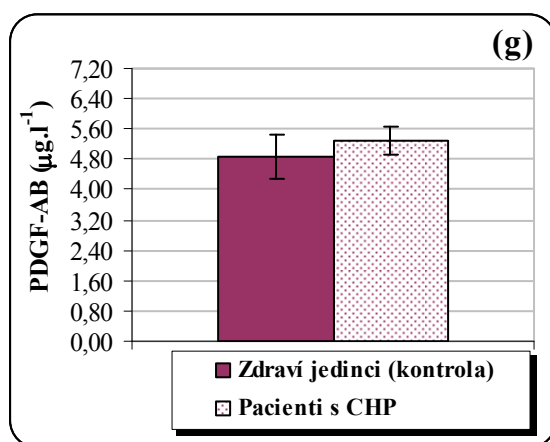
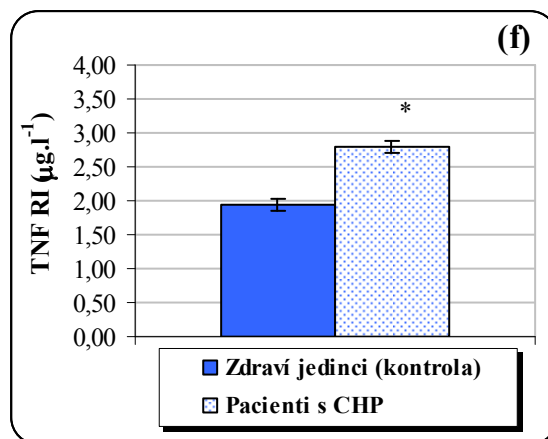
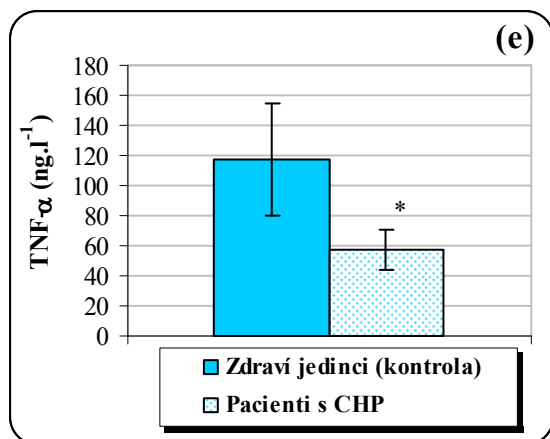
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Na (Obr. 24 – 47) byly graficky znázorněny nejvýznamnější imunologické, biochemické a hematologické výsledky z hlediska oxidačního stresu a chronického zánětu u pacientů s CHP. Přehled všech analyzovaných parametrů je uveden v **Tabulkách 9 - 14**.

5.1 I. odběr pacientů s chronickou pankreatitidou

Odběry krve souboru 108 pacientů s CHP byly uskutečněny během 10 dnů na Interní hepatogastroenterologické klinice Fakultní nemocnice Brno (Lékařská fakulta MU Brno). První odběry probíhaly na přelomu června a července 2007. V následujícím grafickém vyhodnocení jsou znázorněny hodnoty (průměr $\pm$ S.E.M.) jednotlivých markerů oxidačního stresu a zánětu v plazmě pacientů s CHP v I. odběru v porovnání s hodnotami (průměr $\pm$ S.E.M.) zdravých jedinců (kontrol) (Obr. 24 (a-j)). Data byla statisticky analyzována *Studentovým t-testem*. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.



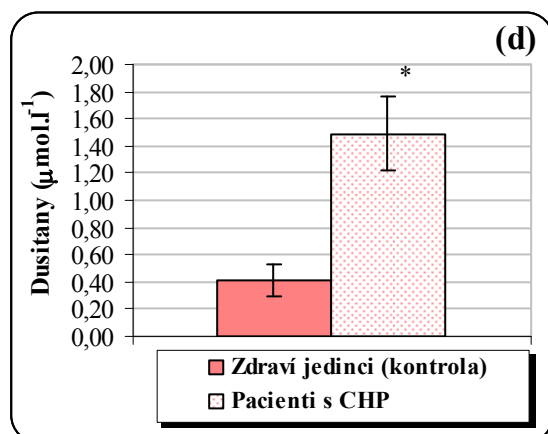
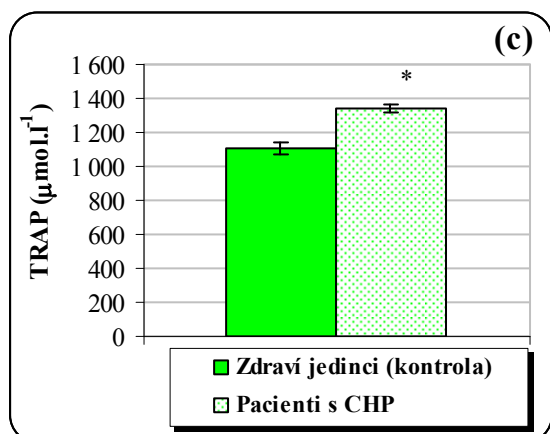
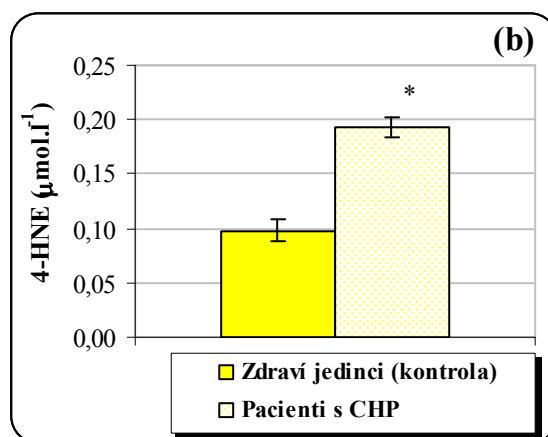
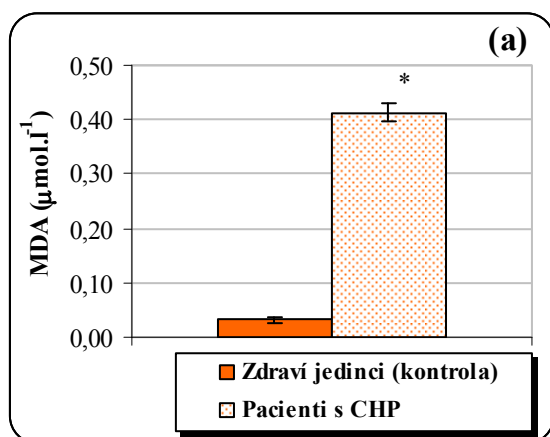


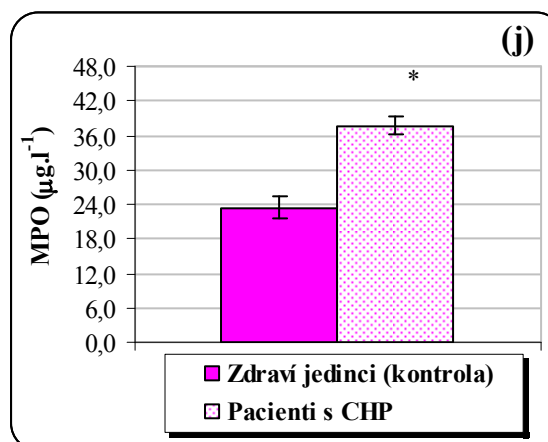
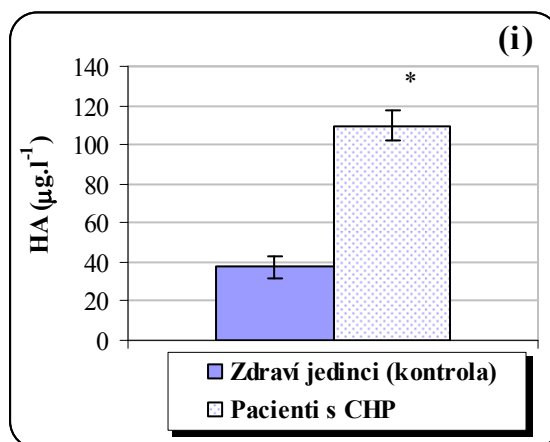
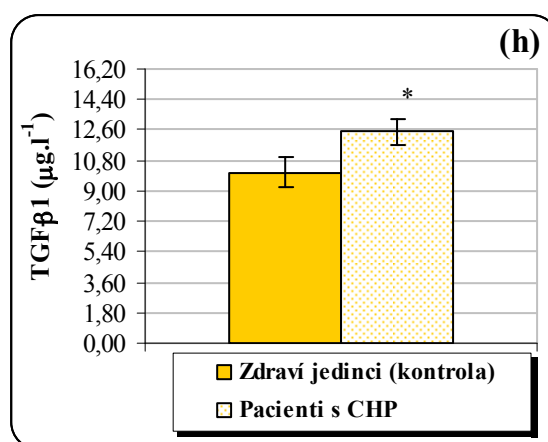
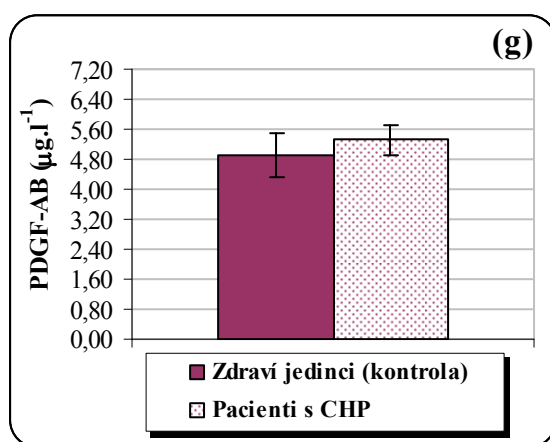
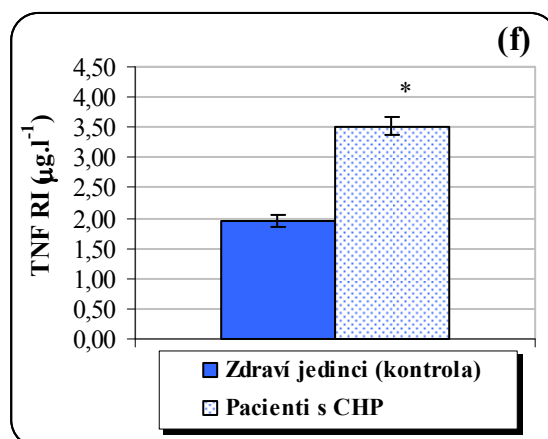
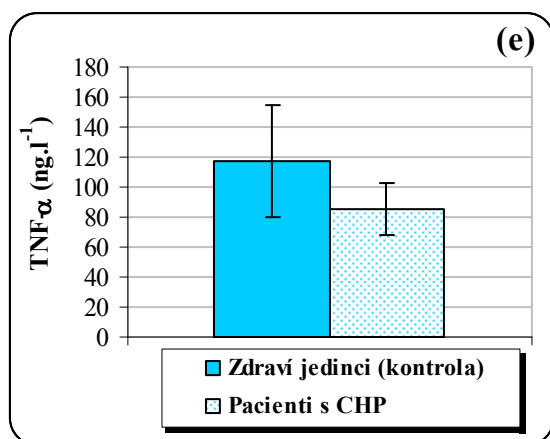
Obr. 24 (a-j) Koncentrace MDA, 4-HNE, TRAP, dusitanů, TNF-α, TNF RI, PDGF-AB, TGF-β1, HA a MPO v plazmě (I. odběr). Znázorněná data představují průměrné hodnoty ± S.E.M. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.

Koncentrace MDA, 4-HNE, dusitanů, TNF RI a HA byly významně zvýšeny ve srovnání s kontrolou. Pouze mírně, statisticky nevýznamně vyšší koncentrace v porovnání s kontrolou vykazovaly parametry TRAP, PDGF-AB, TGF- β 1 a MPO. Naopak koncentrace prozánětlivého cytokinu TNF- α byla významně nižší ve srovnání s kontrolou.

5.2 II. odběr pacientů s chronickou pankreatitidou

Odběry krve souboru 110 pacientů s CHP byly uskutečněny během 10 dnů na Interní hepatogastroenterologické klinice Fakultní nemocnice Brno (Lékařská fakulta MU Brno). Druhé odběry probíhaly v lednu 2008. V následujícím grafickém vyhodnocení jsou znázorněny hodnoty (průměr $\pm$ S.E.M.) jednotlivých markerů oxidačního stresu a zánětu v plazmě pacientů s CHP ve II. odběru v porovnání s hodnotami (průměr $\pm$ S.E.M.) zdravých jedinců (kontrol) (Obr. 25 (a-j)). Data byla statisticky analyzována *Studentovým t-testem*. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.





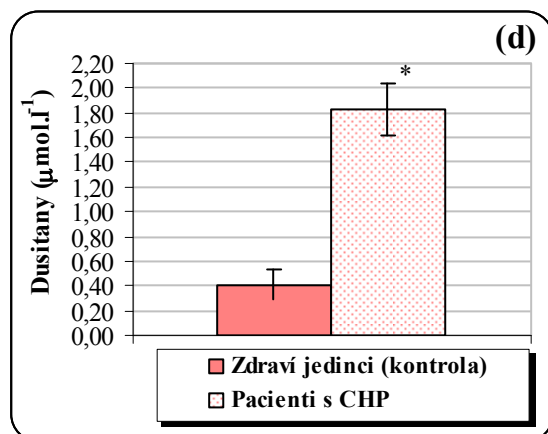
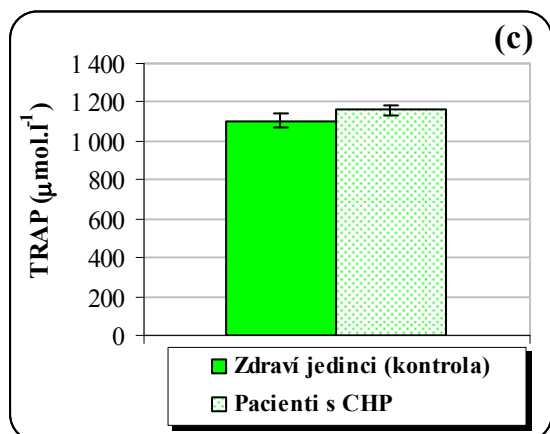
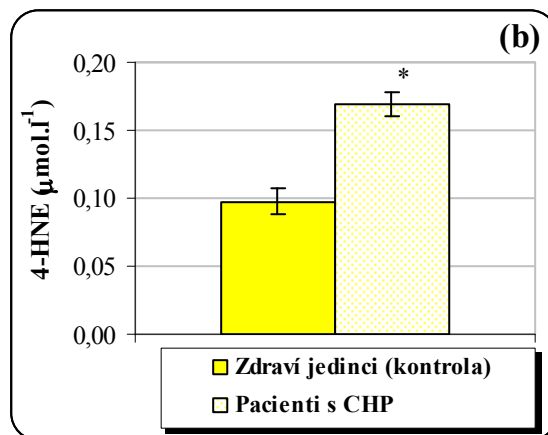
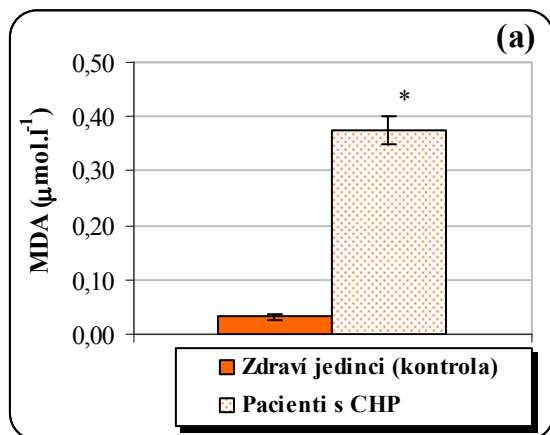
Obr. 25 (a-j) Koncentrace MDA, 4-HNE, TRAP, dusitanů, TNF-α, TNF RI, PDGF-AB, TGF-β1, HA a MPO v plazmě (II. odběr). Znázorněná data představují průměrné hodnoty ± S.E.M. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.

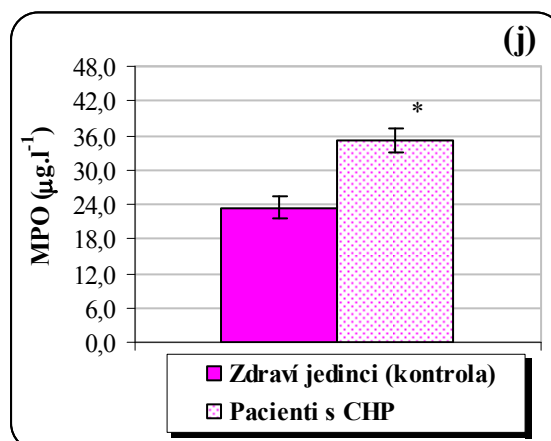
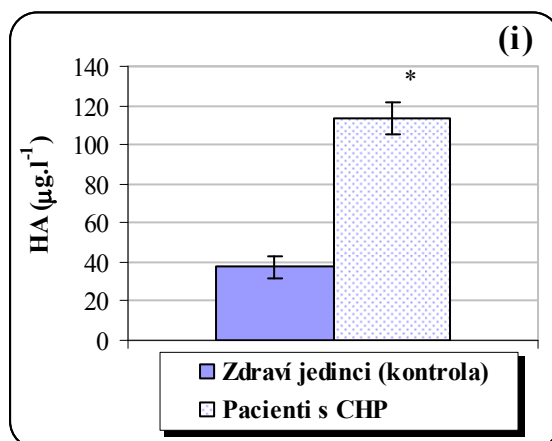
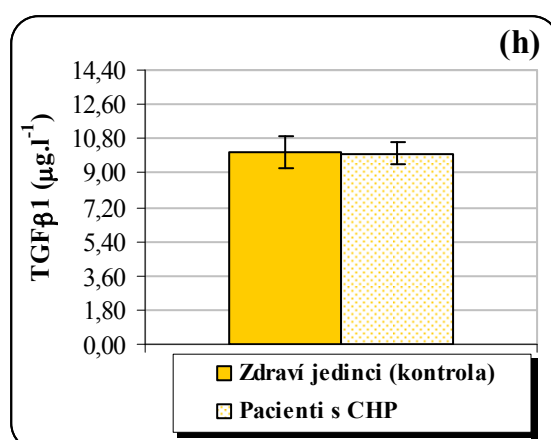
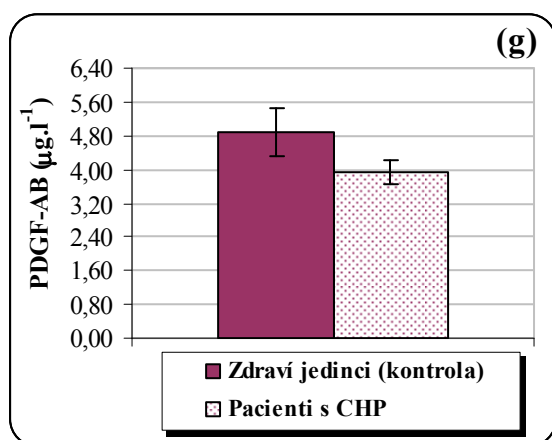
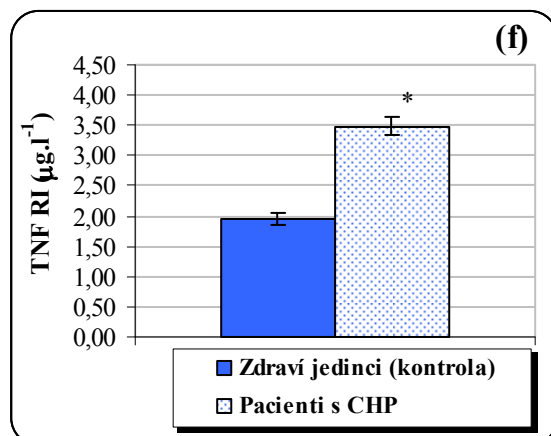
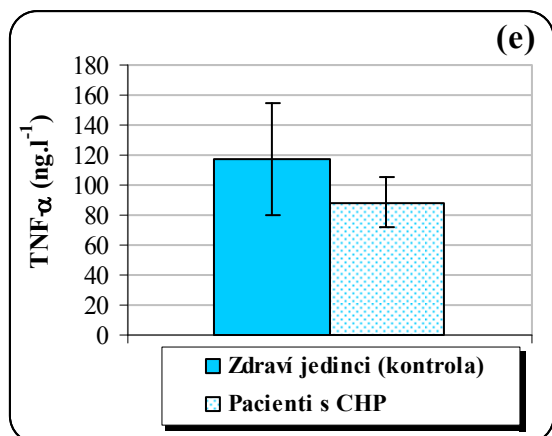
Koncentrace MDA, 4-HNE, TRAP, dusitanů, TNF RI, TGF-β1, HA a MPO byly významně zvýšeny v porovnání s kontrolou. Nevýznamně vyšší koncentraci ve srovnání

s kontrolou vykazoval parametr PDGF-AB. Naopak koncentrace prozánětlivého markeru TNF- α byla nevýznamně nižší ve srovnání s kontrolou.

5.3 III. odběr pacientů s chronickou pankreatitidou

Odběry krve souboru 104 pacientů s CHP byly uskutečněny během 10 dnů na Interní hepatogastroenterologické klinice Fakultní nemocnice Brno (Lékařská fakulta MU Brno). Třetí odběry probíhaly na přelomu června a července 2008. V následujícím grafickém vyhodnocení jsou znázorněny hodnoty (průměr $\pm$ S.E.M.) jednotlivých markerů oxidačního stresu a zánětu v plazmě pacientů s CHP ve III. odběru v porovnání s hodnotami (průměr $\pm$ S.E.M.) zdravých jedinců (kontrol) (*Obr. 26 (a-j)*). Data byla statisticky analyzována *Studentovým t-testem*. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.





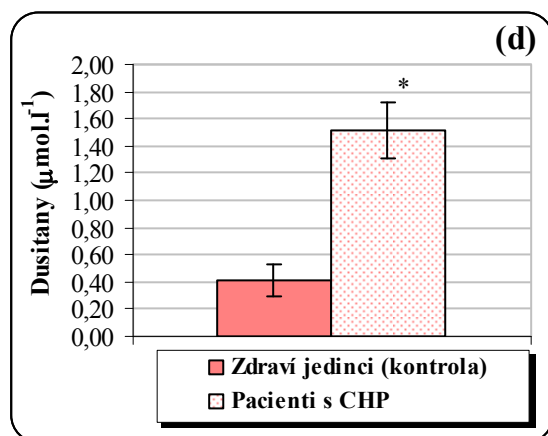
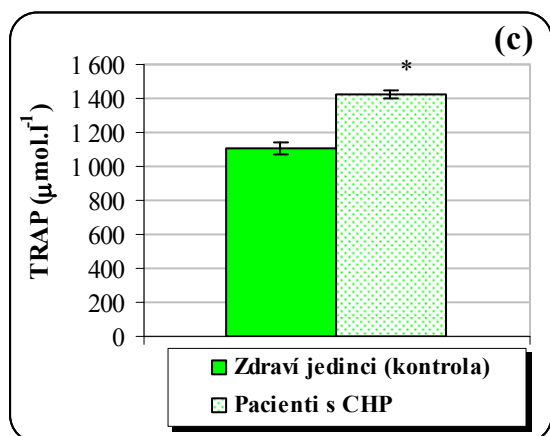
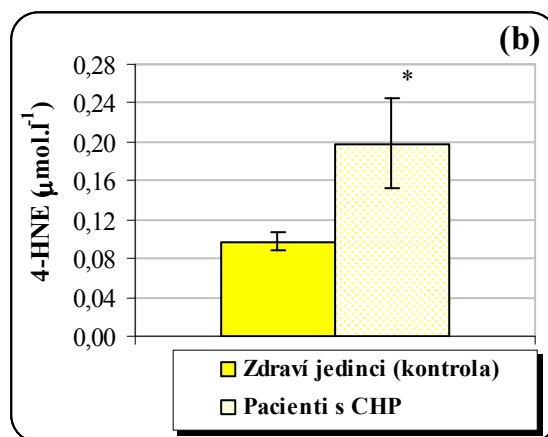
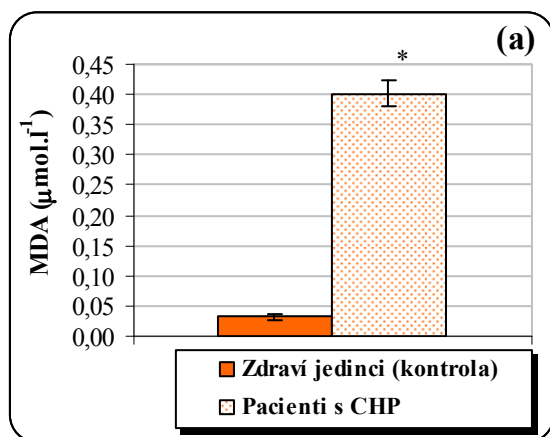
Obr. 26 (a-j) Koncentrace MDA, 4-HNE, TRAP, dusitanů, TNF-α, TNF RI, PDGF-AB, TGFβ1, HA a MPO v plazmě (III. odběr). Znáznorněná data představují průměrné hodnoty ± S.E.M. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.

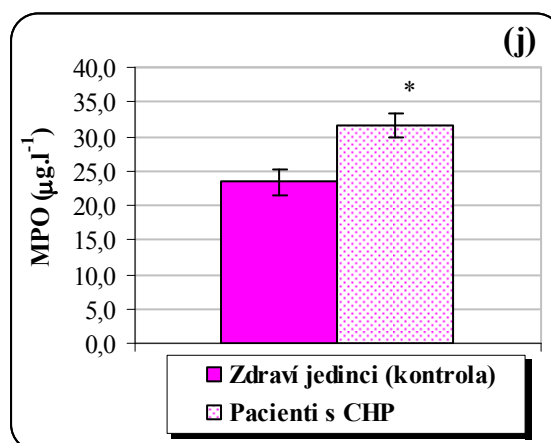
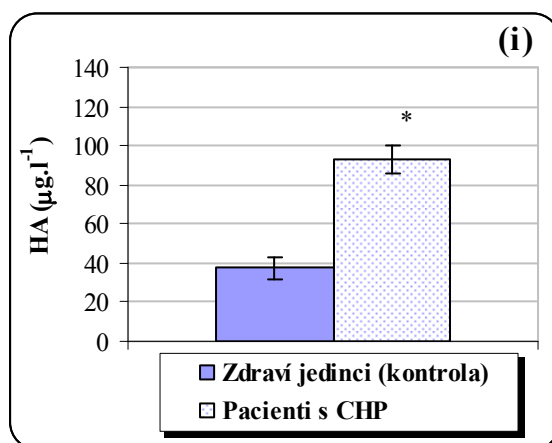
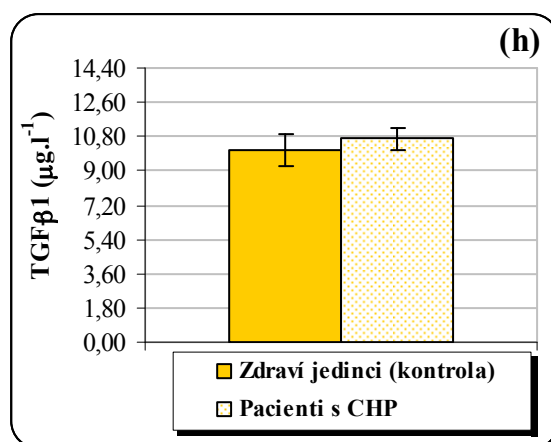
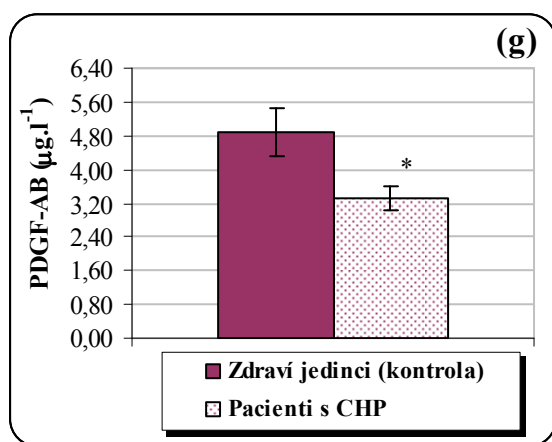
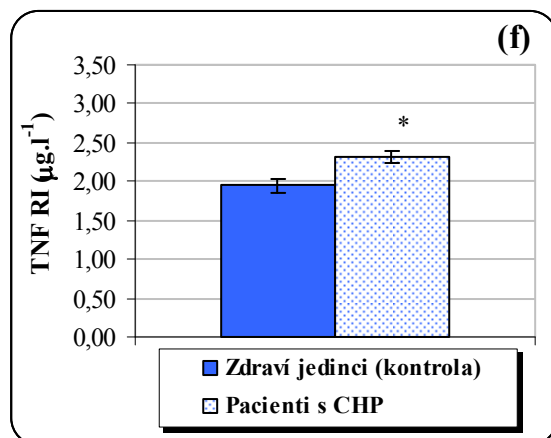
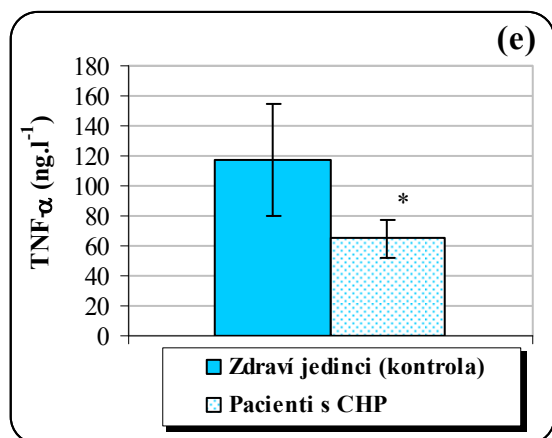
Významně zvýšené hladiny v porovnání s kontrolou byly u parametrů MDA, 4-HNE, dusitanů, TNF RI, HA a MPO. Pouze mírně zvýšenou koncentraci ve srovnání s kontrolou

vykazoval parametr TRAP. Koncentrace cytokinu TGF- β 1 byla na srovnatelné hladině jako zdraví jedinci. Koncentrace prozánětlivého cytokinu TNF- α společně s růstovým cytokinem PDGF-AB byly u pacientů s CHP mírně nižší ve srovnání s kontrolou.

5.4 IV. odběr pacientů s chronickou pankreatitidou

Odběry krve souboru 102 pacientů s CHP byly uskutečněny během 10 dnů na Interní hepatogastroenterologické klinice Fakultní nemocnice Brno (Lékařská fakulta MU Brno). Čtvrté odběry probíhaly v lednu 2009. V následujícím grafickém vyhodnocení jsou znázorněny hodnoty (průměr $\pm$ S.E.M.) jednotlivých markerů oxidačního stresu a zánětu v plazmě pacientů s CHP ve IV. odběru v porovnání s hodnotami (průměr $\pm$ S.E.M.) zdravých jedinců (kontrol) (Obr. 27 (a-j)). Data byla statisticky analyzována *Studentovým t-testem*. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.



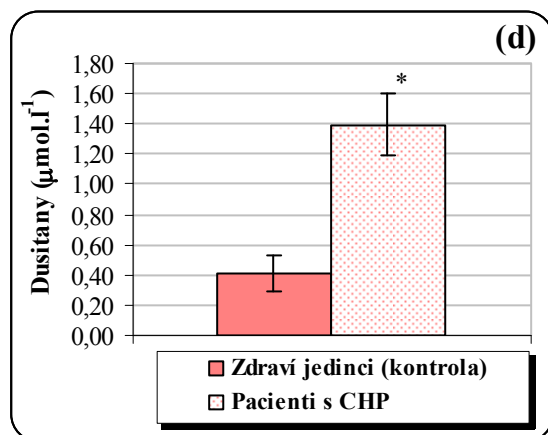
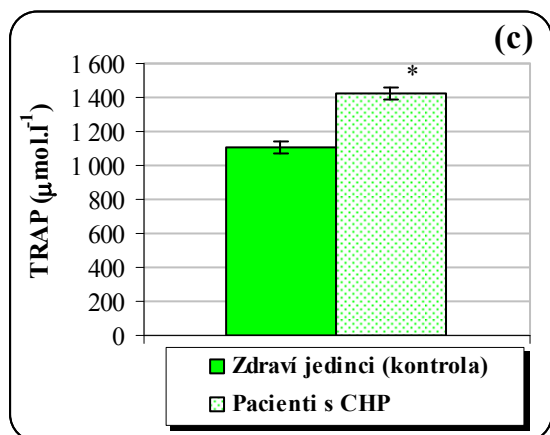
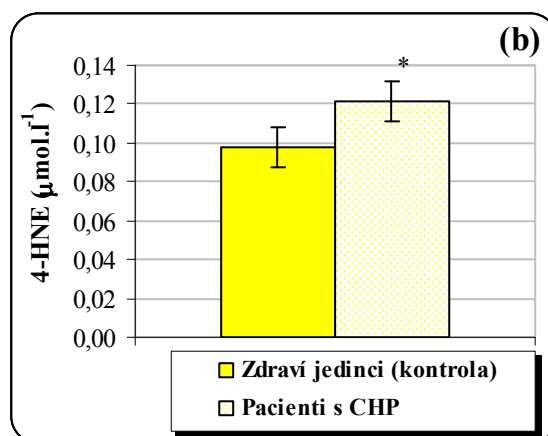
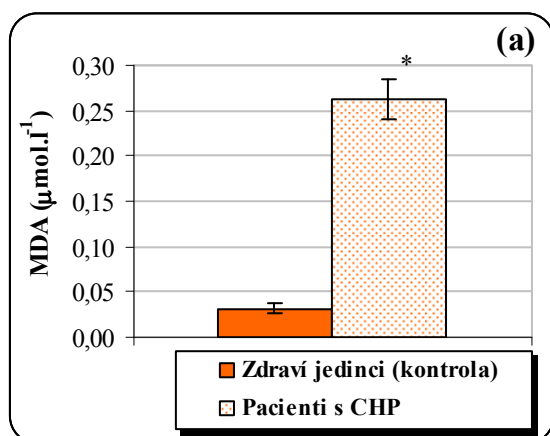


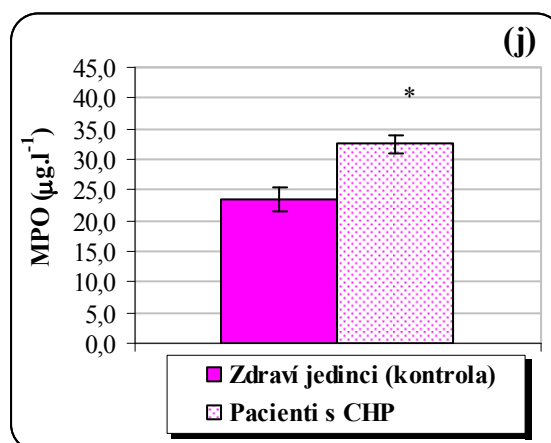
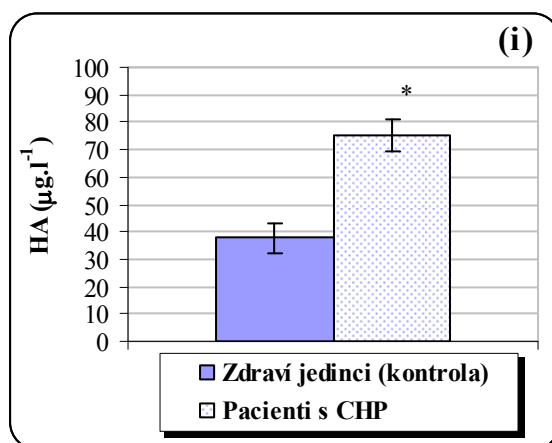
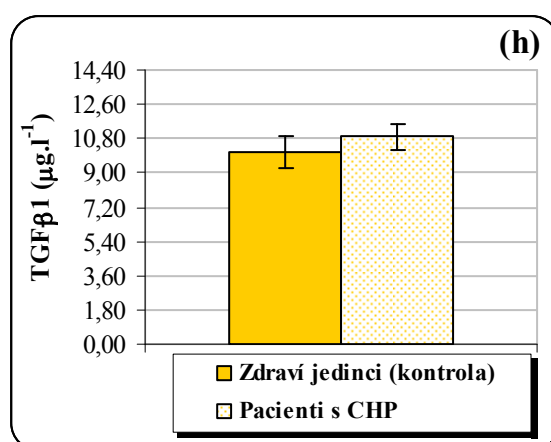
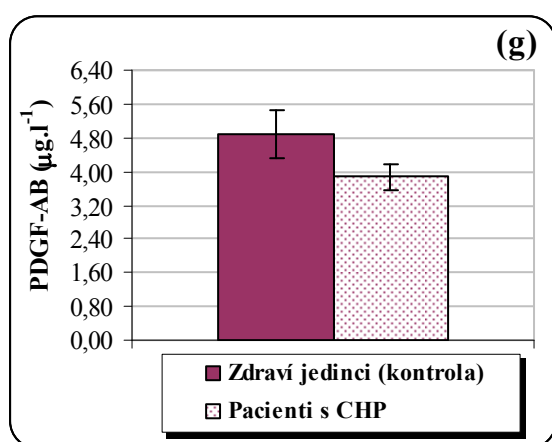
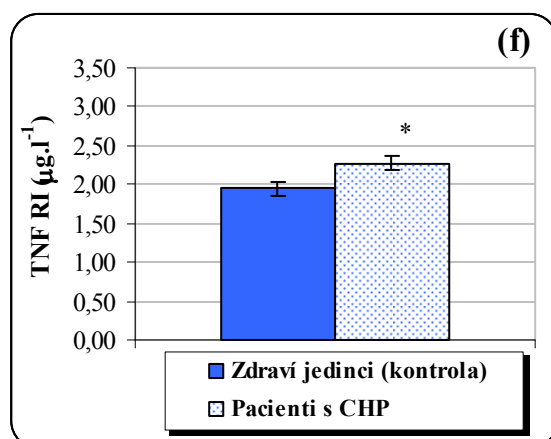
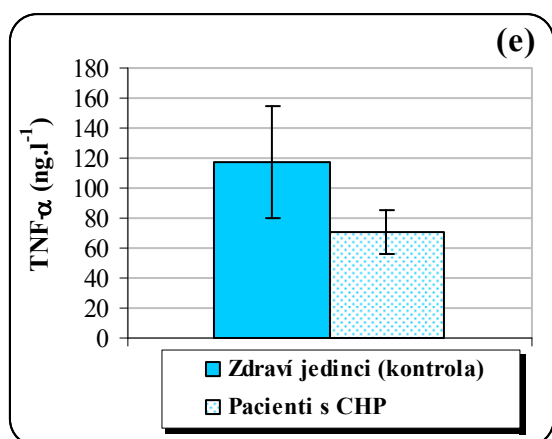
Obr. 27 (a-j) Koncentrace MDA, 4-HNE, TRAP, dusitanů, TNF-α, TNF RI, PDGF-AB, TGF-β1, HA a MPO v plazmě (IV. odběr). Znáznorněná data představují průměrné hodnoty ± S.E.M. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.

Koncentrace MDA, 4-HNE, TRAP, dusitanů, TNF RI, HA a MPO byly významně zvýšeny v porovnání s kontrolou. Koncentrace cytokinu TGF- β 1 v plazmě pacientů s CHP byla opět na srovnatelné hladině se zdravými jedinci. Hladiny prozánětlivého cytokinu TNF- α společně s růstovým cytokinem PDGF-AB byly u pacientů s CHP významně nižší ve srovnání s kontrolou.

5.5 V. odběr pacientů s chronickou pankreatitidou

Odběry krve souboru 93 pacientů s CHP byly uskutečněny během 10 dnů na Interní hepatogastroenterologické klinice Fakultní nemocnice Brno (Lékařská fakulta MU Brno). Páté odběry probíhaly na přelomu června a července 2009. V následujícím grafickém vyhodnocení jsou znázorněny hodnoty (průměr $\pm$ S.E.M.) jednotlivých markerů oxidačního stresu a zánětu v plazmě pacientů s CHP v V. odběru v porovnání s hodnotami (průměr $\pm$ S.E.M.) zdravých jedinců (kontrol) (Obr. 28 (a-j)). Data byla statisticky analyzována *Studentovým t-testem*. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.



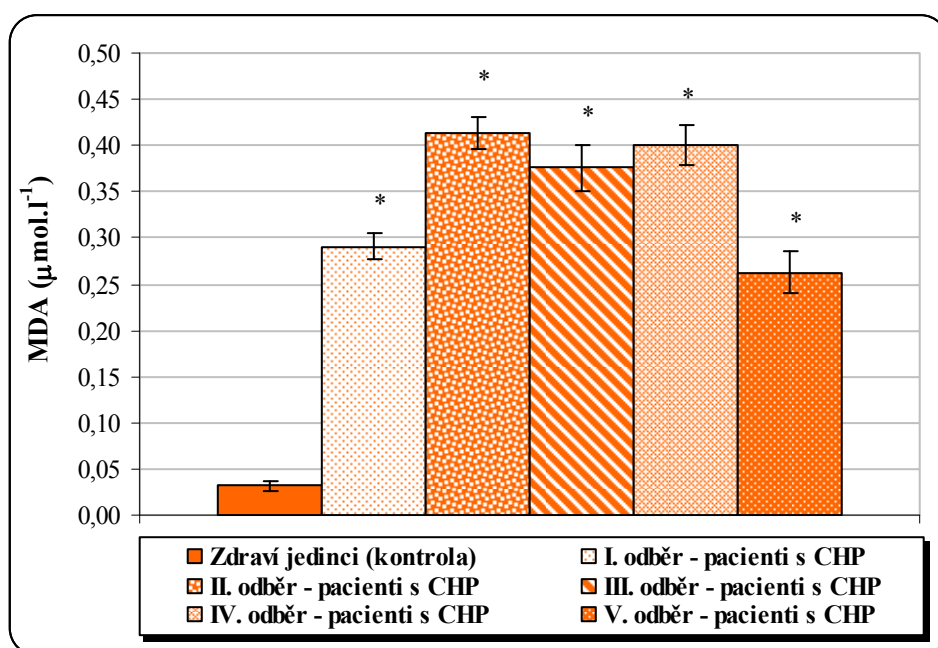


Obr. 28 (a-j) Koncentrace MDA, 4-HNE, TRAP, dusitanů, TNF-α, TNF RI, PDGF-AB, TGF-β1, HA a MPO v plazmě (V. odběr). Znázorněná data představují průměrné hodnoty ± S.E.M. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.

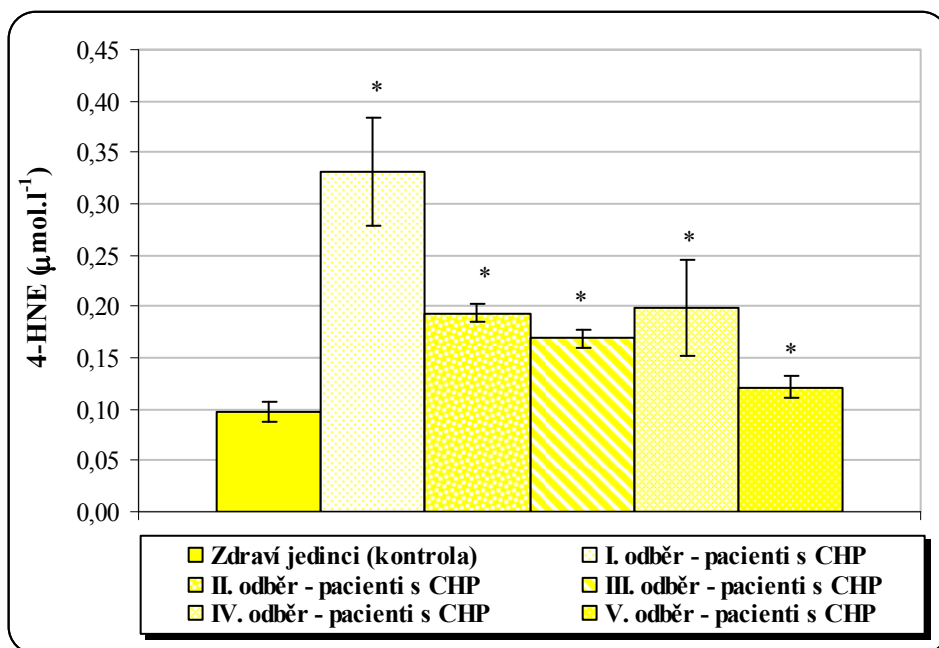
Významně zvýšené hladiny v porovnání s kontrolou byly u parametrů MDA, 4-HNE, TRAP, dusitanů, TNF RI, HA a MPO byly. Pouze nevýznamně vyšší koncentraci ve srovnání s kontrolou vykazoval parametr TGF- β 1. Hladiny prozánětlivého cytokinu TNF- α společně s růstovým cytokinem PDGF-AB byly u pacientů s CHP statisticky nevýznamně nižší v porovnání s kontrolou.

5.6 Porovnání jednotlivých markerů v delším časovém intervalu

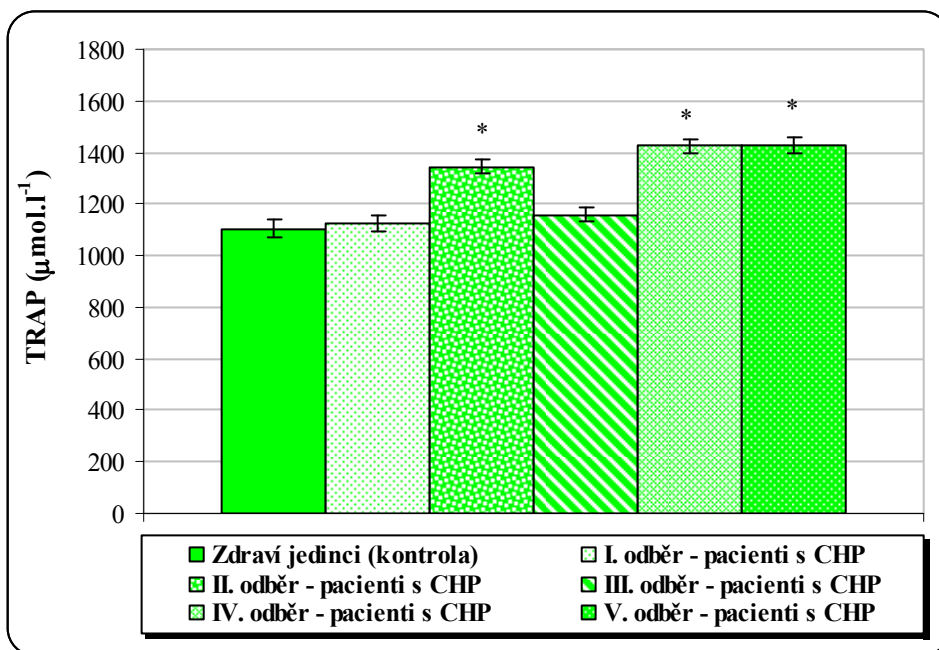
U pacientů s CHP bylo provedeno celkem pět odběrů krve, přičemž časový interval mezi jednotlivými odběry činil vždy šest měsíců. V následujících grafických vyhodnoceních byly znázorněny plazmatické hladiny markerů oxidačního stresu a zánětlivého procesu u pacientů s CHP v jednotlivých odběrech, tedy v časových odstupech a byly porovnány se zdravými jedinci (kontrolou) (Obr. 29 - 38). V grafických vyhodnoceních byly uvedeny průměrné koncentrace jednotlivých markerů (průměr $\pm$ S.E.M.) v daném odběru. Data byla statisticky analyzována *Studentovým t-testem*. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.



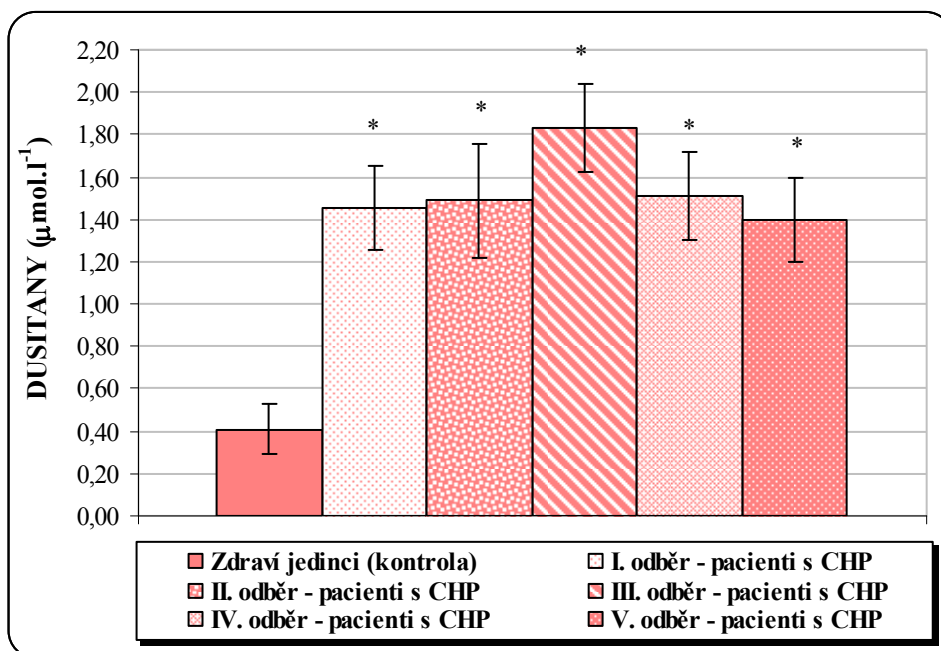
Obr. 29 Koncentrace MDA v plazmě. Znázorněná data představují průměrné hodnoty $\pm$ S.E.M. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.



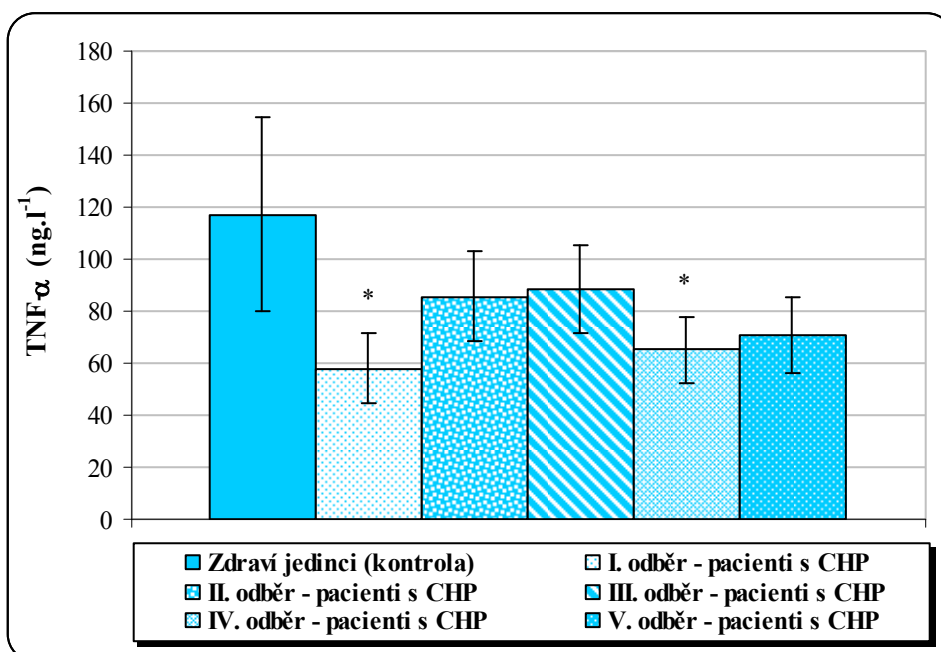
Obr. 30 Koncentrace 4-HNE v plazmě. Znázorněná data představují průměrné hodnoty $\pm$ S.E.M. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.



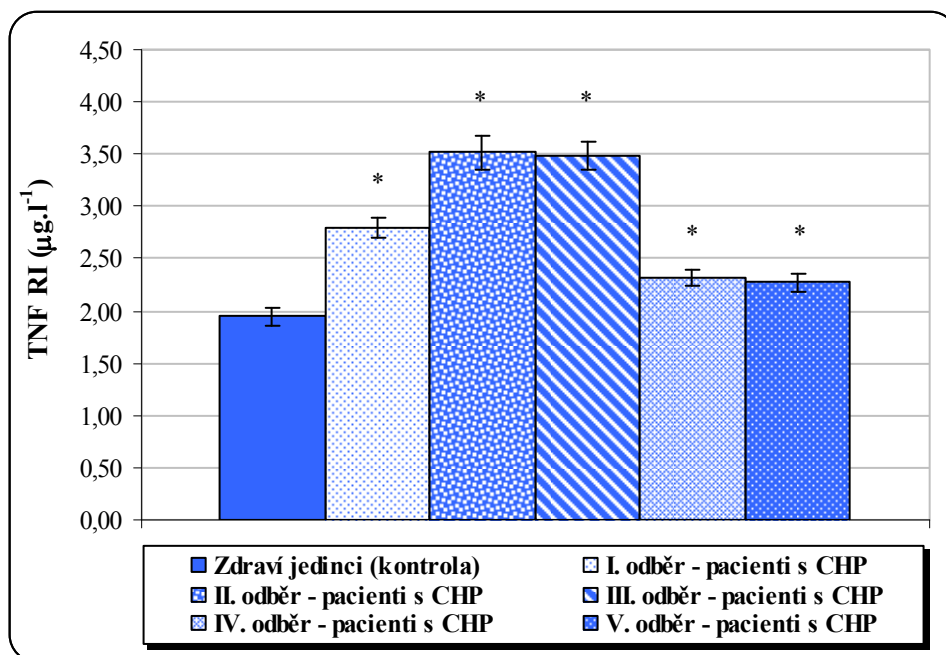
Obr. 31 Koncentrace TRAP v plazmě. Znázorněná data představují průměrné hodnoty $\pm$ S.E.M. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.



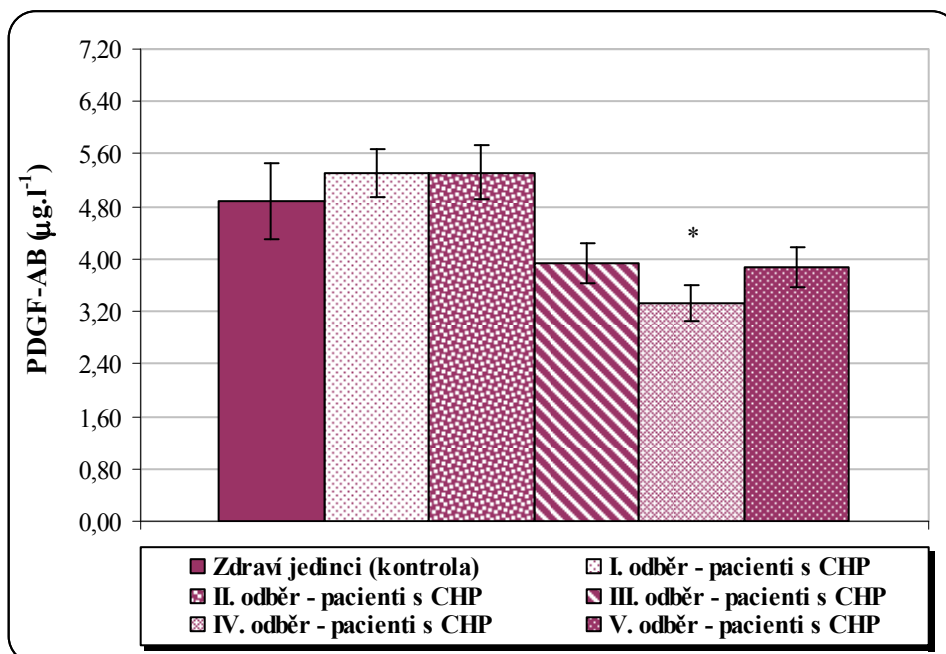
Obr. 32 *Koncentrace dusitanů v plazmě.* Znázorněná data představují průměrné hodnoty $\pm$ S.E.M. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.



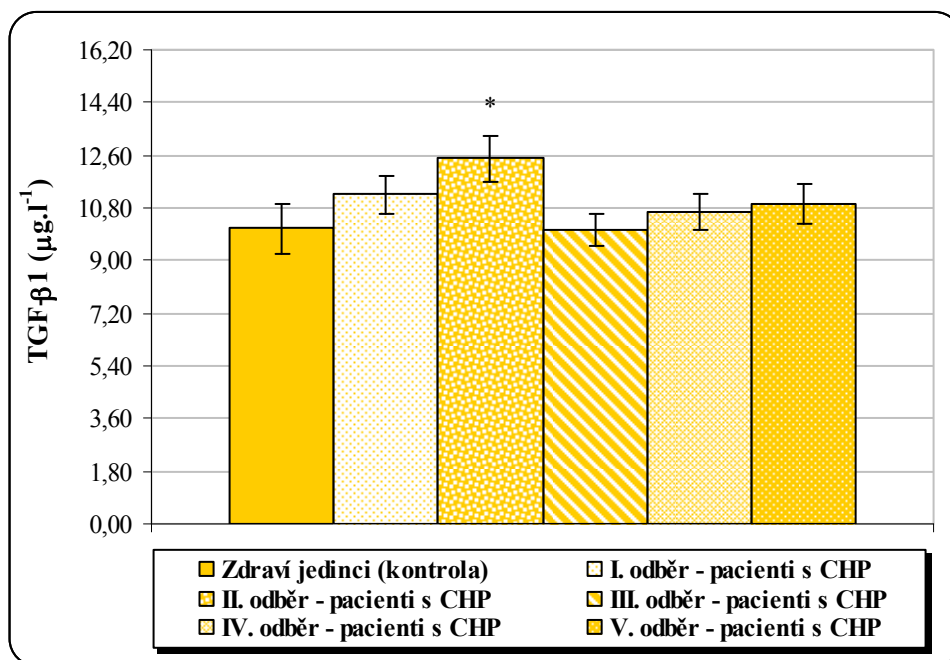
Obr. 33 *Koncentrace TNF-α v plazmě.* Znázorněná data představují průměrné hodnoty $\pm$ S.E.M. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.



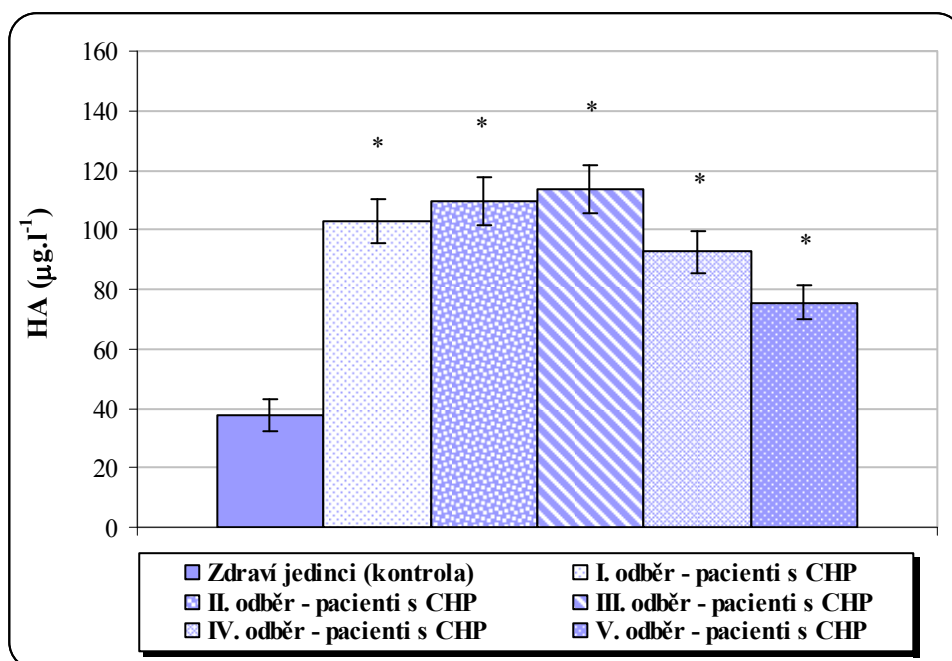
Obr. 34 *Koncentrace TNF RI v plazmě. Znázorněná data představují průměrné hodnoty $\pm$ S.E.M. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.*



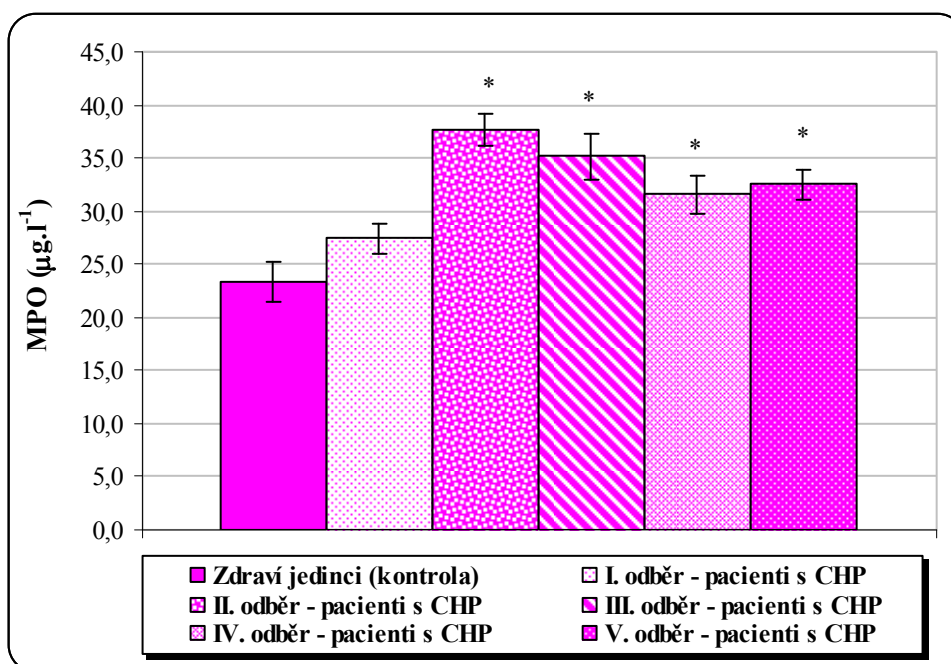
Obr. 35 *Koncentrace PDGF-AB v plazmě. Znázorněná data představují průměrné hodnoty $\pm$ S.E.M. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.*



Obr. 36 Koncentrace TGF-β1 v plazmě. Znázorněná data představují průměrné hodnoty $\pm$ S.E.M. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.



Obr. 37 Koncentrace HA v plazmě. Znázorněná data představují průměrné hodnoty $\pm$ S.E.M. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.



Obr. 38 *Koncentrace MPO v plazmě. Znázorněná data představují průměrné hodnoty $\pm$ S.E.M. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.*

Z výsledků zobrazených na (Obr. 29 - 38) vyplývá, že koncentrace MDA, 4-HNE, dusitanů, TNF RI a HA v plazmě pacientů s CHP byly ve všech pěti provedených odběrech statisticky významně vyšší ve srovnání s kontrolou. Při podrobnější analýze těchto parametrů lze konstatovat, že:

Plazmatické hladiny MDA byly nejvyšší ve II., III. a IV. odběru. Nejnižší obsah MDA v plazmě pacientů s CHP byl v V. odběru.

Nejvyšší koncentrace 4-HNE v plazmě pacientů s CHP byla zjištěna v I. odběru a současně byla statisticky nejvýznamnější v porovnání s kontrolou. Nejnižší obsah 4-HNE v plazmě pacientů s CHP byl v V. odběru.

Dusitany zaznamenaly nejvyšší koncentraci ve III. odběru. Nejnižší obsah NO_2^- v plazmě pacientů s CHP byl v V. odběru.

Plazmatické hladiny TNF RI byly nejvyšší ve II. a III. odběru. Nejnižší obsah TNF RI v plazmě pacientů s CHP jsme zaznamenali ve IV. a V. odběru.

V nevyšší koncentraci se HA projevil ve III. odběru. Nejnižší obsah HA v plazmě pacientů s CHP byl v V. odběru.

Další skupina markerů byla statisticky významně změněna pouze v některém z pěti provedených odběrů. Konkrétně se jedná o MPO, TRAP, TNF- α , PDGF-AB a TGF- β 1. Při podrobnější analýze těchto parametrů lze konstatovat, že:

Plazmatické hladiny MPO byly významně statisticky vyšší ve srovnání s kontrolou v II. až V. odběru. Přičemž nejvyšší koncentrace MPO byla dosažena v II. odběru. Nejnižší obsah MPO v plazmě pacientů s CHP byl v I. odběru a tato koncentrace je mírně zvýšena v

porovnání s kontrolou, ale není statisticky významná. Koncentrace MPO ve IV. a V. odběru jsou srovnatelné.

Koncentrace TRAP byly statisticky významně vyšší ve srovnání s kontrolou v II., IV. a V. odběru. Přičemž ve IV. a V. odběru byly hladiny antioxidační kapacity plazmy pacientů s CHP nejvyšší a současně srovnatelné. Koncentrace TRAP v II. odběru byla mírně snížena v porovnání s nejvyššími koncentracemi TRAP ve IV. a V. odběru. Nejnížší hladiny antioxidační kapacity dosahovala ve srovnání s kontrolou v I. a III. odběru a současně jsou tyto koncentrace srovnatelné.

Průměrné koncentrace v plazmě pacientů s CHP markeru TNF- α jako prozánětlivého cytokinu byly ve všech odběrech nižší ve srovnání s kontrolou, přičemž v I. a ve IV. odběru byly statisticky významně sníženy oproti kontrole. Hladiny TNF- α ve II. a III. odběru byly srovnatelné.

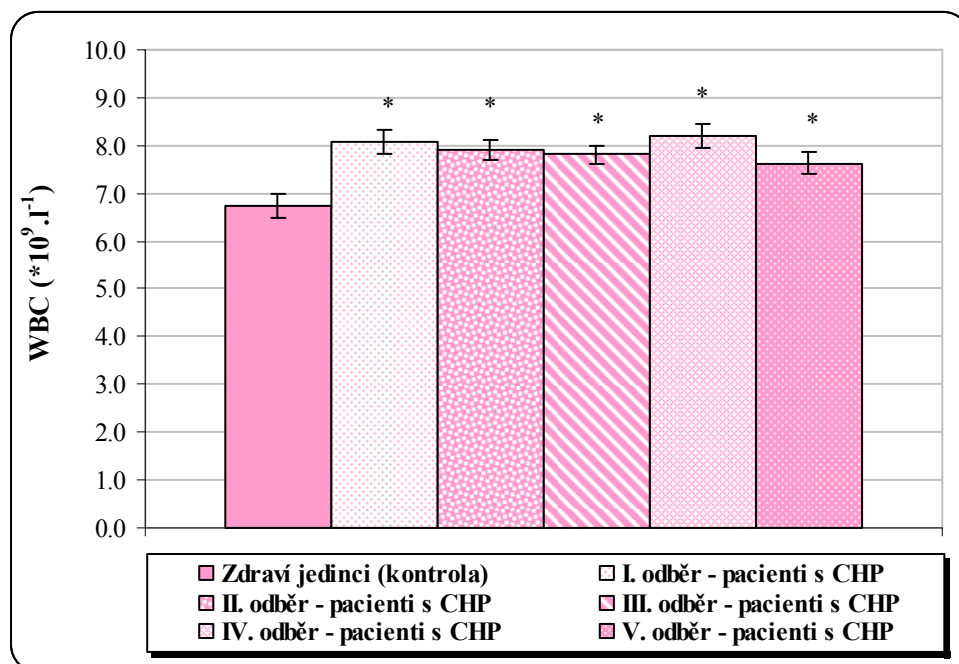
Stejně jako TNF- α i průměrné hladiny v plazmě pacientů s CHP cytokinu PDGF-AB byly ve III., IV. a V. odběru nižší ve srovnání s kontrolou. Koncentrace PDGF-AB ve III. a V. odběru dosahovaly srovnatelné hladiny. Statisticky významně nejnížší koncentrace PDGF-AB proti kontrole byla dosažena ve IV. odběru. Pouze v I. a II. odběru byly hladiny cytokinu PDGF-AB vyšší v porovnání s kontrolou a dosahovaly srovnatelné koncentrace.

Cytokin TGF- β 1 pouze ve III. odběru a současně se jedná o nejnížší koncentraci TGF- β 1 v plazmě pacientů s CHP v porovnání s kontrolou, která není statisticky významně nižší v porovnání s kontrolou. Statisticky významně vyšší hladina TGF- β 1 byla pozorována v II. odběru. Obsah TGF- β 1 v I. odběru byl mírně nižší než v odběru II. Koncentrace TGF- β 1 v V. odběru byla mírně vyšší než ve IV. odběru.

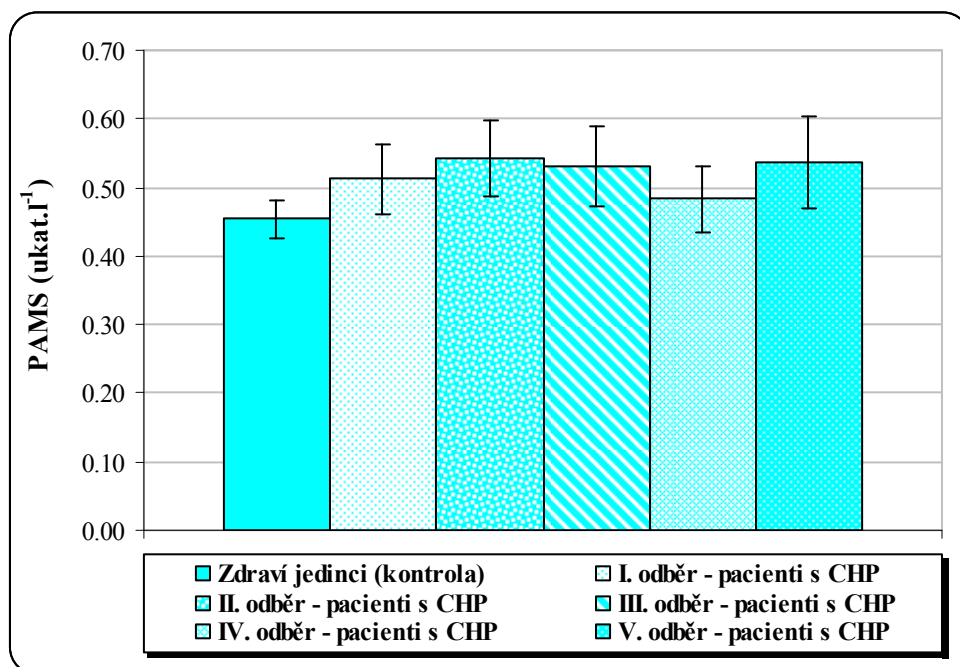
5.7 Porovnání vybraných hematologických a biochemických parametrů v delším časovém intervalu

U pacientů s CHP bylo provedeno celkem pět odběrů krve na základní biochemické vyšetření a krevní obraz, přičemž časový interval mezi jednotlivými odběry činil vždy šest měsíců.

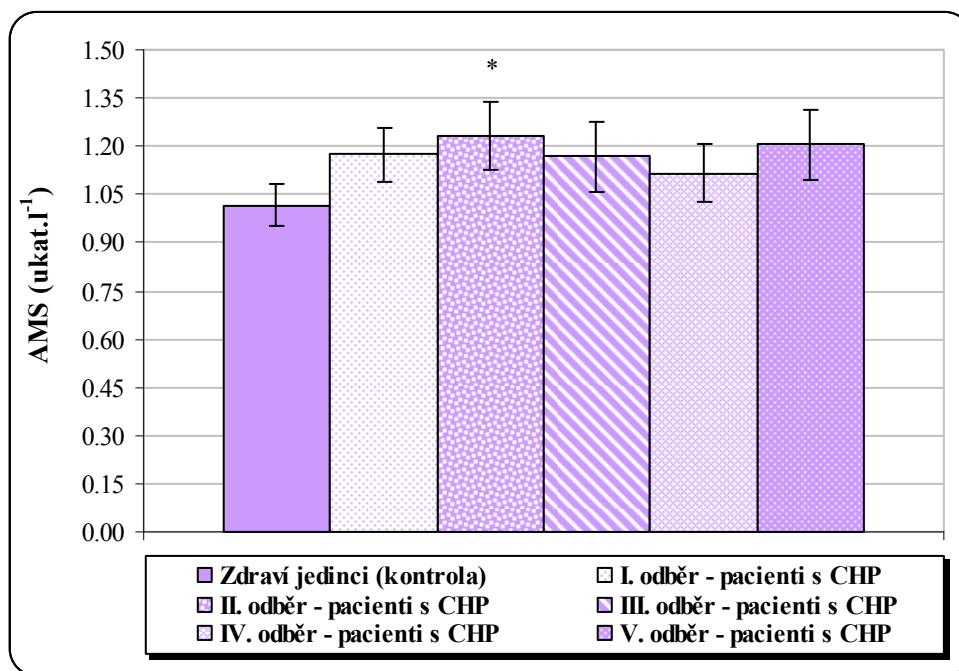
Tyto parametry byly stanoveny standardními analýzami v laboratořích Interní hepatogastroenterologické kliniky Fakultní nemocnice Brno. Po odborné konzultaci byly vybrány následující parametry, které jsou rozhodující v zánětlivém procesu CHP a to: z hematologických parametrů - leukocyty (WBC = White blood cells) a z biochemických parametrů - pankreatická amyláza (PAMS), amyláza (AMS), CB protein, cholesterol, triglyceridy (TG), HDL-cholesterol (HDL-chol), LDL-cholesterol (LDL-chol) a C-reaktivní protein (CRP). Tyto hematologické a biochemické parametry byly graficky vyhodnoceny a byly znázorněny hodnoty (průměr $\pm$ S.E.M.) jednotlivých zmíněných parametrů v plazmě pacientů s CHP v jednotlivých odběrech, tedy časových odstupech a byly porovnány s hodnotami (průměr $\pm$ S.E.M.) zdravých jedinců (kontrol) (*Obr. 39 – 47*). Data byla statisticky analyzována *Studentovým t-testem*. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.



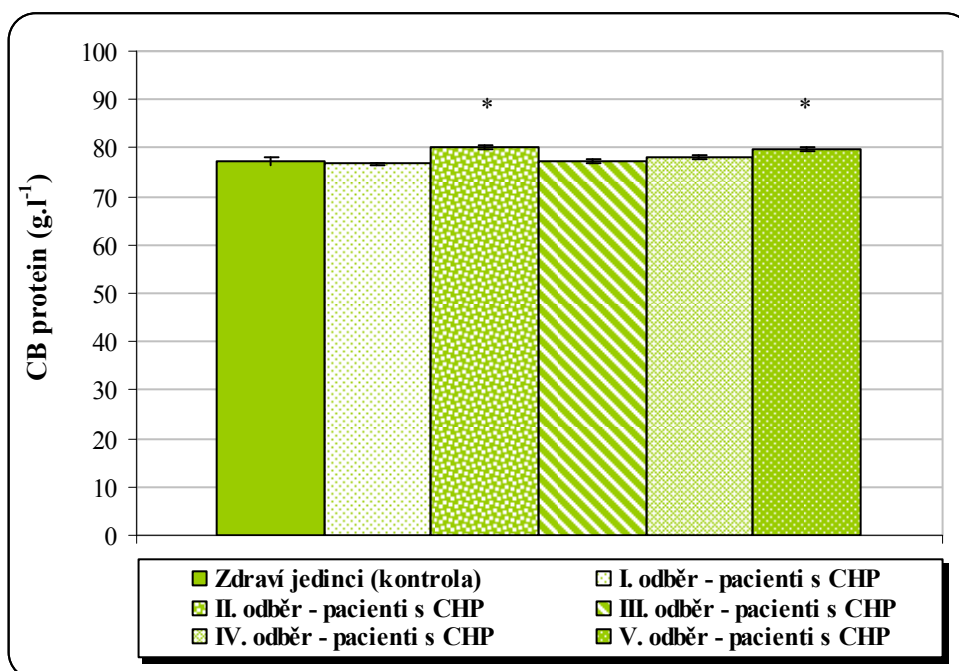
Obr. 39 *Koncentrace WBC (leukocytů) v plazmě. Znázorněná data představují průměrné hodnoty $\pm$ S.E.M. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.*



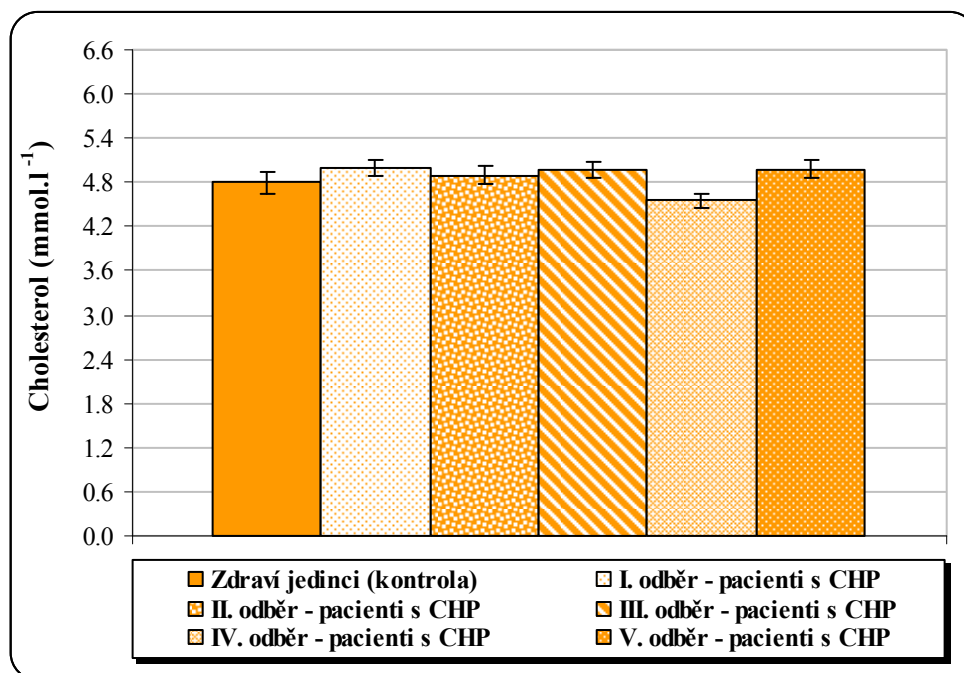
Obr. 40 *Koncentrace PAMS (pankreatické amylázy) v plazmě. Znázorněná data představují průměrné hodnoty $\pm$ S.E.M. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.*



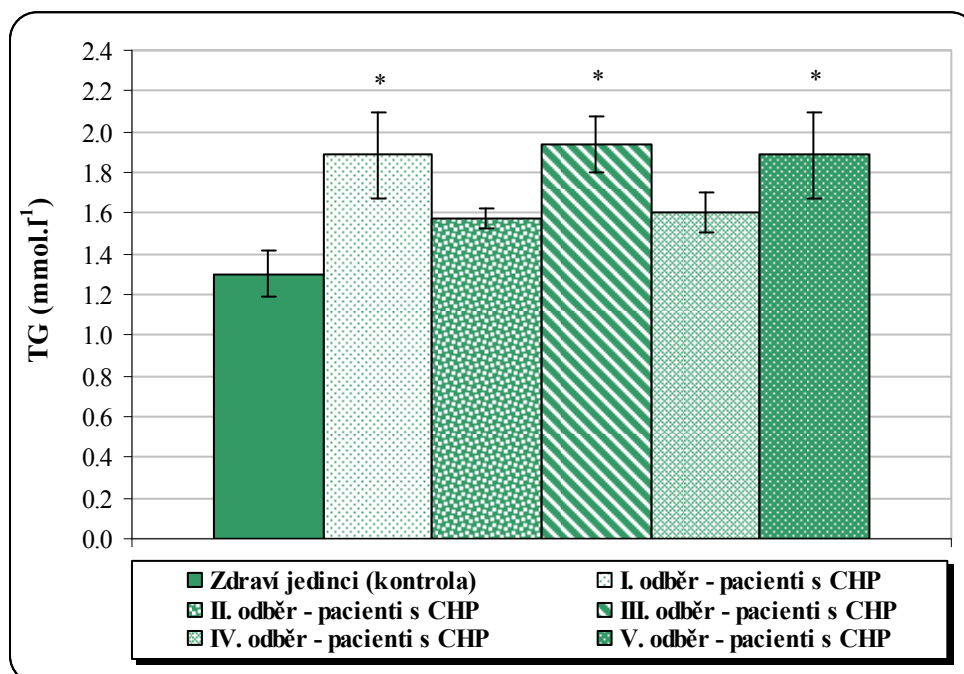
Obr. 41 *Koncentrace AMS (amylázy) v plazmě. Znázorněná data představují průměrné hodnoty $\pm$ S.E.M. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.*



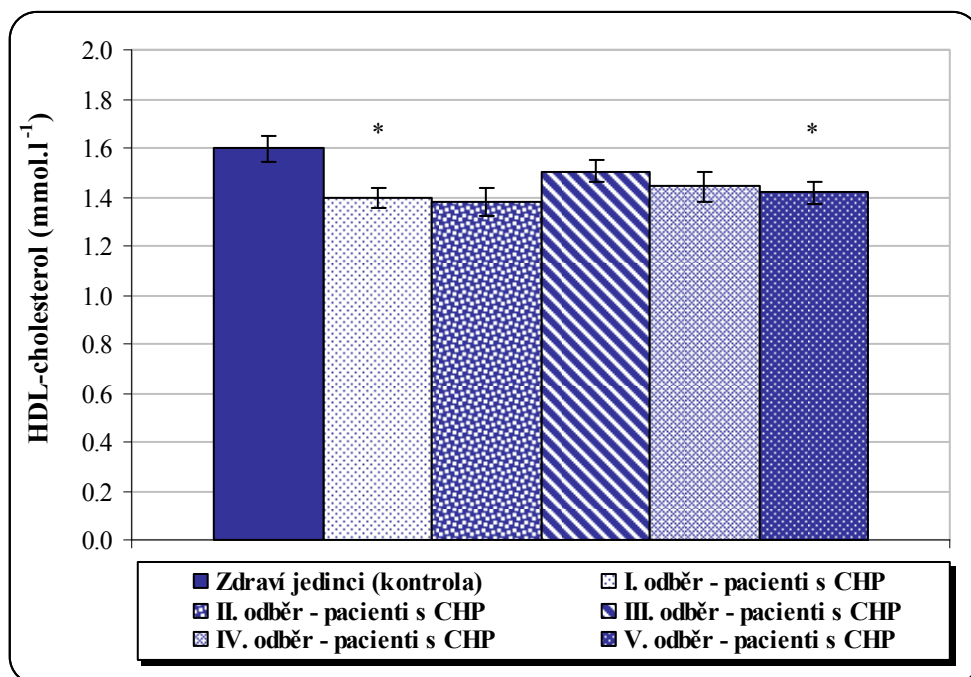
Obr. 42 *Koncentrace CB proteinu v plazmě. Znázorněná data představují průměrné hodnoty $\pm$ S.E.M. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.*



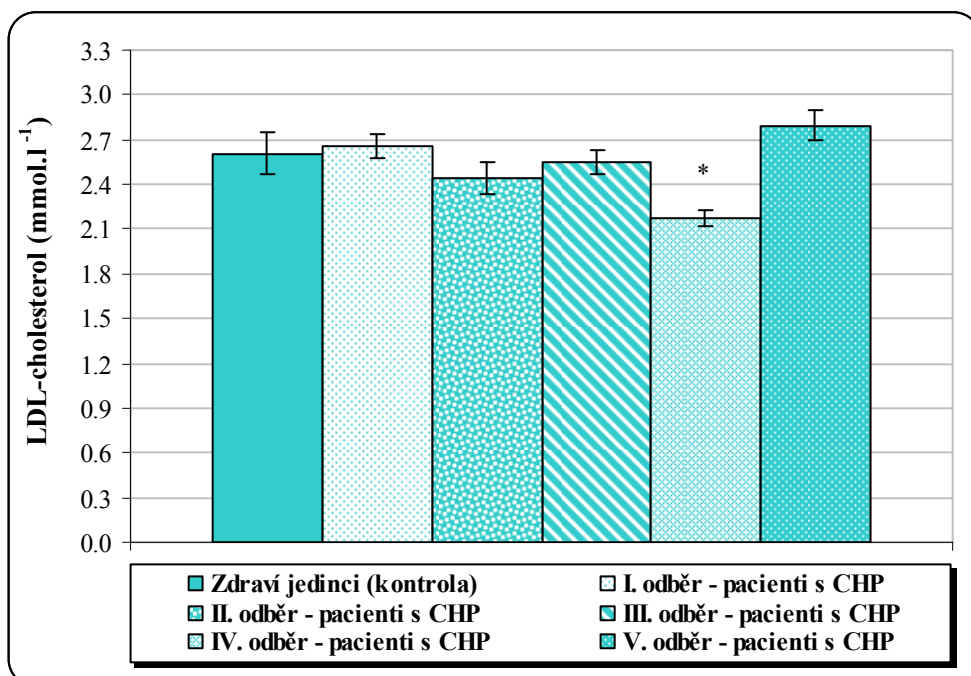
Obr. 43 *Koncentrace cholesterolu v plazmě. Znázorněná data představují průměrné hodnoty $\pm$ S.E.M. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.*



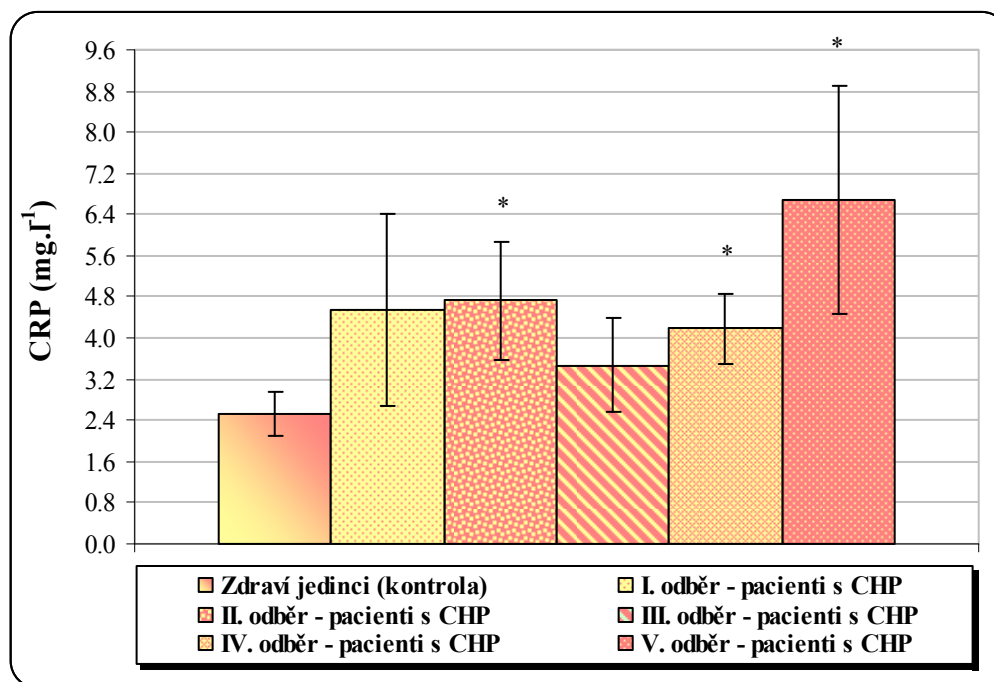
Obr. 44 *Koncentrace TG (triglyceridů) v plazmě. Znázorněná data představují průměrné hodnoty $\pm$ S.E.M. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.*



Obr. 45 *Koncentrace HDL-cholesterolu v plazmě. Znázorněná data představují průměrné hodnoty $\pm$ S.E.M. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.*



Obr. 46 *Koncentrace LDL-cholesterolu v plazmě. Znázorněná data představují průměrné hodnoty $\pm$ S.E.M. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.*



Obr. 47 *Koncentrace CRP (C-reaktivního proteinu) v plazmě. Znázorněná data představují průměrné hodnoty $\pm$ S.E.M. Symbol * ukazuje statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) v porovnání s kontrolou.*

Hladiny leukocytů (WBC) (Obr. 39) v plazmě pacientů s CHP byly ve všech pěti provedených odběrech statisticky významně vyšší ve srovnání s kontrolou. Nejvyšší koncentrace WBC byla pozorována ve IV. odběru a zároveň byla vysoce statisticky významná v porovnání s kontrolou.

Koncentrace pankreatické amylázy (PAMS) (Obr. 40) a cholesterolu (Obr. 43) v plazmě pacientů s CHP byly ve všech pěti provedených odběrech mírně zvýšeny ve srovnání s kontrolou, ovšem statisticky nevýznamně. Pouze ve IV. odběru byla koncentrace cholesterolu v plazmě pacientů s CHP nižší v porovnání s kontrolou.

Koncentrace amylázy (AMS) (Obr. 41) byly ve všech pěti provedených odběrech vyšší ve srovnání s kontrolou a statisticky významně vyšší ve II. odběru. Nejnižší koncentrace AMS byla zaznamenána ve IV. odběru oproti kontrole.

Plazmatické hladiny CB-proteinu (Obr. 42) byly statisticky významně vyšší v porovnání s kontrolou ve II. a IV. odběru. V ostatních odběrech byly jeho koncentrace srovnatelné s hladinou kontroly.

Hladiny triglyceridů (TG) (Obr. 44) v plazmě pacientů s CHP byly zvýšeny ve všech pěti odběrech v porovnání s kontrolou. Statisticky významně zvýšené TG koncentrace byly v I., III. a V. odběru ve srovnání s kontrolou a zároveň jejich hladiny byly srovnatelné. Zatímco nejnižší koncentrace TG byly zaznamenány v II. a IV. odběru a rovněž jejich hladiny byly srovnatelné.

Průměrné koncentrace v plazmě pacientů s CHP parametru HDL-cholesterolu (*Obr. 45*) byly ve všech pěti odběrech nižší ve srovnání s kontrolou, přičemž v I. a V. odběru byly statisticky významně sníženy oproti kontrolám.

Stejně jako HDL-cholesterol i průměrné hladiny v plazmě pacientů s CHP LDL-cholesterolu (*Obr. 46*) byly ve II., III. a IV. odběru nižší ve srovnání s kontrolou. Statisticky významně snížena byla jeho koncentrace ve IV. odběru. Zatímco ve zbylých odběrech v I. a V. LDL-cholesterol dosáhl vyšších hladin v plazmě pacientů s CHP oproti kontrolám, ovšem bez statistické významnosti. Nejvyšší koncentrace LDL-cholesterolu byla v V. odběru, ale nebyla statisticky významná.

Hladiny C-reaktivního proteinu (CRP) (*Obr. 47*) v plazmě pacientů s CHP byly ve všech pěti provedených odběrech vyšší ve srovnání s kontrolou, přičemž statisticky významně zvýšeny byly v II., IV. a V. odběru. Nejvyšší koncentrace CRP byla pozorována v V. odběru. Zatímco nejnižší obsah CRP v plazmě byl zjištěn ve III. odběru. U hodnot CRP jednotlivých pacientů byl patrný větší rozptyl, což se projevilo ve znázorněných S.E.M..

5.8 Shrnutí výsledků a diskuze

Koncentrace sekundárních produktů lipidové peroxidace MDA a 4-HNE v plazmě pacientů s CHP společně s hladinami dusitanů, TNF RI a HA byly ve všech pěti provedených odběrech významně vyšší ve srovnání s kontrolními jedinci. Tyto výsledky prokazují přítomnost dlouhotrvajícího chronického oxidačního stresu, který navozuje patofyziologické podmínky.

Zvýšené hladiny produktů lipidové peroxidace v plazmě pacientů s CHP byly pozorovány také jinými autory. Dle [76, 77, 127] byly zaznamenány zvýšené hladiny produktů lipidové peroxidace v plazmě a séru pacientů s CHP metodou TBARs, zvýšené hladiny MDA v erytrocytech [128], významné hladiny 4-HNE, MDA a konjugovaných dienu v pankreatické tkáni [49, 129], významné hladiny lipidových hydroperoxidů a konjugovaných dienu v duodenálním a pankreatické šťávě [130, 131, 132]. Současně jsou v protikladu zjištěné výsledky dle [132], kdy hladiny konjugovaných dienu a lipidových hydroperoxidů v plazmě pacientů s CHP v porovnání s kontrolou nebyly významně rozdílné. I přes to byli tito autoři [132] přesvědčeni, že chronický zánět pankreatu je významným zdrojem produktů lipidové peroxidace.

Jednou z hlavních příčin zvýšených hladin produktů lipidové peroxidace u pacientů s CHP by mohla být i zjištěná nedostatečnost antioxidační obrany. V naší studii byly hladiny antioxidační kapacity stanovené metodou TRAP srovnatelné s kontrolou nebo slabě vyšší v porovnání s kontrolou a nikdy nebyly nižší než u kontrolních jedinců. To by mohlo naznačovat, že zvýšená lipidová peroxidace není způsobena v důsledku poklesu totální antioxidační kapacity v plazmě. Nicméně mnohé příspěvky ukazují, jak je krevní plazma schopna redukovat železité ionty a antioxidační kapacitu jako marker, který je významně nižší v plazmě pacientů s CHP v porovnání s kontrolami [76, 77]. Existují další různorodé příspěvky, které dokazují snížené hladiny rozličných antioxidantů v plazmě nebo séru pacientů s CHP v porovnání s kontrolními jedinci jako např. v lipidech rozpustný vitamín E a A [76, 127, 133, 134, 135], β -karoten, β -kryptoxantin, lykopen [135], selen [134, 135] a glutathion peroxidázu [134]. Rozpor mezi těmito výsledky může být zapříčiněn specifickou

citlivostí peroxylového radikálu vychytávaného v krevní plazmě oproti molekulám, které mají schopnost vychytávat peroxylový radikál a to zejména ve vodě rozpustné antioxidanty jako např. kyselina močová, bilirubin, albumin a další molekuly, které jsou deficientní u pacientů s CHP [76, 136]. Zajímavé je, že významnost antioxidační nedostatečnosti u pacientů s CHP je dokumentována i v jiných klinických studiích, které poukazují na vhodnost podání orálního doplňku v podobě kurkumínu s antioxidačními vlastnostmi a na účinky komplexní antioxidační terapie pro pacienty s CHP, které brání lipidové peroxidaci [76, 128]. Dále jsou popisovány další podpůrné kúry pomocí rozličných antioxidantů, které jsou schopny zlepšit kvalitu života a redukovat bolesti pacientů s CHP [76, 137].

Zvýšená lokální a systémová produkce NO v plazmě pacientů s CHP je potvrzena zvýšenými hladinami dusitanů u těchto pacientů v porovnání s kontrolou. Zvýšená tvorba NO u pacientů s CHP je také dokumentována v příspěvcích [138, 139]. Tito autoři předpokládají, že zvýšená produkce NO u pacientů s CHP by mohla mít souvislost s deregulovaným krevním řečištěm v pankreatu a histologickými změnami ve vaskulatuře pankreatu. Významná souvislost mezi zvýšenou produkcí NO a postupujícími zánětlivými procesy je dokumentována korelací mezi koncentracemi dusitanů, CRP a celkovým množstvím leukocytů. Zajímavá je také pozitivní korelace mezi hladinami dusitanů v plazmě a triglyceridy. Na rozdíl od negativní korelace, která vznikla mezi hladinami dusitanů v plazmě a HDL-cholesterolem. Tyto korelace podtrhují spojení mezi nadprodukcí NO a změnami v metabolismu lipidů během postupu chronické pankreatitidy. Jak již bylo zmíněno, zvýšené hladiny triglyceridů, které negativně korelují se sníženými hladinami HDL-cholesterolu u pacientů s CHP byly popsány v [140]. Souhrnně lze konstatovat, že aktivní podíl NO na změnách v metabolismu lipidů či definování zvýšené hladiny dusitanů jako hlavního markeru stanovení stupně závažnosti zánětlivých procesů nelze dosud jednoznačně definovat a je nutno dále zkoumat jeho úlohu v chronické pankreatitidě.

Koncentrace MPO byly statisticky významně vyšší v porovnání s kontrolními jedinci. MPO společně s hladinami MDA, 4-HNE, dusitanů, TNF RI a HA v plazmě pacientů s CHP by mohly být vhodnými ukazateli charakterizující pacienty s CHP a mohly by mít u těchto pacientů diagnostický význam.

Naproti tomu plazmatické hladiny markerů TNF- α , PDGF-AB a TGF- β 1 byly nižší ve srovnání s kontrolou. Průměrné koncentrace v plazmě pacientů s CHP prozánětlivého cytokinu TNF- α byly ve všech odběrech nižší ve srovnání s kontrolou. Hladiny PDGF-AB v plazmě pacientů s CHP byly nižší nebo srovnatelné s kontrolními jedinci. Koncentrace TGF- β 1 byly převážně mírně vyšší nebo srovnatelné s kontrolou. Lze říci, že tyto cytokiny nejsou vhodnými markery pro diagnózu CHP.

Biochemické parametry (PAMS, AMS, CB protein, cholesterol, triglyceridy, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, CRP) a z hematologických parametrů (leukocyty) u pacientů s CHP byly v referenčních mezích normálu, stejně tomu bylo i u kontrolních jedinců. Nicméně leukocyty, triglyceridy a CRP u pacientů s CHP dosahovaly hodnot horní hranice mezí normálu. Hladiny leukocytů, triglyceridů a CRP v plazmě pacientů s CHP byly ve všech pěti provedených odběrech významně vyšší ve srovnání s kontrolou.

Tato skutečnost odkrývá souvislost oxidačního stresu s biochemickými a hematologickými parametry.

5.9 Časový vývoj imunologických a biochemických parametrů pacientů s různou tíží pankreatitidy

Získaná data imunologických a biochemických parametrů pacientů s CHP včetně dotazníkové akce u pacientů s CHP byla statisticky analyzována *Institutem biostatiky a analýz Lékařské fakulty MU v Brně*. Jedná se o souhrnné a statistické shrnutí veškerých získaných dat v této studii oxidačního stresu u pacientů s chronickou pankreatitidou. Tato souhrnná data jsou uvedena v následujících **Tabulkách 9 – 14**.

o *Metodika statistického vyhodnocení*

Pro popis spojitých dat pacientů bylo využito standardní neparametrické popisné statistiky – medián a 5-ti a 95-ti procentní kvantil; kategoriální data byla hodnocena procentuálním zastoupením kategorií. Statistická významnost rozdílů spojitých parametrů mezi pacienty s různou tíží chronické pankreatitidy byla hodnocena Mann Whitney U testem; změny těchto parametrů v čase Wilcoxonovým testem pro párová data. Významnost rozdílů v zastoupení kategorií byla hodnocena ML chi-kvadrát testem.

Statistická analýza dat byla provedena v software Statistica 9 a SPSS 17.

A. Charakteristika pacientů ve studii

Ve studii jsou analyzována data 113 pacientů s chronickou pankreatitidou, veškeré analýzy jsou provedeny jak pro celý soubor pacientů, tak rozděleně pro pacienty s lehkou (N=73) a těžkou pankreatitidou (N=40).

Tíže pankreatitidy	N	%
Lehká	73	64,6
Těžká	40	35,4
Celkem	113	100,0

Tab. 9 Popis pacientů ve studii.

(a) pohlaví pacientů dle tíže pankreatitidy

Pohlaví	Celkem		Lehká		Těžká		p ¹
	N	%	N	%	N	%	
Muži	74	65,5	43	58,9	31	77,5	0,043
Ženy	39	34,5	30	41,1	9	22,5	

¹ML chí-kvadrát test

(b) věk pacientů a tělesné parametry dle tíže pankreatitidy

Parametr	N	Celkem ¹	Lehká ¹	Těžká ¹	p ²
Věk (roky)	113	47 (24; 69,9)	46 (23,7; 69,9)	48,5 (26,2; 74,6)	0,471
Výška (cm)	106	173,5 (160; 184,7)	172,5 (158,9; 184,6)	175,5 (159,8; 188,1)	0,254
Váha (kg)	106	75 (50,4; 92)	76 (48,9; 99,1)	73 (50,9; 88,3)	0,230
BMI	106	24,6 (18,3; 30,3)	24,6 (18,6; 32)	23,5 (18,1; 29,1)	0,107

¹medián (5; 95-ti procentní percentily)

² Mann-Whitney U test

Těžkou formu pankreatitidy mají častěji muži než ženy. Naopak věk ani tělesné parametry nejsou významné v souvislosti s tíží chronické pankreatitidy.

Tab. 10 Etiologie a genetika onemocnění.

	Celkem		Lehká		Těžká		p ¹
	N	%	N	N	%	N	
Etiologie							
Obstruktivní	3	2,7	2	2,7	1	2,5	0,003
Toxická	25	22,1	9	12,3	16	40,0	
Idiopatická	84	74,3	62	84,9	22	55,0	
Hereditární	1	0,9	0	0,0	1	2,5	
Genetika							
Žádná	100	88,5	67	91,8	33	82,5	0,148
Některá ano	13	11,5	6	8,2	7	17,5	
SPINK	6	5,3	1	1,4	5	12,5	
CFTR	5	4,4	4	5,5	1	2,5	
CFTR-2	1	0,9	1	1,4	0	0,0	
PRSS	1	0,9	0	0,0	1	2,5	

¹ML chí-kvadrát test

Co se etiologie týče, byl prokázán významný rozdíl ve vztahu k tíži chronické pankreatitidy. Zdá se, že u těžké chronické pankreatitidy je častější toxická etiologie na úkor idiopatické etiologie ve srovnání s lehkou chronickou pankreatitidou.

Přítomnost genetických faktorů je problematické hodnotit vzhledem k malému počtu pozitivních nálezů. Samotné srovnání počtu negativních a pozitivních nálezů ve vztahu k tíži chronické pankreatitidy nebylo významné. Zdá se častější přítomnost SPINK u těžké a CFTR u lehké chronické pankreatitidy, avšak vzhledem k četnosti positivity mohou být tyto rozdíly způsobeny jen náhodou.

Tab. 11 Současný stav onemocnění pacientů s chronickou pankreatitidou.

	Celkem		Lehká [#]		Těžká [#]	
	N	%	N	N	%	N
Současný stav						
P-R	1	0,9	0	0,0	1	2,5
HPDE	10	8,8	2	2,7	8	20,0
Operace slinivky	2	1,8	1	1,4	1	2,5
Slinivka odstraněna	1	0,9	0	0,0	1	2,5
Úmrtí	2	1,8	1	1,4	1	2,5
Bez podrobností	97	85,8	69	94,5	28	70,0

[#] nízké četnost kategorií neumožňuje statistické srovnání

Tab. 12 Rizikové faktory, komorbidity a úroveň protilátek u pacientů s chronickou pankreatitidou.

	Celkem		Lehká		Těžká		p ¹
	N	%	N	%	N	%	
Rizikový faktor/komorbidita							
Alkohol	73	64,6	42	57,5	31	77,5	0,030
Kouření	55	48,7	26	35,6	29	72,5	<0,001
DM	25	22,1	9	12,3	16	40,0	0,001
ICHS	4	3,5	3	4,1	1	2,5	#
CHOPN	8	7,1	7	9,6	1	2,5	0,129
CHRI	3	2,7	2	2,7	1	2,5	#
HT	16	14,2	9	12,3	7	17,5	0,456
Celiakie/št.žláza/IBD	10	8,8	7	9,6	3	7,5	0,705
Lipidy	14	12,4	9	12,3	5	12,5	0,979
Poškození kostí	23	35,4	12	28,6	11	47,8	0,123
Kalcifikace	36	32,4	8	11,0	28	73,7	<0,001
Uzliny	2	1,8	1	1,4	1	2,5	#
Protilátky							
IgG4	5	4,4%	5	6,8%	0	0,0%	#
ANA	1	0,9%	1	1,4%	0	0,0%	#
ENA	5	4,4%	3	4,1%	2	5,0%	#

¹ML chí-kvadrát test

nízké N neumožňuje srovnání

Z rizikových faktorů se ukázaly jako významné pití alkoholu, kouření, diabetes mellitus a kalcifikace kostí (ve všech případech jsou častěji vázány na těžší formu chronické pankreatitidy).

Některé z rizikových faktorů a vyšetření protilátek není možné věrohodně srovnat vzhledem k jejich nízkému zastoupení.

Zbývající ze sledovaných protilátek (proti slinné žláze, ASKA, E.B. – proti exokrinním buňkám pankreatu, P.B. – proti pohárkovým buňkám, ANKA, ASMA) nebyly prokázány u žádného z pacientů.

B. Srovnání pacientů s kontrolním souborem

Pro úvodní vyšetření pacientů s CHP je k dispozici i kontrolní soubor zdravých jedinců, analýza slouží k porovnání hodnocených pacientů s CHP s úrovní hodnocených parametrů ve zdravé populaci.

Tab. 13 Srovnání pacientů s CHP na začátku sledování s kontrolou a vzhledem k tíži nemocnění.

Parametr	Kontrola	Pacienti celkem	Pacienti s chronickou pankreatitidou		p ¹
			Lehká	Těžká	
MDA (nmol/ml)	0,12* (0,01; 0,47)	0,28* (0,08; 0,60)	0,29 (0,07; 0,60)	0,24 (0,09; 0,62)	0,616
4-HNE (nmol/ml)	0,07* (0,01; 0,26)	0,12* (0,00; 1,24)	0,12 (0,00; 1,24)	0,15 (0,00; 1,67)	0,418
TRAP (mmol/l)	1 109 (703; 1 472)	1 140 (668; 1 609)	1 115 (516; 1 649)	1 177 (735; 1 604)	0,580
NO₂⁻ (mmol/l)	0,20* (0,14; 4,17)	0,62* (0,20; 6,72)	0,59 (0,20; 6,62)	0,66 (0,20; 7,28)	0,266
TNF-α (pg/ml)	2,80* (2,50; 593,60)	2,50* (2,50; 312,30)	2,50 (1,90; 600,80)	2,50 (2,50; 193,50)	0,299
TNF RI (pg/ml)	2 132* (1 311; 4 708)	2 769* (1 374; 4 218)	2 848 (1 348; 4 304)	2 705 (1 371; 4 079)	0,178
PDGF-AB (pg/ml)	4 477 (764; 11 535)	4 358 (769; 12 673)	4 353 (903; 14 342)	4 584 (683; 11 639)	0,661
TGF-β1 (pg/ml)	9 713 (3 212; 24 764)	10 048 (2 773; 27 075)	10 097 (2 974; 27 839)	9 999 (2 524; 26 301)	0,825
Hyaluronan (ng/ml)	42,30* (3,00; 171,90)	90,60* (13,30; 256,90)	87,70 (15,20; 238,60)	110,00 (10,20; 279,00)	0,407
MPO (ng/ml)	25,10 (10,30; 50,60)	26,20 (8,10; 50,90)	25,90 (8,70; 51,10)	26,50 (5,70; 51,60)	0,541

* významný rozdíl v parametru mezi pacienty s chronickou pankreatitidou a kontrolními pacienty (Mann-Whitney U test)

¹ srovnání hodnot parametru v I. odběru mezi pacienty s lehkou a těžkou chronickou pankreatitidou (Mann-Whitney U test)

² velký podíl měření na detekčním limitu, v dalším zpracování vyřazen

Koncentrace sledovaných faktorů byly srovnávány s mediánem těchto parametrů u kontrolních pacientů. Významný rozdíl ve srovnání s kontrolou byl prokázán u těchto parametrů: MDA, 4-HNE, NO₂⁻, TNF-α, TNF RI a hyaluronan. Hladiny ostatních faktorů (TRAP, PDGF-AB, TGF-β1 a MPO) nebyly významně odlišné od hodnot kontrolních pacientů.

Při srovnání hodnot mezi pacienty s lehkou a těžkou pankreatitidou nebyl žádný parametr zjištěn na začátku studie jako významně odlišný.

C. Vývoj hodnot pacientů v čase

Hlavní částí analýzy je srovnání časového vývoje pacientů s CHP s různou tíží onemocnění. V každém bodě sledování je počítána významnost rozdílu mezi pacienty s těžkou a lehkou chronickou pankreatitidou spolu s významností změny v čase oproti předchozímu odběru a oproti počátku sledování.

Tab. 14 Vývoj sledovaných parametrů u pacientů s CHP v čase.

Odběr č.	N	Celkem ¹	Lehká ¹	Těžká ¹	p ²
MDA					
I.	108	0,28 (0,08; 0,58)	0,29 (0,08; 0,58)	0,24 (0,09; 0,62)	0,616
II.	110	↑0,38 (0,17; 0,80)	↑0,37 (0,20; 0,78)	↑0,41 (0,11; 0,90)	0,565
III.	104	0,31 (0,00; 0,76)	0,31 (0,00; 0,80)	0,34 (0,00; 0,75)	0,836
IV.	102	0,37 (0,13; 0,74)	0,38 (0,07; 0,61)	0,36 (0,14; 0,96)	0,766
V.	93	↓0,18 (0,00; 0,68)	↓0,18 (0,00; 0,75)	↓0,18 (0,00; 0,65)	0,781
4-HNE					
I.	108	0,12 (0,00; 1,20)	0,12 (0,00; 1,20)	0,15 (0,00; 1,67)	0,418
II.	110	0,17 (0,08; 0,34)	0,17 (0,08; 0,33)	0,19 (0,07; 0,40)	0,935
III.	104	↓0,15 (0,04; 0,31)	↓0,15 (0,03; 0,26)	0,18 (0,04; 0,32)	0,118
IV.	101	↓0,11 (0,03; 0,29)	↓0,11 (0,03; 0,28)	↓0,12 (0,01; 0,49)	0,341
V.	93	▼↓0,10 (0,01; 0,26)	▼↓0,10 (0,00; 0,28)	▼↓0,10 (0,01; 0,19)	0,656
TRAP					
I.	108	1 136 (694; 1 604)	1 115 (545; 1 614)	1 177 (735; 1 604)	0,580
II.	110	↑1 329 (932; 1 803)	↑1 325 (987; 1 785)	↑1 346 (868; 2 067)	0,350
III.	104	↓1 142 (766; 1 680)	↓1 139 (766; 1 621)	↓1 152 (712; 1 694)	0,752
IV.	102	↑1 398 (1 050; 1 874)	↑1 395 (1 050; 1 888)	↑1 400 (1 041; 1 870)	0,801
V.	93	▲1 408 (915; 1 954)	▲1 352 (905; 1 943)	▲1 535 (990; 1 954)	0,148
NO₂⁻					
I.	103	0,62 (0,20; 5,94)	0,59 (0,20; 5,94)	0,62 (0,20; 7,04)	0,266
II.	109	0,20 (0,20; 6,15)	0,20 (0,20; 6,54)	0,20 (0,20; 6,15)	0,861
III.	101	0,93 (0,20; 5,32)	1,14 (0,20; 6,82)	0,20 (0,20; 5,32)	0,528
IV.	95	0,20 (0,20; 6,09)	0,20 (0,20; 6,31)	0,20 (0,20; 4,93)	0,778
V.	88	0,21 (0,11; 5,76)	0,21 (0,07; 6,34)	0,21 (0,11; 4,36)	0,842
TNF RI					
I.	108	2 767 (1 378; 4 216)	2 848 (1 378; 4 220)	2 705 (1 371; 4 079)	0,178
II.	110	↑3 356 (1 533; 6 398)	↑3 456 (1 901; 6 734)	↑2 943 (1 203; 5 566)	0,227
III.	106	3 194 (1 702; 6 620)	3 198 (1 855; 5 537)	3 097 (1 531; 6 832)	0,657
IV.	102	↓2 133 (1 393; 3 767)	↓2 121 (1 240; 3 767)	↓2 136 (1 541; 4 047)	0,397
V.	93	▼2 075 (1 325; 3 589)	▼2 037 (1 318; 3 408)	▼2 075 (1 486; 4 470)	0,526
PGDF-AB					
I.	108	4 353 (861; 12 101)	4 353 (944; 14 312)	4 584 (683; 11 639)	0,661
II.	110	3 934 (870; 15 069)	4 220 (822; 16 645)	3 299 (870; 12 987)	0,188
III.	104	↓3 004 (819; 9 080)	↓3 149 (811; 8 701)	2 608 (819; 10 288)	0,922
IV.	102	↓2 508 (233; 9 606)	↓2 508 (255; 9 103)	2 504 (159; 10 348)	0,916
V.	93	▼↑3 168 (617; 11 608)	▼↑2 930 (488; 9 578)	3 532 (858; 13 588)	0,413
TGF-β1					
I.	108	9 999 (2 989; 26 301)	10 097 (3 351; 27 709)	9 999 (2 524; 26 301)	0,825
II.	110	10 623 (3 308; 29 866)	↑11 211 (2 963; 31 169)	9 275 (3 440; 27 381)	0,526
III.	104	↓8 991 (3 596; 19 967)	↓8 542 (3 214; 17 822)	9 129 (3 914; 23 007)	0,372
IV.	102	9 479 (2 549; 23 702)	9 474 (2 777; 20 326)	9 648 (2 169; 24 042)	0,834
V.	93	9 731 (3 323; 24 005)	▼9 660 (3 190; 23 626)	10 506 (3 816; 27 038)	0,089

Tab. 14 Vývoj sledovaných parametrů u pacientů v čase...pokračování.

Odběr č.	N	Celkem ¹	Lehká ¹	Těžká ¹	p ²
HYALURONAN					
I.	108	90,32 (16,93; 248,58)	87,66 (20,42; 228,53)	109,98 (10,25; 279,04)	0,407
II.	110	88,75 (16,75; 277,64)	88,75 (22,62; 319,26)	91,45 (1,86; 270,28)	0,859
III.	104	91,22 (15,39; 281,72)	92,14 (15,39; 293,45)	88,65 (12,74; 280,88)	0,889
IV.	102	↓ 70,36 (15,65; 215,39)	75,00 (15,65; 215,39)	65,19 (12,00; 358,72)	0,711
V.	93	▼ ↓ 59,10 (12,58; 192,13)	58,42 (12,58; 192,13)	▼ ↓ 59,10 (11,90; 185,48)	0,563
MPO					
I.	108	26,03 (8,60; 50,04)	25,93 (8,81; 50,04)	26,45 (5,68; 51,57)	0,541
II.	110	↑ 35,51 (15,23; 70,28)	↑ 36,29 (15,52; 74,59)	↑ 34,22 (11,18; 56,99)	0,304
III.	104	29,70 (8,35; 68,75)	↓ 29,70 (8,35; 68,75)	33,75 (3,65; 125,41)	0,625
IV.	102	2872 (8,55; 56,48)	31,82 (10,95; 57,93)	24,23 (6,20; 55,20)	0,133
V.	93	▲ 31,79 (9,28; 55,66)	▲ 31,09 (9,28; 54,55)	31,79 (4,55; 69,68)	0,653
WBC					
I.	104	7,58 (5,10; 13,60)	7,22 (5,00; 13,60)	8,30 (5,23; 14,60)	0,060
II.	104	7,52 (5,35; 11,70)	7,33 (5,52; 11,70)	8,26 (4,16; 10,90)	0,297
III.	99	7,32 (5,05; 11,90)	7,16 (5,08; 11,10)	7,70 (4,87; 12,80)	0,181
IV.	98	↑ 7,74 (4,89; 13,20)	↑ 7,66 (5,27; 12,45)	7,93 (3,49; 13,20)	0,796
V.	88	↓ 7,05 (4,75; 11,67)	↓ 7,05 (4,75; 11,69)	7,08 (4,57; 11,67)	0,183
PAMS					
I.	105	0,40 (0,09; 1,43)	0,48 (0,22; 1,65)	0,20 (0,07; 1,33)	<0,001
II.	102	↑ 0,43 (0,10; 1,42)	↑ 0,49 (0,18; 1,59)	0,24 (0,08; 1,42)	<0,001
III.	95	0,38 (0,10; 1,50)	0,45 (0,22; 1,37)	0,21 (0,08; 1,55)	<0,001
IV.	101	0,38 (0,07; 1,12)	0,45 (0,23; 1,24)	0,18 (0,06; 1,02)	<0,001
V.	87	0,41 (0,08; 1,34)	0,44 (0,22; 1,70)	0,25 (0,06; 0,92)	<0,001
AMS					
I.	105	0,93 (0,49; 2,24)	1,05 (0,53; 2,36)	0,82 (0,44; 1,90)	0,011
II.	104	↑ 0,97 (0,50; 2,43)	1,09 (0,52; 2,49)	0,81 (0,40; 2,30)	0,004
III.	95	↓ 0,97 (0,44; 2,31)	↓ 1,07 (0,50; 2,03)	0,87 (0,42; 2,31)	0,023
IV.	100	0,92 (0,39; 2,26)	1,00 (0,54; 2,31)	0,81 (0,38; 1,93)	0,008
V.	87	↑ 0,95 (0,45; 2,22)	↑ 1,04 (0,50; 2,71)	0,85 (0,38; 1,68)	0,039
CB protein					
I.	105	76,5 (70,4; 82,5)	76,5 (69,8; 81,6)	76,6 (71,1; 85,6)	0,372
II.	103	↑ 80,0 (72,20; 87,2)	↑ 79,6 (72,2; 85,6)	↑ 80,3 (74,5; 87,8)	0,130
III.	93	↓ 77,4 (71,10; 85,7)	↓ 77,1 (71,10; 83,7)	↓ 78,2 (66,1; 87,6)	0,225
IV.	100	78,80 (69,10; 84,3)	78,1 (71,10; 83,2)	79,0 (66,4; 85,4)	0,440
V.	87	▲ ↑ 79,6 (72,0; 87,1)	▲ 79,0 (71,2; 86,8)	▲ ↑ 81,3 (74,2; 88,4)	0,036

Tab. 14 Vývoj sledovaných parametrů u pacientů v čase...pokračování.

Odběr č.	N	Celkem ¹	Lehká ¹	Těžká ¹	p ²
AMS					
Cholesterol					
I.	105	4,90 (3,20; 6,90)	4,90 (3,40; 6,80)	4,90 (2,90; 6,90)	0,507
III.	95	5,00 (3,40; 6,80)	5,00 (3,40; 7,00)	4,90 (3,60; 6,70)	0,880
V.	88	4,90 (3,30; 7,00)	5,00 (3,30; 7,00)	4,90 (3,60; 7,30)	0,783
Triglyceridy					
I.	105	1,46 (0,63; 4,62)	1,37 (0,58; 4,62)	1,52 (0,76; 4,69)	0,390
III.	95	1,48 (0,65; 4,52)	1,43 (0,74; 4,16)	1,60 (0,65; 4,52)	0,438
V.	88	1,45 (0,69; 4,01)	1,45 (0,58; 4,08)	1,56 (0,71; 3,95)	0,488
HDL-cholesterol					
I.	104	1,30 (0,80; 2,10)	1,40 (0,80; 2,10)	1,30 (0,80; 2,30)	0,175
III.	94	1,50 (0,80; 2,50)	1,50 (0,90; 2,10)	1,50 (0,70; 2,50)	0,902
V.	87	1,30 (0,80; 2,30)	1,30 (0,80; 2,30)	1,30 (1,00; 2,40)	0,632
LDL-cholesterol					
I.	92	2,60 (1,50; 4,00)	2,60 (1,50; 4,00)	2,60 (0,80; 4,20)	0,202
III.	88	2,50 (1,30; 4,00)	2,60 (1,20; 4,00)	2,40 (1,40; 4,00)	0,842
V.	87	2,60 (1,50; 4,60)	2,60 (1,50; 4,60)	2,80 (1,30; 5,00)	0,847
CRP					
I.	105	1,50 (1,00; 10,50)	1,20 (1,00; 12,70)	1,60 (1,00; 9,10)	0,357
II.	105	1,30 (1,00; 10,20)	1,30 (1,00; 8,40)	1,10 (1,00; 23,50)	0,939
III.	92	1,30 (1,00; 9,30)	1,20 (1,00; 8,40)	1,30 (1,00; 10,80)	0,987
IV.	100	1,80 (1,00; 18,60)	1,80 (1,00; 19,30)	1,40 (1,00; 9,80)	0,359
V.	87	1,60 (1,00; 28,00)	1,50 (1,00; 28,90)	2,00 (1,00; 28,00)	0,768

¹medián (5; 95-ti procentní percentily)

²Mann Whitney U test

↑ statisticky významný vzestup oproti předchozímu odběru

↓ statisticky významný pokles oproti předchozímu odběru

▲ statisticky významný vzestup oproti počátku

▼ statisticky významný pokles oproti předchozímu odběru

6 ZÁVĚR

Hlavním předmětem zájmu této dizertační práce byla aplikace vybraných metod k analýze oxidačního stresu a studium markerů oxidačního stresu u pacientů s chronickou pankreatitidou (CHP) proti zdravým kontrolním jedincům v delším časovém intervalu.

U pacientů s CHP bylo provedeno celkem pět odběrů, přičemž časový interval mezi jednotlivými odběry činil vždy 6 měsíců. Byla optimalizována a aplikována metoda HPLC-DAD ke stanovení sekundárních produktů lipidové peroxidace – MDA a 4-HNE, dále luminometrická metoda TRAP ke stanovení antioxidační kapacity, spektrofotometrická metoda k analýze dusitanů a ELISA metoda ke stanovení hladiny pro- a protizánětlivých cytokinů (TNF- α , TNF RI, PDGF-AB, TGF- β 1), myeloperoxidázy a hyaluronanu. Jednotlivé markery byly porovnány a analyzovány v plazmě pacientů s chronickou pankreatitidou a u zdravých kontrolních jedinců.

Současně byla pacientům a všem kontrolním jedincům odebírána také krev na základní biochemické vyšetření a krevní obraz. Tyto parametry byly stanoveny standardními analýzami v laboratořích Interní hepatogastroenterologické kliniky Fakultní nemocnice Brno. Po odborné konzultaci byly vybrány následující parametry, které jsou rozhodující v zánětlivém procesu CHP a to: z hematologických parametrů - leukocyty a z biochemických parametrů - pankreatická amyláza, amyláza, CB protein, cholesterol, triglyceridy, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol a C-reaktivní protein. Tyto hematologické a biochemické parametry byly vyhodnoceny a porovnány s kontrolními jedinci a s markery oxidačního stresu ovlivňujících průběh CHP.

U pacientů s chronickou pankreatitidou existuje chronický zánět, o čemž svědčí významně zvýšené hladiny produktů lipidové peroxidace (MDA a 4-HNE), markerů charakterizujících zánět (dusitanů, TNF RI, HA a MPO) a hematologických a biochemických parametrů (leukocytů, triglyceridů a CRP) v porovnání s kontrolními jedinci. Tato skutečnost odkrývá souvislost oxidačního stresu s imunologickými, biochemickými a hematologickými parametry. Hladiny MDA, 4-HNE společně s hladinami MPO, dusitanů, TNF RI a HA v plazmě pacientů s CHP by tedy mohly být vhodnými ukazateli charakterizujícími pacienty s CHP a mohly by mít u těchto pacientů diagnostický význam.

Naproti tomu plazmatické hladiny TNF- α , PDGF-AB a TGF- β 1 byly statisticky významně změněny pouze v některém z pěti provedených odběrů. Koncentrace TNF- α v plazmě pacientů s CHP byly ve všech pěti odběrech nižší ve srovnání s kontrolou. Hladiny PDGF-AB v plazmě pacientů s CHP byly nižší nebo srovnatelné s kontrolními jedinci. Koncentrace TGF- β 1 byly převážně mírně vyšší nebo srovnatelné s kontrolou. Lze říci, že tyto cytokiny nejsou vhodnými markery pro diagnózu CHP.

Průzkumem a orientovanou dotazníkovou akcí byl vyhodnocen potenciální vliv environmentální zátěže a životního stylu jednotlivých pacientů na změny hladin parametrů oxidačního stresu. Bylo zjištěno, že těžkou formu pankreatitidy mají častěji muži než ženy. Naopak věk ani tělesné parametry nejsou významné v souvislosti s tíží chronické pankreatitidy. V rámci etiologie chronické pankreatitidy byl prokázán významný rozdíl ve

vztahu k tíži chronické pankreatitidy. Zdá se, že u těžké chronické pankreatitidy je častější toxická etiologie na úkor idiopatické etiologie ve srovnání s lehkou chronickou pankreatitidou. Z rizikových faktorů se ukázaly jako významné pití alkoholu, kouření, diabetes mellitus a kalcifikace kostí (ve všech případech jsou častěji vázány na těžší formu chronické pankreatitidy).

Potvrdilo se, že u pacientů s chronickou pankreatitidou hraje důležitou roli chronický zánět spojený s oxidačním stresem. Na oxidační stres reaguje organismus zvýšenou produkcí antioxidantů v plazmě pacientů. Tato mírně zvýšená hladina antioxidační kapacity v krvi nicméně není schopna oxidační stres eliminovat.

Oproti původnímu očekávání jsme nepotvrdili zvyšující se hladiny jednotlivých parametrů v časovém intervalu 2,5 let. To je pravděpodobně způsobeno lékovou terapií. Na druhou stranu tato terapie není dostatečně účinná, aby úplně eliminovala oxidační stres a chronický zánět doprovázející chronickou pankreatitidu.

Proto je nutné hledat jiné, ještě účinnější postupy k charakterizaci závažnosti a rozvoje chronické pankreatitidy a její efektivní léčby.

7 LITERATURA

- [1] Lenártová, V., Holovská, K., Pedrajas, J. R., Martínéz-Lara, E., Peinado, J., López-Barea, J., Rosival, I., Košút, P.: *Antioxidant and detoxifying fish enzymes as biomarker of river pollution*. Biomarkers 2, 1997, p. 247-252.
- [2] Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.: *Free radicals in biology and medicine*, Oxford University Press, 1999.
- [3] Free Radicals in Medicine; British Medical Bulletin; a series of expert reviews, Churchill Livingstone, 1993, Vol. 49; No. 2; p. 479-724. ISBN 0-443-04926-2.
- [4] Štípek, S. a kol.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. Grada Publishing Avicenum, 2000. ISBN 80-7169-704-4.
- [5] Zwart, de L.L., Meerman J.H.N., Commandeur and Vermeulen N.P.E.: Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Rad Biol Med.*, 1999, Vol. 26, No. ½, p. 202–226.
- [6] Yu, B.P.: *Cellular Defenses Against Damage From reactive Oxygen Species*. Department of Physiology, The University of Texas Health Science Center, 1994.
- [7] Schreck, R.; Albermann, K.A.J.; Baeuerla, P.A.: Nuclear factor κ B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells. *Free Radical Res Commun.*, 1992, Vol. 17, p. 221-37.
- [8] Cochrane, C.G.: Mechanism of oxidant injury of cells. *Mol Aspect Med.*, 1991, Vol. 12, p. 137-47.
- [9] Scandalios, J.G.: Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant physiology.*, 1993, Vol. 101, p. 7-12.
- [10] Hippeli, S. and Elstner, E.F.: OH-radical-type reactive oxygen species: a short review on the mechanism of OH-radical and peroxynitrite toxicity. *Z. Naturforsch.*, 1997, Vol. 52, p. 555-563.
- [11] Stadtman, E.R.: Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med.*, 1990, Vol. 9, p. 315-325.
- [12] Florence, T.M.: Free radicals antioxidants and cancer prevention. *Proc Nutr Soc Aust Annu Conf.*, 1990, Vol. 15, p. 88-93.
- [13] Acworth, I.N., McCabe, D.R., Maher, T.J. The analysis of free radicals, their reaction products, and antioxidants. In BASKIN, S., SALEM, H. (Eds.) *Oxidants, antioxidants, and free radicals.*, Taylor & Francis, 1997, p. 23-77.
- [14] Squadrito, G.L., Pryor, W.A. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med.*, 1998, Vol. 25, p. 392-403.
- [15] Gloser, J.: *Fyziologie rostlin*. Masarykova univerzita, Brno 1998.

- [16] Valavanidis, A. and Vlachogianni, T.: Integrated Biomarkers in Aquatic Organisms as a Tool for Biomonitoring Environmental Pollution and Improved Ecological Risk Assessment. 2010, *Science advances on environment, toxicology & ecotoxicology issues*, www.chem-tox-ecotox.org.
- [17] Černohorský, T.: Kovy I. (přednášky), Toxikologie, 2001.
- [18] OXIS International Inc.: *About Oxidative Stress Applications* [online]. 2006, poslední revize 2006 [cit. 23. 10. 2009]. Dostupné z: http://www.oxis.com/oxidative_stress_complete.html.
- [19] Grinna, L.S.: Age related changes in the lipids of the microsomal and the mitochondrial membranes of rat liver and kidney. *Mech Ageing Dev.*, 1977, Vol. 6, p. 197-205.
- [20] Aust, S.D.; Morehouse, L. A.; Thomas, C.E.: Role of metals in oxygen radical reactions. *Free Radic Biol Med.*, 1985, Vol. 1, p. 3-25.
- [21] Hochstein, P. and Ernster, L.: ADP-activated lipid peroxidation coupled on TPNH oxidase system of microsomes. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1963, Vol. 12, p. 388-394.
- [22] Minotti, G. and Aust, S.D.: An investigation into the mechanism of citrate- Fe^{2+} dependent lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.*, 1987, Vol. 3, p. 379-387.
- [23] Minotti, G. and Aust, S.D.: The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *J Biol Chem.*, 1987, Vol. 262, p. 1098-1104.
- [24] Esterbauer, H.: Aldehydic products of lipid peroxidation. In: *Free Radicals, Lipid Peroxidation, and cancer*, edited by D.C.H. McBrien and T.F. Slater, Academic, 1982, p. 101-120.
- [25] Esterbauer, H.; Jurgens, G.; Quehenberger, O.; Koller, E.: Autooxidation of human low density lipoprotein loss PUFAs and vitamin E and generation of baldehydes. *J Lipid Res.*, 1987, Vol. 28, p. 495-509.
- [26] Siems, W., Grune, T.: Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med.*, 2003, Vol. 24, No. 4-5, p. 167-175.
- [27] eStránky.cz: *Peroxidace lipidů* [online]. 21. 4. 2006, poslední revize 2008 [cit. 19. 3. 2007]. Dostupné z: <http://www.biology.estranky.cz/clanky/biochemie/peroxidace-lipidu>.
- [28] Prasad, T.K.: Mechanism of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *Plant J.*, 1996, Vol. 10, p. 1017-1026.
- [29] Griffiths, H.R.; Unsworth, J.; Blake, D.R.; Lunec, J.: *Free radical in Chemistry, Pathology and Medicine*. Richelieu, 1988, p 439-454.
- [30] Huggins, T.G.; Wells- Knecht, M.C.; Detorje, N.A.; Baynes, J.W.; Thorpe, S.R.: formation of otyrosine and dityrosinein proteins during radiolytic and metal- catalyzed oxidation. *J Biol Chem.*, Vol. 17, p. 12341- 12437.

- [31] Steiner M., Glantz M., Lekos A. Vitamin E plus aspirin compared with aspirin alone in patients with transient ischemic attacks. *Amer J Clin Nutr.*, 1993, Vol. 57, p. 650-656.
- [32] Ames, B.N.; Gold, L.S.: Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutation Research*, Vol. 250, p. 3-16.
- [33] Cheng, K.C.; Cahill, D.S.; Kasai, H.; Nishimura, S.; Loeb, L.A.: 8-hydroxyguanine an abundant form of oxidative DNA damage, causes G-T and A-C substitutions. *J Biol Chem.*, Vol. 267, p. 166-172.
- [34] Shibutani, S.; Takhesita, M.; Grollman, A.P.: Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation damaged base 8-oxo dG. *Nature*, Vol. 349, p. 431-434.
- [35] Saul, R.L.; Gee, D.; Ames, B.N.: Free radicals, DNA damage, and aging. In: *Modern Biological Theories of Aging*, edited by Warner, H.R., Butler, R.N., Sprott, R.L. and Schneider, E.L.. Raven, 1987, p. 113-129.
- [36] Floyd, R.A.: The rise of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 1990, Vol. 11, p. 1447-1450.
- [37] Backer, J.M. and Weinstein, I.B.: Mitochondrial DNA is a major cellular target for dihydrodiol-epoxide derivate of benzo(a) pyrene. *Science Wash. DC*, 1980, Vol. 209, p. 297-299.
- [38] Niranjana, B.G.; Bhat, N.K.; Avadhani, N.G.: Preferential attack of mitochondrial DNA by aflatoxin B1 during hepatocarcinogenesis. *Science Wash. DC*, 1982, Vol. 215, p. 73-75.
- [39] Lojek, A., Číž, M., Kubala, L.: Volné radikály ve fyziologii živočichů (přednášky), 2007.
- [40] Bowler, C.; Van Camp, W.; Van Montagu, M.; Inéz, D.: Superoxide dismutase in plants. *Critical Review of Plant Science*, 1994, Vol. 13, p. 199-218.
- [41] Lojek, A., Čiz, M., Slavikova, H., Duskova, M., Vondracek J., Kubala L., Racz, I., Hamar, J.: Leukocyte mobilization, chemiluminescence response, and antioxidative capacity of the blood in intestinal ischemia and reperfusion. *Free Radic Res.*, 1997, Vol. 27, p. 359-367.
- [42] Velišek, J.: *Chemie potravin 2*, Osis 1999, s. 328.
- [43] McKersie, Brian D.: *Oxidative Stress*. [online]. 2009, poslední revize 2009 [cit. 23. 10. 2009]. Dostupné z: www.plantstress.com.
- [44] Velišek J.: *Chemie potravin 3*, 1. vyd. Osis 1999, s. 368.
- [45] Neuzil, J., Stocker, R.: Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for α -tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein peroxidation. *J Biol Chem.*, 1994, Vol. 269, p. 16712-16719.
- [46] Peč, P.: *Laboratorní cvičení z biochemie*, UP, Olomouc. 2000.
- [47] Weil, J., Bolton, J., Wertz, J.: *Electron Paramagnetic Resonance. Elementary Theory and Practical Applications*, NY Wiley, 1994.

- [48] Dite, P., Novotny, I., Trna, J., Sevcikova, A.: Autoimmune pancreatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.*, 2008, Vol. 22, p. 131-143.
- [49] Schoenberg, M.H., Birk, D., Beger, H.G.: Oxidative stress in acute and chronic pancreatitis. *Am J Clin Nutr.*, 1995, Vol. 62, p. 1306-1314.
- [50] Frossard, J.L. et al: Concomitant autoimmune and genetic pancreatitis leads to severe inflammatory conditions, *World J Gastroenterol.*, 2008, Vol. 14, p. 2596.
- [51] Dítě, P., Novotný, I., Ševčíková, A., Dolina, J.: Chronická pankreatitida ve stáří. *Čes Ger Rev*, 2005, Vol. 3, p. 3.
- [52] Ševčíková, A. et al.: Idiopatická chronická pankreatitida – výsledky prospektivní studie. *Čes a Slov Gastroent a Hepatol.*, 2006, Vol. 60, p. 119-122.
- [53] Bendicho, M.T. et al.: Polymorphism of cytokine genes (TGF-beta1, IFN-gamma, IL-6, IL-10, and TNF-alpha) in patients with chronic pancreatitis. *Pancreas.*, 2005, Vol. 30, p. 333-336.
- [54] Bhanot, U.K., Möller, P.: Mechanisms of parenchymal injury and signaling pathways in ectatic ducts of chronic pancreatitis: implications for pancreatic carcinogenesis. *Lab Invest.*, 2009, Vol. 89, p. 489-97.
- [55] Whitcomb, D.C.: Inflammation and cancer V. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 2004, Vol. 287, p. 315–319.
- [56] Whitcomb, D.C.: Mechanisms of disease: Advances in understanding the mechanisms leading to chronic pancreatitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.*, 2004, Vol. 1, p. 46-52.
- [57] Lillmoen, K.D., Yeo, C.J., Cameron, J.L.: Pancreatic cancer: state-of-the-art care. *CA Cancer J Clin.*, 2000, Vol. 50, p. 241-268.
- [58] Friess, H. et al.: Growth factors and cytokines in pancreatic carcinogenesis. *Annals of New York Academy of Sciences*, 1999, Vol. 880, p. 110-121.
- [59] Lowenfels, A.B. et al.: Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med.*, 1993, Vol. 328, p. 1433-1437.
- [60] Whitcomb, D.C., Applebaum, S., Martin, S.P.: Hereditary pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1999, Vol. 880, p. 201-209.
- [61] Lowenfels, A.B. et al.: Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *J Natl Cancer Inst.*, 1997, Vol. 89, p. 442-446.
- [62] Le, X. et al.: Molecular regulation of constitutive expression of interleukin-8 in human pancreatic adenocarcinoma. *Interferon Cytokine Res.*, 2000, Vol. 20, p. 935-946.
- [63] Kalthoff, H. et al.: Tumor necrosis factor (TNF) up-regulates the expression of p75 but not p55 TNF receptors, and both receptors mediate, independently of each other, up-regulation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor mRNA. *J Biol Chem.*, 1993, Vol. 268, p. 2762-2766.
- [64] O'Byrne, K.J., Dalgleish, A.G.: Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. *Br J Cancer.*, 2001, Vol. 85, p. 473-483.
- [65] Garcea, G. et al.: Role of inflammation in pancreatic carcinogenesis and the implications for future therapy. *Pancreatology*, 2005, Vol. 5, p. 514-529.

- [66] Farrow, B., Evets, B.M.: Inflammation and the development of pancreatic cancer. *Surg Oncol.*, 2002, Vol. 10, p. 153-169.
- [67] Tsuji, S. et al.: Review article: inflammation-related promotion of gastrointestinal carcinogenesis--a perigenetic pathway. *Aliment Pharmacol Ther.*, 2003, Vol. 18, p. 82-89.
- [68] Dite, P., Stary, K., Novotny, I.: Incidence of chronic pancreatitis in Czech Republic. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2001, Vol. 13, p. 749-750.
- [69] Etemed, B., Whitcomb, D.C.: Chronic pncreatitis: diagnosis, classification and new genetic development. *Gastroenterology*, 2001, Vol. 12, p. 682-707.
- [70] Go Pets America, Inc. *Pancreas*. [online]. 2003 – 2010, poslední revize 2010 [cit. 29. 6. 2010]. Dostupné z: www.gopetsamerica.com/anatomy/pancreas.aspx.
- [71] Bhanot, U.K. and Möller, P.: Mechanisms of parenchymal injury and signaling pathways in ectatic ducts of chronic pancreatitis: implications for pancreatic carcinogenesis. *Lab Invest.*, 2009, Vol. 89, p. 489-497.
- [72] Karaouzene, N. et al.: Effects of the association of aging and obesity on lipids, lipoproteins and oxidative stress biomarkers: A comparison of older with young men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.*, 2010, [Epub ahead of print].
- [73] Hamar, J. et al.: Time Course of Leukocyte Response and Free Radical Release in an Early Reperfusion Injury of the Superior Mesenteric Artery. *Physiol. Res.*, 2003, Vol. 52, p. 417-423.
- [74] Kubala et al.: Perioperative and postoperative course of cytokines and the metabolic activity of neutrophils in human cardiac operations and heart transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.*, 2002, Vol. 124, p. 1122-1129.
- [75] Lojek et al.: Human neutrophil mobilization during open heart surgery. *Physiol Res.*, 1992, Vol. 41, p. 431-436.
- [76] Bhardwaj et al.: A randomized controlled trial of antioxidant supplementation for pain relief in patients with chronic pancreatitis. *Gastroenterology*, 2009, Vol. 136, p. 149-159e2.
- [77] Verlaan, M. et al.: Assessment of oxidative stress in chronic pancreatitis patients. *World J Gastroenterol.*, 2006, Vol. 12, p. 5705-5710.
- [78] Papezikova, I. et al.: The effect of aldose reductase inhibition by JMC-2004 on hyperglycemia-induced endothelial dysfunction. *Neuro Endocrinol Lett.*, 2008, Vol. 29, p. 775-778.
- [79] Pekarova, M. et al.: Continuous electrochemical monitoring of nitric oxide production in murine macrophage cell line RAW 264.7. *Anal Bioanal Chem.*, 2009, Vol. 394, p. 1497-1504.
- [80] Lojek et al.: Leukocyte mobilization, chemiluminescence response, and antioxidative capacity of the blood in intestinal ischemia and reperfusion. *Free Radic Res.*, 1997, Vol. 27, p. 359-367.
- [81] Schoenberg, M.H. et al.: Lipid peroxidation and glutathione metabolism in chronic pancreatitis. *Pancreas.*, 1995, Vol. 10, p. 36-43.
- [82] Malka, D. et al.: Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut.*, 2002, Vol. 51, p. 849-852.

- [83] Tüközkan, N., Erdamar, H., Seven, I.: Measurement of Total Malondialdehyde in Plasma and Tissues by High-Performance Liquid Chromatography and Thiobarbituric Acid Assay. *Firat Tıp Dergisi.*, 2006, Vol. 11, No. 2, p. 88-92.
- [84] Selley, M.L., Bourne, D.J., Bartlett, M.R., Tymms, K.E., Brook, A.S., Duffield, A.M., Ardlie, N.G.: Occurrence of (E)-4-hydroxy-2-nonenal in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.*, 1992, Vol. 51, No. 4, p. 481-484.
- [85] Grune, T., Siems, W.G., Schneider, W.: Accumulation of aldehydic lipid peroxidation products during postanoxic reoxygenation of isolated rat hepatocytes. *Free Radic Biol Med.*, 1993, Vol. 15, No. 2, p. 125-132.
- [86] Strohmaier, H., Hinghofer-Szalkay, H., Schaur, R.J.: Detection of 4-hydroxynonenal (HNE) as a physiological component in human plasma. *J Lipid Mediat Cell Signal.*, 1995, Vol. 11, No. 1, p. 51-61.
- [87] Kinter, M., Sullivan, S., Roberts, R.J., Spitz, D.: Trace quantitation of 4-hydroxy-2-nonenal in biological samples as its oxime-bis-tert.-butyldimethylsilyl derivative using 3-hydroxynonenal as an internal standard. *J Chromatogr.*, 1992, Vol. 578, No. 1, p. 9-16.
- [88] Quinlan, G.J., Evans, T.W., Gutteridge, J.M.: 4-hydroxy-2-nonenal levels increase in the plasma of patients with adult respiratory distress syndrome as linoleic acid appears to fall. *Free Radic Res.*, 1994, Vol. 21, No. 2, p. 95-106.
- [89] Dalle-Donne, I. et al.: Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clin Chem.*, 2006, Vol. 52, p. 601-623.
- [90] Giustarini, D. et al.: Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci.*, 2009, Vol. 46, p. 241-281.
- [91] Negre-Salvayre, A. et al.: Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br J Pharmacol.*, 2008, Vol. 153, p. 6-20.
- [92] Nair, U., Bartsch, H., Nair, J.: Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: a review of published adduct types and levels in humans. *Free Radic Biol Med.*, 2007, Vol. 43, p. 1109-1120.
- [93] Ergen, A. et al.: Effects of myeloperoxidase 2463 G/A gene polymorphism and plasma levels on coronary artery disease. *Mol Biol Rep.*, 2010, [Epub ahead of print].
- [94] Karacay, O. et al.: A quantitative evaluation of total antioxidant status and oxidative stress markers in preeclampsia and gestational diabetic patients in 24-36 weeks of gestation. *Diabetes Res Clin Pract.*, 2010, [Epub ahead of print].
- [95] Lane, A.E. et al.: The myeloperoxidase-derived oxidant HOSCN inhibits protein tyrosine phosphatases and modulates cell signalling via the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in macrophages. *Biochem J.*, 2010, [Epub ahead of print].
- [96] Vodrážka, Z.: *Biochemie*, Academia, 1999, Praha.
- [97] Klebanoff, S.J.: Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol.*, 2005, Vol. 77, p. 598-625.

- [98] Hansson, M. et al.: Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys.*, 2006, Vol. 445, p. 214-224.
- [99] Lau, D., Baldus, S.: Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacol Ther.*, 2006, Vol. 111, p. 16-26.
- [100] Chan, D., Ng, L.L.: Biomarkers in acute myocardial infarction. *BMC Med.*, 2010, Vol. 8, p. 34.
- [101] Wheatley-Price, P. et al.: Myeloperoxidase and superoxide dismutase polymorphisms are associated with an increased risk of developing pancreatic adenocarcinoma. *Cancer.*, 2008, Vol. 112, p. 1037-1042.
- [102] Dereure, O.: Hyaluronic acid and immunity. *Ann Dermatol Venereol.*, 2010, Vol. 137, p. 26-29.
- [103] Lataillade, J.J. et al.: Implication of hyaluronic acid in normal and pathological angiogenesis. Application for cellular engineering. *Ann Dermatol Venereol.*, 2010, Vol. 137, p. 15-22.
- [104] Berbis, P.: Hyaluronan in inflammation, auto-immunity and cardio-vascular diseases. *Ann Dermatol Venereol.*, 2010, Vol. 137, p. 40-43.
- [105] Hinghofer-Szalkay, H.G. et al.: Post-Exercise Decrease of Plasma Hyaluronan: Increased Clearance or Diminished Production? *Physiol. Res.*, 2002, Vol. 51, p. 139-144.
- [106] Vigetti, D. et al.: Proinflammatory cytokines induce hyaluronan synthesis and monocyte adhesion in human endothelial cells through hyaluronan synthase 2 (HAS2) and the nuclear factor κ -B (NF- κ B) pathway. *J Biol Chem.*, 2010, [Epub ahead of print].
- [107] Okano, N. et al.: Impairment of Hepatosplanchnic Oxygenation and Increase of Serum Hyaluronate During Normothermic and Mild Hypothermic Cardiopulmonary Bypass. *Anesth Analg.*, 2002, Vol. 95, p. 278-86.
- [108] Löhr, M. et al.: Release of hyaluronan and laminin into pancreatic secretions. *Digestion.*, 1999, Vol. 60, p. 48-55.
- [109] Löhr, M. et al.: Serum levels of extracellular matrix in acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology*, 1999, Vol. 46, p. 3263-3270.
- [110] Ferenčík, M., Rovenský, J., Shoenfeld, Y., Mařha, V.: *Imunitní systém*, Nakladatelství Grada Publishing, a.s., 2005. ISBN 80-247-1196-6.
- [111] Cheryl, L. et al.: *Chest.*, 2003; Vol. 124, p. 1103-1115.
- [112] Nicola, N.A., Begley, C.G., Metcalf, D.: Identification of the human analogue of a regulator that induces differentiation in murine leukaemic cells, *Nature*, 1985, Vol. 314, p. 625-628.
- [113] Hořejší, V., Batůňková, J.: *Základy imunologie*, Nakladatelství Triton, 2005. ISBN 80-7254-686-4.
- [114] Šterzl, J.: *Imunitní systém a jeho fyziologické funkce*, Nakladatelství Česká imunologická společnost - ČIS, 1993.

- [115] National Cancer Institute. *Cytokines and Inflammatory Response. Pathway information provided by BioCarta*. [online]. 2010, poslední revize 2010 [cit. 22. 6. 2010]. Dostupné z: http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta/h_inflamPathway.
- [116] Punchard, N.A., Kelly, F.J (eds.): *Free Radicals: A Practical Approach*. OxfordUniversity Press, 1996, pp. 133-145.
- [117] Slavíková, H., Lojek, A., Hamar, J., Dušková, M., Kubala, L., Vondráček, J., Číž, M.: Total Antioxidant Capacity of Serum Increased in Early But Not Late Period After Intestinal Ischemia in Rats. *Free Radic Biol Med.*, 1998, Vol. 25, p. 9-18.
- [118] Wayner, D., Burton, G., Ingold, K. et al.: The Relative Contributions of Vitamin E, Urate, Ascorbate, and Proteins to the Total Peroxyl Radical-Trapping Antioxidant Activity of Human Blood and Plasma. *Biochim Biophys Acta*, 1987, Vol. 924, p. 408-419.
- [119] Paulová, H., Bochořáková, H., Táborská, E.: Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro., *Chem. Listy*, 2004, Vol. 98, s. 174-179.
- [120] Nanjo, F., Goto, K., Seto, R., Suzuki, M., Sakai, M., Hara, Y.: Scavenging Effects of Tea Catechins and Their Derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil Radical. *Free Radic Biol Med.*, 1996, Vol. 21, p. 895.
- [121] Grootveld, M., Halliwell, B.: An Aromatic Hydroxylation Assay for hydroxyl Radicals Utilizing HPLC. *Free Radic Res Commun.*, 1986, Vol. 1, p. 243-250.
- [122] Green, L.C. et al.: Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.*, 1982, Vol. 126, p. 131-138.
- [123] Leqium, M.L.: Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clin Chem.*, 2005, Vol. 51, p. 2415–2418.
- [124] R&D Systems, Inc. *Quantikine® ELISA Assay Principle*. [online]. 2010, poslední revize 2010 [cit. 20. 6. 2010]. Dostupné z: www.rndsystems.com.
- [125] Agilent Technologies. [online]. 2010, poslední revize 2010 [cit. 15. 2. 2010]. Dostupné z: www.chem.agilent.com.
- [126] Churáček, J., Jandera, P.: *Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie*, SNTL, 1984.
- [127] Matsumoto, M. et al.: Serum vitamin E, lipid peroxide and glutathione peroxidase in patients with chronic pancreatitis. *Clin Chim Acta.*, 1981, Vol. 110, p. 121–125.
- [128] Durgaprasad, S. et al.: A pilot study of the antioxidant effect of curcumin in tropical pancreatitis. *Indian J Med Res.*, 2005, Vol. 122, p. 315–318.
- [129] Casini, A. et al.: Collagen type I synthesized by pancreatic periacinar stellate cells (PSC) co-localizes with lipid peroxidation-derived aldehydes in chronic alcoholic pancreatitis. *J Pathol.*, 2000, Vol. 192, p. 81–89.
- [130] Ganesh, Pai C. and Sreejayan, Rao M.N.: (1999). Evidence for oxidant stress in chronic pancreatitis. *Indian J Gastroenterol.*, 1999, Vol. 18, p. 156–157.
- [131] Guyan, P.M. et al.: Heightened free radical activity in pancreatitis. *Free Radic Biol Med.*, 1990, Vol. 8, p. 347–354.

- [132] Santini, S.A. et al.: Liver, pancreas and biliary tract enhanced lipoperoxidation products in pure pancreatic juice: evidence for organspecific oxidative stress in chronic pancreatitis. *Dig Liver Dis.*, 2003, Vol. 35, p. 888–892.
- [133] Kalvaria, I. et al.: Biochemical vitamin E deficiency in chronic pancreatitis. *Int J Pancreatol.*, 1986, Vol. 1, p. 119–128.
- [134] Mathew, P. et al.: Antioxidants in hereditary pancreatitis. *Am J Gastroenterol.*, 1996, Vol. 91, p. 1558–1562.
- [135] Morris-Stiff, G.J. et al.: The antioxidant profiles of patients with recurrent acute and chronic pancreatitis. *Am J Gastroenterol.*, 1999, Vol. 94, p. 2135–2140.
- [136] Sajewicz, W. et al.: Blood plasma antioxidant defense in patients with pancreatitis. *Pancreas.*, 2006, Vol. 32, p. 139–44.
- [137] Kirk, G.R. et al.: Combined antioxidant therapy reduces pain and improves quality of life in chronic pancreatitis. *J Gastrointest Surg.*, 2006, Vol. 10, p. 499–503.
- [138] Drozdov, V.N. et al.: Change of nitric oxide metabolites in patients with chronic pancreatitis. *Eksp Klin Gastroenterol.*, 2008, Vol. 7, p. 33–37.
- [139] Morselli-Labate, A.M. et al.: Hydrogen sulfide, nitric oxide and a molecular mass 66 u substance in the exhaled breath of chronic pancreatitis patients. *Pancreatology.*, 2007, Vol. 7, p. 497–504.
- [140] Diakowska, D. et al.: Abnormal metabolism of triglycerides fractions in chronic pancreatitis and results after the operation treatment. *Pol Merkur Lekarski.*, 2005, Vol. 108, p. 629–33.

8 SEZNAM ZKRATEK

ABAP	2,2-azobis-(2-aminodinopropan)hydrochlorid
ADP	Adenosindifosfát
AMS	Amyláza
ATP	Adenosintrifosfát
cGPx	Cytosolová glutathionperoxidáza
CL	Chemiluminiscence
CoQ	Koenzym Q
CRP	C-reaktivní protein
DAD	Detektor Diode – Array
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DNPH	Dinitrofenylhydrazin
EDTA	Ethylen-diamin-tetraoctová kyselina
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay – Imunoenzymatická analýza
FL	Fluorescence
GSH	Glutathion
GST	Glutathiontransferáza
HDL	High density lipoprotein - vysokomolekulární lipoproteinn
HDL-chol	HDL-cholesterol
4-HNE	4-hydroxy-2-trans-nonenal (4-hydroxynonenal)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CHP	Chronická pankreatitida
IgG _x	Imunoglobulin
iNOS	Inducibilní syntáza oxidu dusnatého
KAT	Kataláza
LC	Kapalinová chromatografie
LDL	Nízkomolekulární lipoprotein
LDL-chol	LDL-cholesterol
MDA	Malondialdehyd
MPO	Myeloperoxidáza
NADH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NO	Oxid dusnatý

NOS	Syntáza oxidu dusnatého
PAMS	Pankreatická amyláza
PSCs	Pankreatické stelátové buňky
PHGPx	Fosfolipidhydroperoxid glutathionperoxidáza
PMN	Polymorfonukleární neutrofily
PUFAs	Polynenasycené mastné kyseliny
RNS	Reaktivní dusíkové radikály
RONs	Reaktivní volné kyslíkové a dusíkové radikály
ROS	Reaktivní kyslíkové radikály
SOD	Superoxiddismutáza
TBA	Thiobarbiturová kyselina
TG	Triglyceridy
TRAP	Total Peroxyl Radical-Trapping Antioxidant Parameter
TROLOX	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina
UV-VIS	Ultrafialová a viditelná oblast světla
WBC	White blood cells – leukocyty

9 PŘÍLOHY

SEZNAM PUBLIKACÍ

Příloha 1

Podborská, M., Lojek, A., Kubala, L., Buňková, R., Márová, I., Ševčíková, A., Trna, J., Dítě, P.: Lipid peroxidation products in plasma of patients with chronic pancreatitis. *Chem. Listy*, 2008, Vol. 99, p. 1234–2345.

Příloha 2

Podborska, M., Sevcikova, A., Trna, J., Dite, P., Lojek, A., Kubala, L.: Increased markers of oxidative stress in plasma of patients with chronic pancreatitis. *Neuroendocrinol Lett.*, 2009, Vol. 30, p. 116-120.)

Příloha 3

Buňková, R., Papežíková, I., Podborská, M., Lojek, A.: Effect of uric acid on oxidative damage. *Chem. Listy*, 2007, Vol. 101, p. 170-171.

Příloha 4

Příprava manuskriptu:

Breusing, N., Grune, T., Andrisic, L., Mustafa, A., Bartosz, G., Biasi, F., orovic, S., Bravo, L., Casals, I., Casillas, R., Dinischiotu, A., Drzewinska, J., Faber, H., Fauzi, N.M., Galecka, A., Gambini, J., Gradinaru, D., Kokkola, T., Lojek, A., Łuczaj, W., Margina, D., Mascia, C., Mateos, R., Meinitzer, A., Mitjavila, M.T., Mrakovcic, L., Munteanu, M.C., Podborska, M., Poli, G., Sicinska, P., Skrzydlewska, E., Vina, J., Wiswedel, I., Zarkovic, N., Zelzer, S., Spickett, C.: An interlaboratory validation of methods of lipid peroxidation measurement in UVA-treated human plasma samples. *Free Rad Res.*, 2010.

CURRICULUM VITAE (Příloha 5)

PŘÍLOHA 1

PŘÍLOHA 2

PŘÍLOHA 3

PŘÍLOHA 4

PŘÍLOHA 5

CURICULUM VITAE



Osobní údaje:

Jméno a příjmení:

Martina Lízalová, rozená Podborská

Bydliště:

Hlavní 372, 664 61 Rajhradice

Spojení:

mobil: +420 603 708 770

Email:

xcpodborska@fch.vutbr.cz

Datum a místo narození:

1. září 1980 v Brně

Rodinný stav:

vdaná

Vzdělání:

1992 – 1995

Gymnázium Matyáše Lercha, Žižkova 55, Brno;
nástup na studijní obor sedmiletého studia

1995 – 2000

Gymnázium Matyáše Lercha, Žižkova 55, Brno;
přestup na bilingvní sekci; studijní obor pětiletého
studia se speciálním zaměřením na výuku
vybraných předmětů v jazyce francouzském;
zakončeno bilingvní maturitou

2000 – 2005

Vysoké učení technické – Fakulta chemická,
Purkyňova 118, Brno; studijní magisterský
program, obor Chemie a technologie ochrany
životního prostředí

Jazyky:

Francouzský jazyk:

středně aktivní psaný i mluvený projev;
moje maturitní zkouška z jazyka francouzského je
rovnocenná státní všeobecné jazykové zkoušce
na státních jazykových školách

konané

Anglický jazyk:

pasivně psaný i mluvený projev

Německý jazyk:

základní znalost

Přehled praxe:

08-09/2005: Ekoline s.r.o.

Absolvovala jsem dvouměsíční praxi ve firmě **Ekoline s.r.o.**, kde jsem se seznámila s ochranou životního prostředí aplikovanou do praxe, tzn. s problematikou jako ochrana zdraví a bezpečnost práce, sledování nebezpečných látek, informatika o chemických látkách a přípravcích a současná platná legislativa o chemických látkách a přípravcích.

11/2005 –současnost: Biofyzikální ústav AV ČR

11/2005 – 12/2007: Biofyzikální ústav AV ČR

Pozice vědeckého a výzkumného pracovníka v Laboratoři biofyziky DNA a genomové bioinformatiky, kde studuji strukturu a konformační změny molekuly DNA, vyvolané působením UV – záření na plazmidovou DNA. Současně jsem si zde rozšířila znalosti z oblasti Molekulární biologie.

1/2007 – současnost: Biofyzikální ústav AV ČR

Pracuji na doktorandské pozici na Oddělení patofyziologie volných radikálů. Získala jsem praktické zkušenosti s metodami – HPLC-DAD (ke stanovení produktů lipidové peroxidace v lidské plazmě); HPLC-ECD (stanovení serotoninu); luminometrie, fluorimetrie a ELISA. Tyto metody a zejména kapalinová chromatografie jsou mojí hlavní pracovní náplní.

SEZNAM PUBLIKACÍ

1. Podborská, M., Lojek, A., Kubala, L., Buňková, R., Márová, I., Ševčíková, A., Trna, J., Dítě, P.: Lipid peroxidation products in plasma of patients with chronic pancreatitis. *Chem. Listy*, 2008, Vol. 99, p. 1234–2345.
2. Podborska, M., Sevcikova, A., Trna, J., Dite, P., Lojek, A., Kubala, L.: Increased markers of oxidative stress in plasma of patients with chronic pancreatitis. *Neuroendocrinol Lett.*, 2009, Vol. 30, p. 116-120.
3. Buňková, R., Papežíková, I., Podborská, M., Lojek, A.: Effect of uric acid on oxidative damage. *Chem. Listy*, 2007, Vol. 101, p. 170-171.
4. Kovaříková, V., Podborská, M., Dočekalová, H.: Assessment of metal bioavailability in soils by the DGT technique. *Chem. Listy*, 2005, Vol. 99, p. 145-148.
5. Kovaříková, V., Dočekalová, H., Dočekal, B., Podborská, M.: Use of the diffusive gradients in thin films technique (DGT) with various diffusive gels for characterization of sewage sludge-contaminated soils. *Anal Bioanal Chem.*, 2007, Vol. 389, p. 2303-2311.

6. Příprava manuskriptu:

Breusing, N., Grune, T., Andrisic, L., Mustafa, A., Bartosz, G., Biasi, F., orovic, S., Bravo, L., Casals, I., Casillas, R., Dinischiotu, A., Drzewinska, J., Faber, H., Fauzi, N.M., Galecka, A., Gambini, J., Gradinaru, D., Kokkola, T., Lojek, A., Łuczaj, W., Margina, D., Mascia, C., Mateos, R., Meinitzer, A., Mitjavila, M.T., Mrakovcic, L., Munteanu, M.C., Podborská, M., Poli, G., Sicinska, P., Skrzydlewska, E., Vina, J., Wiswedel, I., Zarkovic, N., Zelzer, S., Spickett, C.: An interlaboratory validation of methods of lipid peroxidation measurement in UVA-treated human plasma samples. *Free Rad Res.*, 2010.

SEZNAM PŘÍSPĚVKŮ NA NÁRODNÍCH A MEZINÁRODNÍCH KONFERENCÍCH

1. Buňková, R., Papežíková, I., Podborská, M., Lojek, A.: Effect of uric acid on oxidative damage.: *XII. mezioborová česko-slovenská toxikologická konference, Praha, 11. 6. – 13. 6. 2007. Book of abstracts.* ISBN: 978-80-7071-283-2.
2. Podborská, M., Lojek, A., Kubala, L., Buňková, R., Márová, I., Ševčíková, A., Trna, J., Dítě, P.: Lipid peroxidation products in plasma of patients with chronic pancreatitis. *4th Meeting on Chemistry and Life, Brno, 9-11 September, 2008. Book of abstracts, Faculty of Chemistry, University of Technology Brno.* Edit. By P. Dzik, 2008, p. 2.100.
3. Podborská, M., Lojek, A., Kubala, L., Buňková, R., Márová, I., Ševčíková, A., Trna, J., Dítě, P.: Produkty lipidové peroxidace v plazmě pacientů s chronickou pankreatitidou. *XXV. sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů a XII. kongres českých a slovenských imunologů, Praha, 29. 10 – 1. 11. 2008. Alergie, roč. 10, Suppl. 2, 2008.* ISSN: 1212-3536.
4. Podborská, M., Ševčíková, A., Kubala, L., Trna, J., Dítě, P., Lojek, A.: Products od lipid peroxidation and hematological parameters in plasma of patients with chronic pancreatitis. *Mezioborová česko-slovenská toxikologická konference („TOXCON 2009“), Brno, 1. – 3. 6. 2009.*