



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM AKTIVITY ENZYMŮVÝCH A NÍZKOMOLEKULÁRNÍCH ANTIOXIDAČNÍCH SYSTÉMŮ

STUDY OF ACTIVITY OF ENZYMA AND LOW MOLECULAR WEIGHT ANTIOXIDANT SYSTEMS

DISERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. SIMONA MACUCHOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2010

ABSTRAKT

Oxidační procesy hrají v buňce důležitou roli ve fyziologických i patologických procesech. Rovnováha těchto procesů je zajišťována vzájemně kooperujícími antioxidačními systémy, pro jejichž správnou činnost v organismu je nutný dostatečný obsah látek s antioxidačními účinky.

Předložená práce je zaměřena na vývoj a optimalizaci metod stanovení významných neenzymových a enzymových antioxidantů a testování celkové antioxidační kapacity vybraného biologického materiálu.

Byly optimalizovány metody extrakce a stanovení obsahu vitamínu E a karotenoidů a stanovení aktivit superoxiddismutasy, katalasy, peroxidasy a lipoxygenasy ve sladovnickém ječmeni a ve sladu. Pro analýzu obsahu vitamínu E, fenolických sloučenin a karotenoidů byly použity RP-HPLC a HPLC/ESI-MS, ke stanovení enzymových aktivit byly zvoleny spektrofotometrické metody. Pro analýzu aktivit katalasy a lipoxygenasy byly vyvinuty nové kolorimetrické metody a porovnány s přímými metodami v UV oblasti. Aktivita SOD byla stanovována komerčním diagnostickým setem. Pro peroxidasu byla zavedena kolorimetrická metoda. U enzymových metod byly stanoveny některé kinetické parametry.

Optimalizované metody byly použity při analýzách antioxidantů v rostlinném materiálu – v ječmeni a ve sladu – v souborech vzorků o šesti odrůdách, pěstěných na čtyřech různých lokalitách po dobu dvou let. Obsah individuálních antioxidantů se lišil v závislosti na odrůdě, většinou však nebyly nalezeny významné rozdíly v hladinách v závislosti na pěstební lokalitě. Patrně největší vliv na hladiny nízkomolekulárních i enzymových antioxidantů mají klimatické podmínky v dané lokalitě; oxidační procesy jsou ovlivňovány jednak množstvím vláhy, jednak slunečním svitem, který indukují oxidační procesy v pěstovaných rostlinách. Aktivita antioxidantů v obilkách ječmene prudce narůstá během procesu sladování; za zvýšené teploty a vlhkosti dochází nejprve k aktivaci enzymových systémů včetně těch antioxidačních. V obilce probíhá zvýšená metabolická aktivita, během níž lze předpokládat zvýšenou tvorbu radikálů; za tímto účelem mohou být aktivovány ostatní antioxidační systémy, aby ochránily buňky před poškozením oxidačním stresem.

V další části práce byly zavedené metody využity při klinických studiích hodnotících vliv exogenně přijímaných antioxidantů na metabolický a antioxidační status lidského organismu.

První klinická studie byla zaměřena na sledování vlivu suplementace potravinovým doplňkem obsahujícím nenasycené mastné kyseliny a vitamin E na metabolismus jedinců s hyperlipidemií. Po tříměsíčním podávání preparátu došlo ke zlepšení profilu parametrů metabolismu lipidů a ke zvýšení hladin sérových antioxidantů. Druhá studie sledovala hladiny enzymových a neenzymových antioxidantů u zdravých jedinců po dočasně zvýšeném příjmu potravin bohatých na antioxidanty. Po dvoutříměsíční suplementaci došlo k mírnému nárůstu obsahu fenolických látek v plazmě. Celková antioxidační kapacita ani aktivity enzymových antioxidantů nebyly ovlivněny. Z výsledků klinických studií je patrné, že doplňování antioxidantů v přirozené formě nebo ve formě potravinového doplňku neovlivňuje výrazně metabolismus zdravých jedinců, ale u jedinců trpících chronickými civilizačními chorobami může vhodně zvolená suplementace pozitivně ovlivnit jejich zdravotní stav.

Výsledky práce potvrzují, že zavedené metody jsou dobře použitelné k analýze parametrů posuzujících antioxidační stav organismu a jsou vhodné i k monitoringu exogenního příjmu antioxidantů.

ABSTRACT

Oxidative processes play important role in cell physiology and pathology as well. Balance of these processes is supplied by cooperating antioxidative systems; function of antioxidant defense systems depends on high levels of antioxidants in organism.

Presented work is focused on development and optimization of methods for analysis of important enzyme and non-enzyme antioxidants as well as total antioxidant capacity of selected types of biological material.

Extractions and analyses of vitamin E, carotenoids, superoxide dismutase, catalase, peroxidase and lipoxygenase in barley and malt were optimized. RP-HPLC and HPLC/ESI-MS were used for analysis of vitamin E, phenolic and carotenoid content, spectrophotometry was used for enzymes activity analysis. A new methods for catalase and lipoxygenase activities were developed and compared with direct UV methods. Superoxide dismutase activity was determined by commercial diagnostic kit. A colorimetric method was used for peroxidase activity determination. Some kinetic parameters of enzymes were provided too.

Optimized methods were used in the analyses of antioxidants in plant material - in barley and malt - in sets of samples of 6 varieties cultivated in four different locations for two years. Content of individual antioxidants differed depending on the variety, but usually were not found significant differences in the levels, depending on growing location. Perhaps climatic conditions have the greatest influence on levels of low molecular weight and enzymatic antioxidants at the specific location; oxidation processes are influenced both the quantity of moisture, both by sunlight, which induces oxidative processes in cultivated plants. The activity of antioxidants in barley caryopses is rapidly increasing during the malting process; an elevated temperature and moistness first induces activation the enzyme systems including antioxidant. In caryopsis is metabolic activity increased during which we can expect an increased production of radicals; for this purpose can antioxidant systems be activated that protect cells from damage by oxidative stress.

In the second part of work optimized methods were applied in two clinical trials focused on study of the influence of exogenous antioxidants intake on metabolic and antioxidant status in human organism. In the first clinical study influence of food supplement containing polyunsaturated fatty acids and vitamin E on metabolism of hyperlipidaemics was evaluated. After 3-month supplementation a lipid profile was improved and serum antioxidant levels increased. The second experiment was focused on enzyme and non-enzyme antioxidant levels in healthy subjects after temporarily intake of specific foods rich in antioxidants. After two-month intake plasma phenolic substances were slightly increased. Total antioxidant capacity and activities of enzyme antioxidants were not affected. Results of both clinical experiments showed that supplying of antioxidants in natural form or in the form of food supplements

does not markedly affect metabolism of healthy subjects, while in patients with chronic diseases antioxidant supplementation can positively influence metabolic status.

Results of this work showed that optimized methods are suitable for analyses of antioxidant status parameters and also for monitoring of exogenous antioxidant intake.

KLÍČOVÁ SLOVA

Nízkomolekulární antioxidanty, enzymové antioxidanty, celková antioxidační aktivita, hyperlipidemie, oxidační stres

KEYWORDS

Low-molecular weight antioxidants, antioxidant enzymes, total antioxidant activity, hyperlipidaemia, oxidative stress

MACUCHOVÁ, S.: Studium aktivity enzymových a nízkomolekulárních antioxidačních systémů. Brno, 2010. 147 str. Disertační práce na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně, Ústavu fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí disertační práce Doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za odborné vedení a cenné rady v průběhu studia i při vzniku této práce. Můj dík patří rovněž kolektivu laboratoře speciálních analýz Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Brně za pomoc při zpracování vzorků a jejich analýze. V neposlední řadě děkuji své rodině za trpělivost a morální podporu během celého studia.

OBSAH

1. Úvod.....	11
2. Teoretická část.....	12
2.1. Reaktivní formy kyslíku a dusíku	12
2.1.1. Reaktivní formy kyslíku	13
2.1.1.1. Superoxid.....	14
2.1.1.2. Peroxid vodíku.....	15
2.1.1.3. Hydroxylový radikál.....	15
2.1.1.4. Singletový kyslík	16
2.1.1.5. Kyselina chlorná.....	16
2.1.2. Reaktivní formy dusíku	16
2.1.2.1. Oxid dusnatý.....	16
2.1.2.2. Peroxonitril	16
2.2. Úloha ROS v oxidačním poškození organismu	17
2.2.1. Peroxidace lipidů	17
2.2.2. Oxidace proteinů	18
2.2.2.1. Produkty pokročilé glykace	22
2.2.3. Poškození DNA	22
2.3. Antioxidační ochranný systém	23
2.3.1. Primární antioxidanty	24
2.3.1.1. Transferin.....	24
2.3.1.2. Ferritin	24
2.3.1.3. Ceruloplasmin.....	24
2.3.1.4. Albumin	24
2.3.2. Sekundární antioxidanty	24
2.3.2.1. Superoxiddismutasa.....	25
2.3.2.2. Peroxidas.....	26
2.3.2.3. Glutathionperoxidas.....	27
2.3.2.4. Katalasa	27
2.3.2.5. Kyselina askorbová – vitamin C.....	28
2.3.2.6. Tokoferol – vitamin E.....	29
2.3.2.7. Karotenoidy	30
2.3.2.8. Flavonoidy	31
2.3.2.9. Kyselina lipoová	33
2.3.2.10. Glutathion	34
2.3.2.11. Koenzym Q (ubichinon)	35
2.3.2.12. Bilirubin.....	36
2.3.2.13. Kyselina močová	36
2.3.3. Terciární antioxidanty	36
2.3.3.1. Opravné enzymy DNA	36
2.3.3.2. Proteolytické enzymy	37
2.3.4. Oxidační enzymy.....	37

2.3.4.1. Lipoxygenasa.....	37
2.3.4.2. Polyfenoloxidasas	39
2.4. Metody k posouzení oxidačního poškození organismu	40
2.4.1. Elektronová paramagnetická rezonance	40
2.4.2. Stanovení superoxidu	40
2.4.3. Metody pro detekci hydroxylového radikálu	40
2.4.4. Stanovení peroxidu vodíku.....	40
2.5. Metody posuzující intenzitu lipidové peroxidace	40
2.5.1. Stanovení malondialdehydu	41
2.5.2. Stanovení 4-hydroxy-2-nonenalu	41
2.6. Metody posuzující oxidaci proteinů	41
2.6.1. Stanovení karbonylových skupin proteinů	41
2.6.2. Stanovení dihydroxyfenylalaninu.....	42
2.6.3. Stanovení konečných produktů pokročilé glykace.....	42
2.6.4. Stanovení pokročilých produktů oxidace proteinů.....	42
2.7. Metody posuzující poškození nukleových kyselin.....	42
2.7.1. Měření nukleových kyselin poškozených HO• radikálem	42
2.7.2. Stanovení 8-hydroxy-2'-deoxyguanosinu	42
2.8. Analýza stopových prvků.....	42
2.9. Analýza antioxidantů.....	43
2.9.1. Metody stanovení aktivity katalasy	43
2.9.2. Metody stanovení aktivity glutathionperoxidasy	43
2.9.3. Metody stanovení aktivity peroxidasy.....	44
2.9.4. Metody stanovení aktivity superoxiddismutasy	44
2.10. Stanovení celkové antioxidační kapacity	45
2.10.1. TRAP metoda	45
2.10.2. ABTS•+ metoda	46
2.10.3. DPPH metoda	46
2.11. Metody stanovení aktivit oxidačních enzymů.....	46
2.11.1. Stanovení aktivity lipoxygenasy.....	46
2.11.2. Stanovení aktivity polyfenoloxidasas	46
2.12. Metody využívané k izolaci a stanovení aktivních látek v biologických matricích.....	47
2.12.1. Extrakce	47
2.12.2. Absorpční spektrofotometrie	49
2.12.3. Hmotnostní spektrometrie	49
2.12.4. Chromatografické metody	50
2.12.4.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – HPLC	50
2.12.4.2. Plynová chromatografie – GC	52
3. Cíle práce.....	54
4. Experimentální část	55
4.1. Přístroje, chemikálie a diagnostické soupravy	55
4.1.1. Přístroje.....	55
4.1.2. Chemikálie.....	55

4.1.2.1. Standardní chemikálie	55
4.1.2.2. Ostatní chemikálie	56
4.1.3. Diagnostické soupravy	56
4.2. Biologický materiál	57
4.2.1. Krev a sérum.....	57
4.2.2. Potravinové doplňky.....	57
4.2.3. Rostlinný materiál	57
4.2.3.1. Jablka	57
4.2.3.2. Ječmen a slad	57
4.3. Stanovení látek ovlivňujících antioxidační status organismu	57
4.3.1. Stanovení aktivity enzymu katalasy	57
4.3.1.1. Příprava vzorků.....	58
4.3.1.2. Spektrofotometrické stanovení aktivity katalasy.....	58
4.3.1.3. Kolorimetrické stanovení aktivity katalasy	58
4.3.1.4. Srovnání metod stanovení aktivity katalasy	59
4.3.2. Stanovení aktivity enzymu superoxiddismutasy v biologickém materiálu	59
4.3.2.1. Příprava vzorků.....	59
4.3.2.2. Analýza aktivity SOD metodou NBT.....	59
4.3.2.3. Analýza aktivity SOD metodou INT – komerčně dostupný set	60
4.3.2.4. Optimalizace analýzy aktivity SOD	60
4.3.2.5. Porovnání metod NBT a INT	60
4.3.3. Stanovení aktivity peroxidasy	60
4.3.3.1. Příprava extraktů z ječmene a sladu	61
4.3.3.2. Spektrofotometrické stanovení aktivity peroxidasy	61
4.3.3.3. Optimalizace stanovení aktivity peroxidasy.....	61
4.3.4. Stanovení aktivity glutathionperoxidasy	61
4.3.4.1. Příprava vzorku.....	62
4.3.4.2. Analýza aktivity glutathionperoxidasy	62
4.3.5. Stanovení aktivity enzymu lipoxygenasy v ječmeni a ve sladu	62
4.3.5.1. Příprava extraktu z ječmene nebo sladu	62
4.3.5.2. Spektrofotometrické stanovení aktivity LOX.....	62
4.3.5.3. Kolorimetrické stanovení aktivity LOX	63
4.3.5.4. Porovnání spektrofotometrické a kolorimetrické metody	63
4.3.6. Stanovení antioxidační kapacity v lidském séru	63
4.3.6.1. ABTS metoda	63
4.3.6.2. TRAP metoda	63
4.3.7. Stanovení AOPP a AGEs v lidském séru	64
4.3.7.1. Stanovení AGEs	64
4.3.7.2. Stanovení AOPP	64
4.3.8. Stanovení nízkomolekulárních antioxidantů v biologickém materiálu.....	64
4.3.8.1. Stanovení α -tokoferolu, retinolu a karotenoidů v lidském séru	64
4.3.8.2. Stanovení vitamínu E a karotenoidů v ječmeni a ve sladu	65
4.3.9. Analýza celkových flavonoidů a polyfenolů v séru	66

4.3.9.1. Analýza celkových flavonoidů	66
4.3.9.2. Analýza celkových polyfenolů	67
4.3.10. Analýza mastných kyselin v séru	67
4.4. Koncepce a organizace klinických studií	68
4.4.1. Koncepce klinických studií	68
4.4.2. Klinický experiment I.....	68
4.4.2.1. Soubor jedinců	68
4.4.2.2. Schéma studie	68
4.4.3. Klinický experiment II	69
4.4.3.1. Soubor sledovaných jedinců	69
4.4.3.2. Schéma studie	69
4.4.4. Analýza základních biochemických parametrů v lidském séru	69
4.4.5. Analýza antioxidační kapacity metodou TRAP	70
4.4.6. Analýza nízkomolekulárních antioxidantů v lidském séru	70
4.4.7. Analýza antioxidačních enzymů v krevních buňkách	70
4.5. Statistické zpracování výsledků	71
5. Výsledky.....	72
5.1. Optimalizace stanovení enzymových aktivit.....	72
5.1.1. Katalasa – vývoj kolorimetrické metody.....	72
5.1.1.1. Změna vlnové délky	72
5.1.1.2. Volba počáteční koncentrace substrátu a molybdenanu.....	73
5.1.1.3. Srovnání spektrofotometrické a kolorimetrické metody	74
5.1.1.4. Automatizace metody	75
5.1.2. Superoxiddismutasa – výběr metody stanovení	75
5.1.2.1. Porovnání metod pro stanovení SOD	75
5.1.2.2. Automatizace metody	76
5.1.2.3. Validace metody stanovení aktivity SOD metodou RANSOD	77
5.1.2.4. Stabilita SOD v extraktech z ječmene	77
5.1.3. Peroxidasa – vývoj metody	78
5.1.3.1. Vliv pH prostředí na aktivitu peroxidasy	78
5.1.3.2. Vliv teploty na aktivitu peroxidasy	78
5.1.3.3. Vliv koncentrace enzymu na průběh reakce.....	79
5.1.3.4. Vliv koncentrace guaiacolu na aktivitu peroxidasy.....	80
5.1.4. Stanovení aktivity lipoxxygenasy.....	82
5.1.4.1. Porovnání spektrofotometrické a kolorimetrické metody	82
5.1.5. Celková antioxidační kapacita.....	84
5.1.5.1. Porovnání metod TRAP a ABTS.....	84
5.2. Stanovení nízkomolekulárních a enzymových antioxidantů v ječmeni a ve sladu	86
5.2.1. Vzorky ječmene a sladu.....	86
5.2.2. Stanovení aktivity SOD v ječmeni a ve sladu	86
5.2.3. Stanovení aktivity katalasy v ječmeni a ve sladu	88
5.2.4. Stanovení aktivity peroxidasy v ječmeni a ve sladu.....	90
5.2.5. Stanovení vitamínu E v ječmeni a ve sladu.....	92

5.2.6. Stanovení karotenoidů v ječmeni a ve sladu	95
5.2.6.1. Stanovení luteinu v ječmeni a ve sladu	95
5.2.6.2. Stanovení β -karotenu v ječmeni a ve sladu	96
5.2.7. Stanovení lipoxxygenasy v ječmeni a ve sladu	100
5.3. Sledování složek antioxidačního komplexu v lidském organismu - klinická studie I ..	101
5.3.1. Popis klinického experimentu	102
5.3.2. Vyhodnocení biochemických parametrů	103
5.3.3. Vyhodnocení nízkomolekulárních antioxidantů	107
5.3.4. Vyhodnocení produktů glykace a oxidace proteinů	110
5.3.5. Vyhodnocení analýz mastných kyselin v séru	114
5.4. Sledování změn antioxidačních parametrů v lidském organismu - klinická studie II...	118
5.4.1. Popis klinické studie	118
5.4.2. Vyhodnocení biochemických parametrů	119
5.4.3. Vyhodnocení antioxidační kapacity	120
5.4.4. Vyhodnocení nízkomolekulárních antioxidantů	121
5.4.4.1. Analýza retinolu, α -tokoferolu a karotenoidů	121
5.4.4.2. Analýza celkových polyfenolů a flavonoidů	123
5.4.5. Vyhodnocení aktivit enzymových antioxidantů	124
6. Diskuse	126
7. Závěry	133
8. Literatura	137
9. Použité zkratky a symboly	147

1. ÚVOD

Před 3-4 miliardami let se na Zemi nacházelo železo a další prvky pouze v redukované formě. Oxidace prvků byla v sedimentech pozorována až o miliardu let později. Tato skutečnost bývá spojována s přítomností kyslíku, který se na této planetě objevil díky rozkladu vody fotosyntetickými systémy. Následně vznikla z kyslíku ozonová vrstva a v atmosféře se vytvořil účinný ochranný obal vůči UV radiaci, který byl nutný pro rozvoj života. Nyní je kyslík nejrozšířenějším prvkem na Zemi; je součástí atmosféry (21%), hydrosféry, litosféry a biosféry - je to významný biogenní prvek, nezbytný pro získávání buněčné energie u všech aerobních organismů. V poslední době se ukazuje, že při metabolismu v buňce běžně vzniká řada reaktivních forem kyslíku a dusíku, které mají značný fyziologický i patogenetický význam.

Reaktivní formy kyslíku a dusíku jsou látky, které snadno a rychle reagují s různými biologickými strukturami – mastnými kyselinami a lipidy, mononukleotidy a polynukleotidy 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. Při nadměrné produkci však mohou působit jako toxické látky, schopné buňku poškodit či dokonce usmrtit [1].

Je zřejmé, že každá buňka musí být proto vybavena prostředky, které udržují tvorbu reaktivních forem na fyziologické úrovni. Ochrana organismu proti oxidačnímu poškození je tvořena vzájemně spolupracujícími skupinami antioxidantů. Řadu z nich si dokáže organismus syntetizovat (enzymové antioxidanty, močovina), některé je však nutné exogenně doplňovat jako složky potravy (vitamíny).

Koordinovaná součinnost antioxidantních systémů vyžaduje dostatečné množství jednotlivých antioxidantních látek v organismu. Funkce jednoho antioxidantu navíc často podmiňuje účinek jiného článku soustavy. Sledování funkcí antioxidantních systémů v různých druzích biologického materiálu může být proto velmi významné pro pochopení poruch antioxidantní ochrany a pro účelné preventivní zásahy. Současně je možnost studia antioxidantů podmíněna úrovní rozvoje a dostupností analytických metod použitelných ke sledování parametrů oxidačního stresu na funkční i molekulární úrovni.

Cílem předložené práce je studium vybraných enzymových i neenzymových antioxidantů v různých typech biologického materiálu se zvláštním zaměřením na enzymy zapojené v regulaci oxidačního stresu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Reaktivní formy kyslíku a dusíku

Mezi reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) patří kromě řady molekul také skupina volných radikálů; jedná se o částice (volné atomy či atomové skupiny), které obsahují alespoň jeden orbital s nepárovým elektronem. Vznikají z běžných molekul trojím způsobem: homolytickým štěpením kovalentní vazby, redukcí či oxidací. K homolytickému štěpení je potřeba dodat velké množství energie; v biologických systémech proto radikály vznikají energeticky snadnějším způsobem – odejmutím nebo přijetím elektronu [2].

Radikály jsou obecně vysoce reaktivní částice. Ve snaze získat chybějící elektron jsou schopny rychle se vázat na jinou strukturu nebo elektron předat jiné molekule, nebo jí jej odebrat.

Tab. 1. Reaktivní formy kyslíku a dusíku [3]

Reaktivní formy kyslíku	
Volné radikály	Další reaktivní formy
Superoxid $O_2^{\bullet}$	Peroxid vodíku H_2O_2
Hydroxylový radikál $HO^{\bullet}$	Kyselina chlorná $HClO$
Peroxyl $ROO^{\bullet}$	Ozon O_3
Alkoxyl $RO^{\bullet}$	Singletový kyslík 1O_2
Hydroperoxyl $HO_2^{\bullet}$	
Reaktivní formy dusíku	
Volné radikály	Další reaktivní formy
Oxid dusnatý $NO^{\bullet}$	Nitrosyl NO^+
Oxid dusičitý $NO_2^{\bullet}$	Nitroxid NO
	Kyselina dusitá HNO_2
	Oxid dusitý N_2O_3
	Oxid dusičitý N_2O_4
	Nitronium NO_2^+
	Peroxynitrit $ONOO$
	Alkylperoxynitrit $ROONO$

Existuje mnoho způsobů tvorby ROS, ale pouze čtyři z nich jsou intenzivně zkoumány. Obecně vzato, nejvýkonnějším producentem reaktivních metabolitů kyslíku v buňkách jsou membránově vázané enzymy, zejména ty, jejichž koenzymy jsou schopné redukovat kyslík pouze jediným elektronem za vzniku superoxidu $O_2^{\bullet-}$. Jsou to hlavně koenzymy s chinoidní nebo flavinovou strukturou, hemové koenzymy a enzymy s mědí v aktivním centru [1].

Nejvydatnějším zdrojem ROS v buňce je respirační řetězec mitochondrií. Namísto čtyřelektronové redukce kyslíku na vodu v elektrontransportním řetězci dochází pouze k nedokonalé jednoelektronové redukci kyslíku za vzniku superoxidu, který je samovolně nebo enzymaticky převeden na peroxid vodíku H_2O_2 . Za fyziologických podmínek tvoří produkce superoxidu asi 0,1 až 0,2 % z celkově spotřebovaného kyslíku [4].

V endoplazmatickém retikulu superoxid vzniká z oxykomplexu cytochromu P-450. ROS vázané na tomto enzymu slouží k významným biotransformačním reakcím endogenních metabolitů i látek tělu cizích, ale také k přeměně některých látek na karcinogeny [5].

Dalším zdrojem ROS je β -oxidace mastných kyselin probíhající v peroxisomech. Jako vedlejší produkt zde vzniká peroxid vodíku. Peroxisomy však obsahují značné množství katalasy, proto není zcela jisté, zda takto vzniklý peroxid vodíku významně přispívá k celkovému oxidačnímu stresu buňky [6].

Ve specializovaných buňkách (např. v leukocytech a makrofázích) je superoxid produkován NADPH-oxidasou obsaženou v cytoplazmatické membráně jako součást baktericidního ochranného systému. Polymorfonukleární leukocyty obsahují též myeloperoxidasu, která produkuje kyselinu chlornou, další oxidační ochranný prostředek. Navíc jsou tyto buňky schopny indukovat syntézu enzymu tvořícího velké množství oxidu dusnatého (NO^*) a tím i peroxynitrilu. Uvedený arzenál tyto buňky používají k likvidaci bakterií a destrukci cizích struktur [7].

Kromě těchto čtyř hlavních zdrojů existuje množství dalších procesů, které mohou generovat oxidanty za normálních i za patologických podmínek, často ve specializovaných tkáních, např. tvorba NO^* , který reguluje mimo jiné permeabilitu cév [8].

2.1.1. Reaktivní formy kyslíku

Jak již bylo uvedeno, radikály jsou obecně vysoce reaktivní částice. Mezi výjimky v reaktivitě patří běžná molekula kyslíku. Může být označena také jako biradikál, protože má dva nepárové elektrony, nacházející se ve dvou orbitalech. Na rozdíl od jiných radikálů reaguje pomaleji, musí přitom změnit spin jednoho z těchto dvou elektronů. Při dodání energie či při odejmutí nebo přijetí elektronu (tab. 2) se však kyslík mění na reaktivnější formu [1].

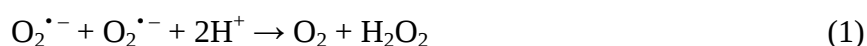
Tab. 2. Reakce vzniku ROS [9]

tripletový kyslík	$^3\text{O}_2$	$\xrightarrow{\text{energie}}$	$^1\text{O}_2$			
	$\downarrow e^-$		singletový kyslík			
superoxid	$\text{O}_2^{\bullet-}$	$\xrightarrow[pK=4,8]{H^+}$	$\text{HO}_2^{\bullet}$			
	$\downarrow e^-$		hydroperoxylový radikál			
peroxidový ion	O_2^{2-}	$\xrightarrow[pK>14]{H^+}$	HO_2^-	$\xrightarrow[pK=11,8]{H^+}$	H_2O_2	peroxid vodíku
	$\downarrow e^-$		hydrogenperoxidový ion			
hypotetický produkt	$[\text{O}_2^{3-}]$	$\xrightarrow{H^+}$	OH^-	$\xrightarrow{H^+}$	H_2O	voda
	$\downarrow$		hydroxidový ion			
oxen	$\text{O}^{\bullet-}$	$\xrightarrow[pK=11,9]{H^+}$	$\text{HO}^{\bullet}$			
	$\downarrow e^-$		hydroxylový radikál			
oxid	O_2^{2-}	$\xrightarrow{H^+}$	OH^-	$\xrightarrow{H^+}$	H_2O	voda
			hydroxidový anion			

2.1.1.1. Superoxid

Nejdůležitějším zdrojem superoxidu ($\text{O}_2^{\bullet-}$) v organismu je elektronový transportní řetězec v mitochondriích, endoplazmatické retikulum a chloroplasty. Superoxid je slabá báze s nízkou reaktivitou vůči většině biomolekul. Superoxidový radikál neprochází buněčnými membránami, proto nezpůsobuje peroxidaci lipidů v lipofilních složkách buňky, ale může redukovat ionty přechodných kovů typu Fe^{3+} . Dalším zdrojem superoxidu mohou být autooxidační reakce. Důležitou autooxidační reakcí je oxidace hemoglobinu na neaktivní methemoglobin a současného uvolnění superoxidového radikálu. Methemoglobin obsahuje hemově vázané železo ve formě Fe^{3+} a není už schopen vázat kyslík [8].

Reakce superoxidového radikálu jsou silně závislé na okolním prostředí. Superoxid má oxidační i redukční vlastnosti. Podléhá dismutaci, při které jedna molekula poskytuje elektron druhé, takže superoxid se vlastně zároveň oxiduje i redukuje a produkty reakce jsou kyslík a peroxid vodíku:



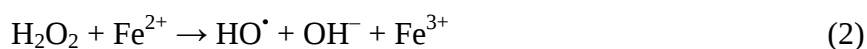
Tvorba peroxidu vodíku je pro toxicitu superoxidu důležitější než reakce s přechodnými kovy. Dále je superoxid schopen díky svým oxidačním vlastnostem oxidovat polyfenoly, katecholaminy, tokoferoly, askorbát a různé thiole [10]. Je dále schopen inaktivovat některé enzymy, jako jsou kreatinfosfátkinasa nebo katalasa [11].

2.1.1.2. Peroxid vodíku

Peroxid vodíku nepatří mezi volné radikály, ale podílí se na jejich vzniku. Je produktem reakcí, které mají za úkol odstraňovat superoxidový radikál. Dále vzniká v peroxisomech při deaminaci aminokyselin, při oxidaci glukosy glukosaoxidasou a při β -oxidaci mastných kyselin. Může také vznikat při fotosyntéze nebo fagocytóze.

Peroxid vodíku není příliš reaktivní, může ale na rozdíl od superoxidu procházet přes buněčné membrány a indukovat tak radikálové reakce přímo v membránách [12].

Peroxid vodíku za běžných podmínek s biologickými molekulami příliš nereaguje, významná je však jeho účast při tvorbě značně reaktivního hydroxylového radikálu [13]. Reakce samotného peroxidu s biomolekulami jsou poměrně pomalé, avšak v přítomnosti tranzitních kovů (dvojmocné železo Fe^{2+} nebo jednomocná měď Cu^+) se peroxid pohotově redukuje:



Peroxid vodíku je schopen tvořit adiční sloučeniny s mnohými složkami buněčného systému. Váže se pomocí vodíkových můstků za vzniku chelátů. Tímto způsobem může být přenesen i na místa dosti vzdálená od jeho vzniku. Nejznámější je komplex s histidinem, dále pak s alaninem, glycinem, kyselinou asparagovou, kyselinou jantarovou a nukleotidy [14].

Nejznámějším enzymem, který katalyzuje odstranění peroxidu vodíku, je katalasa. Tato reakce je inhibována superoxidovým radikálem. Dalšími enzymy, které chrání buňku proti působení peroxidu vodíku, je skupina peroxidas. V živočišných buňkách je nejvýznamnější glutathionperoxidas, která katalyzuje přeměnu redukované formy glutathionu (GSH) na jeho oxidovanou formu (GSSG). Oba tyto způsoby odbourávání (katalyzované hemovou katalasou i glutathionperoxidasou) probíhají současně.

2.1.1.3. Hydroxylový radikál

Hydroxylový radikál ($\text{HO}^\bullet$) vzniká konverzí ze superoxidového radikálu a peroxidu vodíku:



Je také tvořen některými biologickými systémy. Dalším zdrojem radikálu je reakce peroxidu vodíku s dvojmocným železem (kap. 2.1.1.2), známá jako Fentonova reakce. Nutnou podmínkou pro průběh této reakce je volná koordinační vazba na atomu železa.

Hydroxylový radikál patří k nejreaktivnějším z dosud známých reaktivních kyslíkových intermediátů. Reaguje se všemi typy molekul obsažených v buňce – s cukry, aminokyselinami, fosfolipidy, nukleotidy a organickými kyselinami. Poločas rozpadu radikálu je při 37 °C velmi krátký, proto je zřejmé, že k reakci s biologickými molekulami dochází přímo v místě jeho vzniku.

Na rozdíl od peroxidu vodíku a superoxidu neexistuje proti hydroxylovému radikálu žádná obrana založená na enzymové reakci. Jelikož hydroxylový radikál reaguje se všemi sloučeninami v buňce, je jednou z mála možností obrany důsledná kontrola metabolismu železa. Tím ovšem nelze zabránit tvorbě radikálu vlivem exogenních nebo patologických faktorů. Proti takto vzniklému hydroxylovému radikálu jsou v buňce přítomny látky, které vylučují tyto radikály nebo zhasí radikálové reakce [15].

2.1.1.4. Singletový kyslík

Singletový kyslík ($^1\text{O}_2$) je reaktivní forma kyslíku, ve které jeden ze dvou nespárovaných elektronů se po excitaci přemístí do vyšší energetické hladiny, přičemž změní svůj spin. I když není radikálem, může v radikálových reakcích nejen vznikat, ale také je iniciovat. Předpokládá se, že singletový kyslík vzniká při spontánní dismutaci superoxidu nebo reakcí superoxidu s peroxidem vodíku:



Singletový kyslík může vznikat při fotosenzibilizačních reakcích. Látka, tzv. senzibilizátor, se po ozáření světlem o určité vlnové délce dostane do excitovaného stavu. Tuto excitační energii přenese na kyslík, čímž vznikne singletový kyslík a senzibilizátor se vrátí do svého základního energetického stavu. Mezi senzibilizátory v biologických systémech patří riboflavin a jeho deriváty FMN a FAD, retinol, chlorofyl, bilirubin atd. Takto vytvořený singletový kyslík může poškozovat buď přímo molekulu senzibilizátoru nebo molekulu v její blízkosti. V biologických systémech nejčastěji dochází ke kombinaci těchto dvou typů poškození [8].

Singletový kyslík může s jinou molekulou reagovat dvěma způsoby:

- začlenění se do molekuly, nejčastěji pokud obsahuje dvojnou vazbu (karoteny, vyšší karboxylové kyseliny), za vzniku hydroperoxidu nebo endoperoxidu
- vhodné molekule odevzdá svou excitační energii a sám přejde do základního energetického stavu [8].

2.1.1.5. Kyselina chlorná

Kyselinu chlornou (HClO) syntetizují neutrofilní granulocyty (polymorfonuleáry) pomocí své myeloperoxidasy:



Kyselina chlorná je silný oxidant. Polymorfonuleáry ji používají spolu s dalšími ROS a RONS jako baktericidní prostředek. [1].

2.1.2. Reaktivní formy dusíku

2.1.2.1. Oxid dusnatý

Oxid dusnatý (NO) má značný biologický význam. Je součástí systémů, které chrání organismus proti bakteriím, prvokům, nádorům a zasahuje do procesů nespecifické imunity. Ovlivňuje rovněž regulaci krevního tlaku a krevního oběhu [16].

Oxid dusnatý má v molekule jeden nespárovaný elektron, tudíž ho řadíme mezi volné radikály ($\text{NO}^\bullet$). Je velmi reaktivní a nestabilní. Vzniká enzymaticky z L-argininu, nebo neenzymaticky, např. oxidační denitrifikací hydroxyguanidinu, látky s protinádorovými účinky. Takto vzniklý $\text{NO}^\bullet$ pak přispívá k cytotoxicitě tohoto léku [17].

2.1.2.2. Peroxonitril

Reakcí oxidu dusnatého se superoxidovým radikálem vzniká peroxonitril (ONOO^-), což je silný oxidant, za fyziologických podmínek stabilní a s dlouhou dobou existence. Indukuje lipoperoxidaci v lipoproteinech, narušuje fosforylaci a interferuje s buněčnou signalizací

thyrosinových zbytků v proteinech. Rozklad peroxonitrilu může vést k produkci singletového kyslíku. Rozkladem protonované formy peroxonitrilového aniontu vzniká vysoce toxický hydroxylový radikál [18]:



2.2. Úloha ROS v oxidačním poškození organismu

Reaktivní formy kyslíku se účastní uvolňování a přeměny energie nezbytné pro životní pochody, jsou součástí enzymových mechanismů a některé z nich jsou významnými signálními molekulami v buněčném informačním systému. Škodí pouze tehdy, vymknou-li se přísné kontrole, kterou každý aerobní organismus získal v průběhu vývoje biologického systému [1].

Poškození rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním reaktivních forem kyslíku a dusíku se nazývá oxidační stres. Může být vyvolán nadměrnou produkcí RONS, nedostatečnou funkcí antioxidačního systému nebo kombinací obou těchto nedostatků. Reaktivními formami kyslíku a dusíku může být atakována většina biomolekul.

Tab. 3. Hlavní cílové struktury pro reaktivní formy a následky těchto napadení [19]

Cíl	Poškození	Následky
PUFA v lipidech	• ztráta dvojných vazeb • tvorba reaktivních metabolitů (peroxydy, aldehydy)	• změněná fluidita lipidů • změny v propustnosti membrán • vliv na membránové vázané enzymy • tvorba chemoatraktivních látek pro makrofágy
Proteiny	• agregace a síťování • fragmentace a štěpení • modifikace thiolových skupin a benzenových jader AMK	• změny v transportu iontů • vstup Ca^{2+} do cytosolu • změny v aktivitě enzymů
DNA	• štěpení kruhu deoxyribosy • modifikace a poškození bází • zlomy řetězce • křížové vazby řetězců	• mutace • translační chyby • inhibice proteosyntézy

2.2.1. Peroxidace lipidů

V biologických systémech podléhají nenasycené mastné kyseliny autooxidační radikálové řetězové reakci, která je nazývána peroxidace lipidů. Dvojná vazba oslabuje vazbu C-H a proto PUFA a jiné lipidy podléhají peroxidaci snadněji než jiné biomolekuly. Mezi látky, které jsou schopny iniciovat peroxidaci, patří hydroxylový radikál $\text{HO}^\bullet$, alkoxylový radikál $\text{RO}^\bullet$, peroxylový radikál $\text{ROO}^\bullet$ a pravděpodobně také hydroperoxylový radikál $\text{HO}_2^\bullet$ [1].

Výsledkem peroxidace je tvorba nových alkylových radikálů, které mohou ve spolupráci s kyslíkem iniciovat další oxidační reakce. V organismu probíhají dva typy peroxidace:

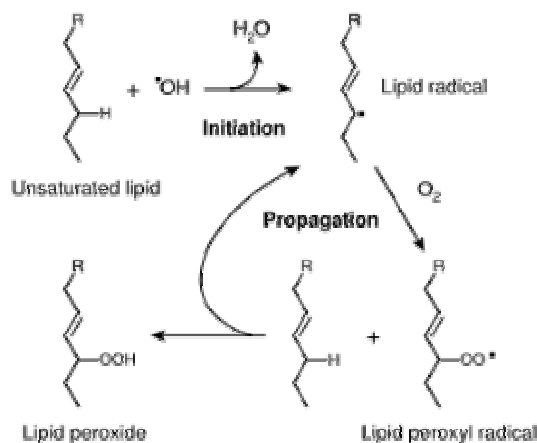
a) enzymová peroxidace lipidů - probíhá na aktivních centrech hydroperoxidas a endoperoxidas a produkuje stereospecifické a biologicky aktivní látky (prostaglandiny a leukotrieny), důležité v řízení buněčných dějů a v ochranných pochodech.

b) neenzymová peroxidace lipidů - patologický proces, při kterém vzniká řada různých produktů v závislosti na způsobu rozštěpení řetězce mastné kyseliny – např. uhlovodíky ethan, pentan a toxické aldehydy malondialdehyd (MDA) a 4-hydroxynonenal (4-HNE), které se pevně váží na proteiny a mění jejich životnost a funkci. Tyto peroxidace mění fluiditu membrán, zvyšují propustnost pro ionty a tím způsobí lýzu buněk [20].

K enzymům podílejícím se na tvorbě hydroperoxidových derivátů lipidů patří i lipoxigenasy (lipoxidasy, lipoperoxidasy). Tyto enzymy katalyzují dioxygenaci polynenasycených mastných kyselin obsahujících cis,cis-1,4- dienovou strukturu za vzniku jejich hydroperoxidových derivátů [21].

Neenzymové peroxidace lipidů probíhají v biologických systémech především v membránách a lipoproteinech. Peroxidace bývají rozděleny na tři fáze. Při iniciaci je molekula mastné kyseliny napadena radikálem (nejčastěji $\text{HO}^\bullet$). Po odtržení atomu vodíku a přeskupení dvojné vazby vzniká konjugovaný dien, který reaguje s molekulou kyslíku za vzniku lipoperoxylového radikálu $\text{LOO}^\bullet$. Tento reaktivní radikál následně reaguje s další mastnou kyselinou, odštěpí z ní vodík a přemění se na hydroperoxid LOOH . Tím nastává druhá fáze reakce, propagace, která trvá do té doby, než se volný radikál nesetká s jiným radikálem nebo antioxidantem, čímž se reakce ukončí terminací (Obr. 1.).

Hydroperoxydy jsou pouze primárními produkty reakce. V následných reakcích se mění na řadu sekundárních produktů, např. malondialdehyd nebo 4-hydroxynonenal [22].



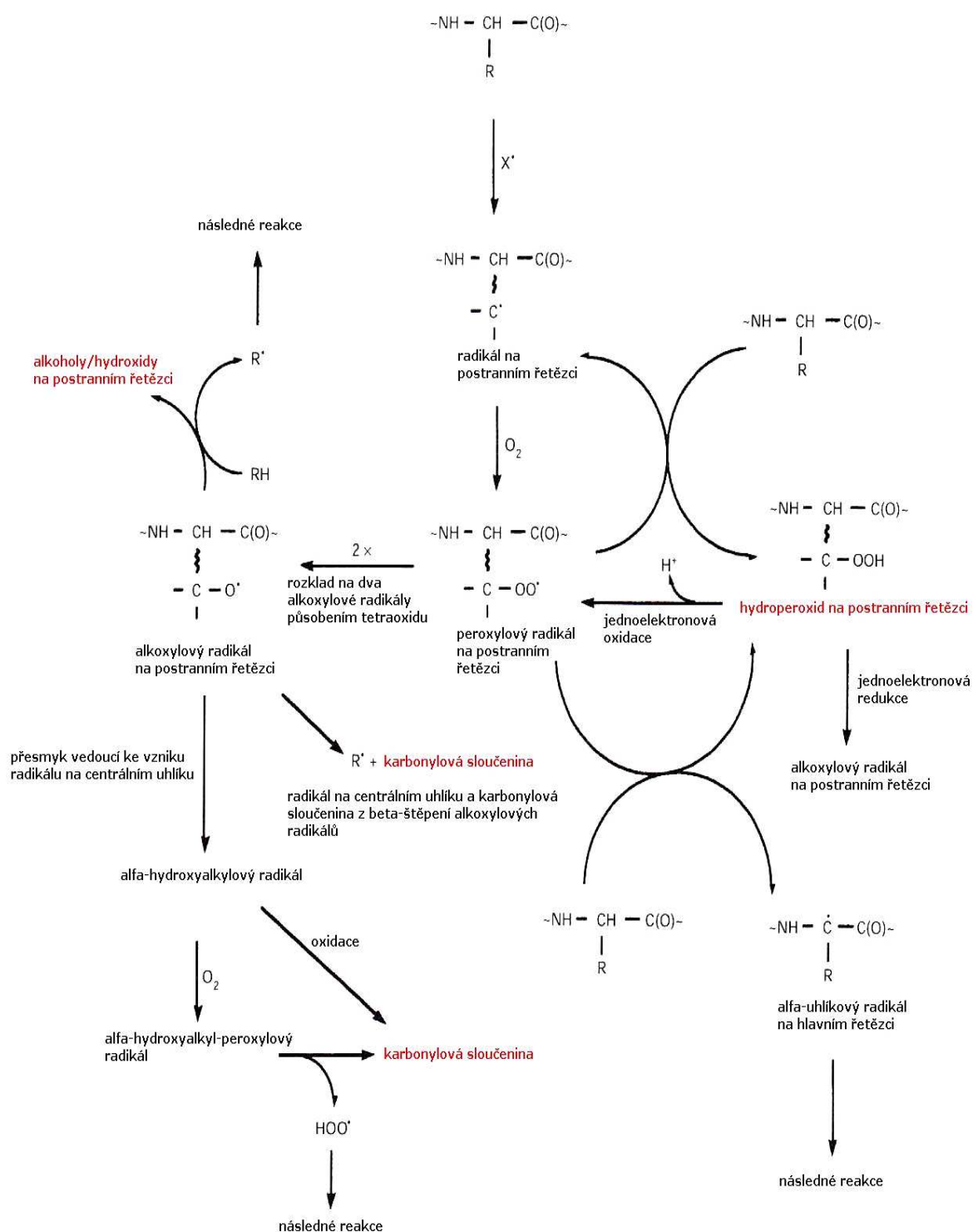
Obr. 1. Schéma lipidové peroxidace [23]

2.2.2. Oxidace proteinů

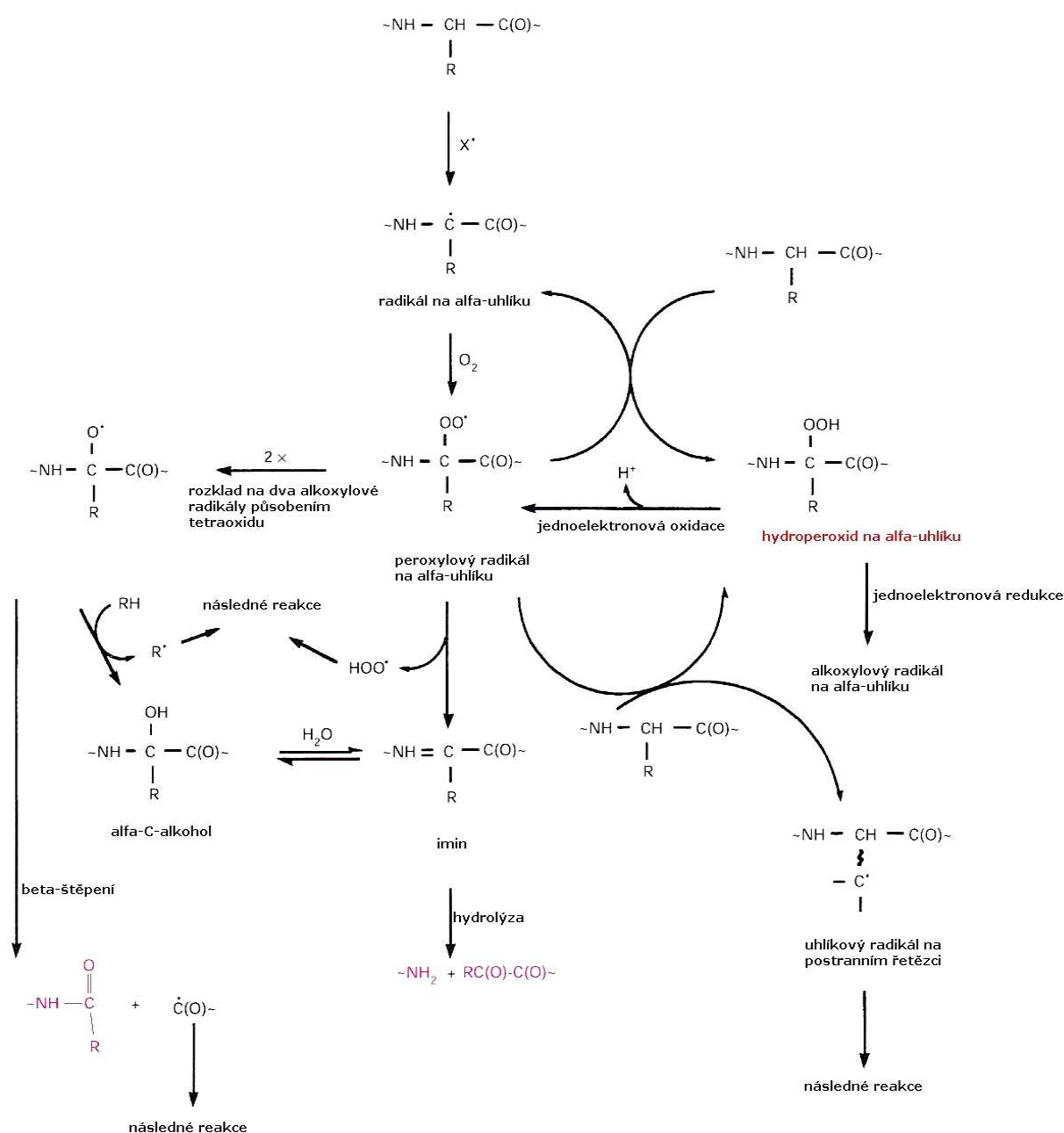
Významným cílem radikálů jsou proteiny. Jedním z důvodů je jejich majoritní zastoupení ve většině biologických systémů. Některé ROS a RNS mohou bezprostředně oxidovat aminokyselinové zbytky. Působením radikálů dochází k výměně částí řetězců mezi jednotlivými proteiny, k fragmentaci řetězců a k řadě dalších změn. Nejčastěji jsou proteiny atakovány hydroxylovým radikálem $\text{HO}^\bullet$. Během oxidace alifatických aminokyselin jsou formovány hydroxylované deriváty na postranních řetězcích [24]. Při oxidaci aromatických

aminokyselin se formují z thyrosinu fenoxylové radikály a při nepřítomnosti opravných reduktantů (vitamin E) nastává jejich konverze na dithyrosin a následné produkty [25].

Charakteristickou reakcí hydroxylových radikálů je rovněž hydroxylace fenylalaninu, thyrosinu a tryptofanu [26].



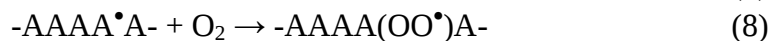
Obr. 2. Reakce alifatických radikálů na postranním řetězci zformovaných během oxidace proteinů [27]



Obr. 3. Reakce radikálů na hlavním řetězci zformovaných během oxidace proteinů [27]

Při hydroxylaci alifatických řetězců o délce sedmi a více uhlíků a za přítomnosti kyslíku byla zaznamenána řetězová oxidace proteinů [28]. Mechanismus reakce není dosud přesně znám, předpokládá se však následující sled reakcí:

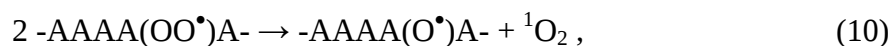
Působením hydroxylového radikálu na protein vzniká alkylový radikál, z nějž se za přítomnosti kyslíku zformuje peroxylový radikál:



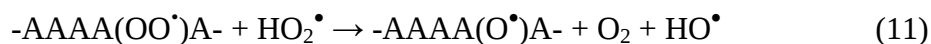
Peroxylový radikál může konvertovat na hydroperoxid a nový proteinový radikál:



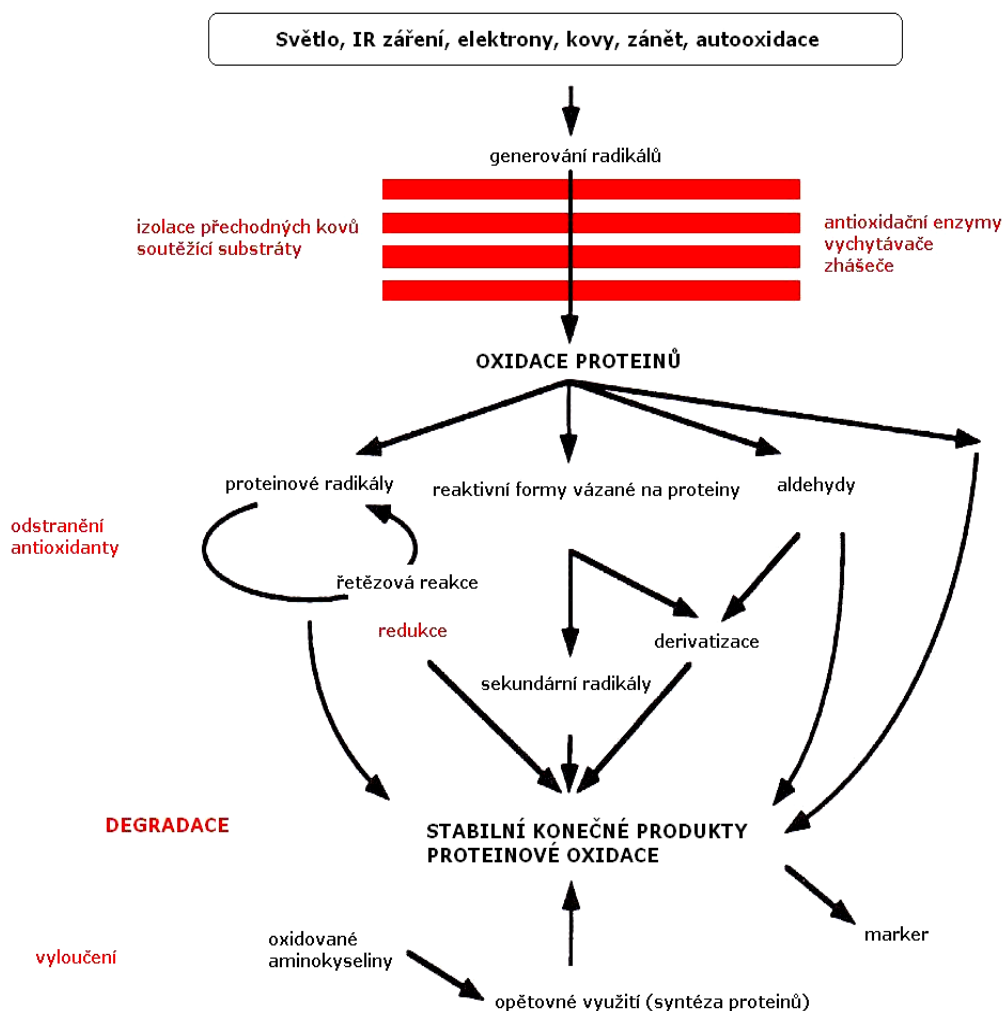
nebo může reagovat s jiným peroxylovým radikálem za vzniku alkoxylového radikálu a singletového kyslíku:



nebo může reagovat s hydroperoxylovým radikálem (zformovaným z primárního superoxidu $\text{O}_2^{\bullet-}$) za vzniku dvou reaktivních radikálů a kyslíku:



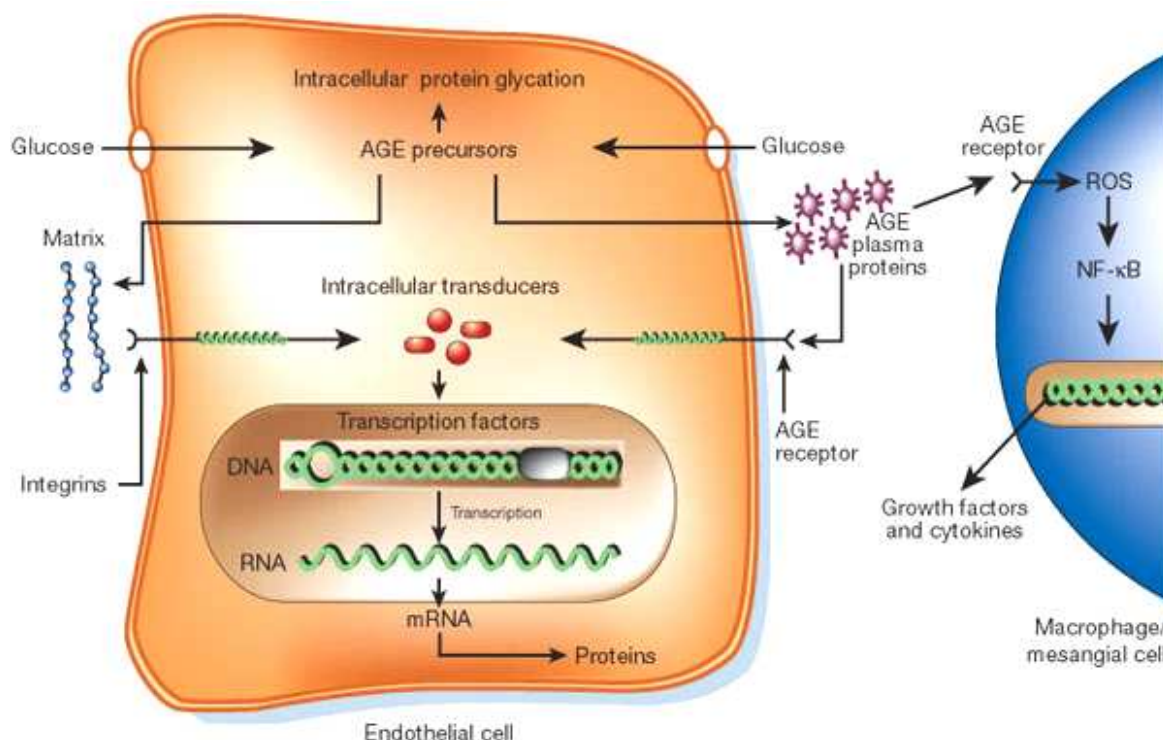
S membránovými proteiny a proteiny lipoproteinových částic (LDL, VLDL) reagují kromě ROS a RNS také alkoxylové a peroxylové radikály lipidů vznikajících při lipidové peroxidaci. Další produkty lipidové peroxidace – malondialdehyd a 4-hydroxynonenal – se kovalentně navazují na ϵ -aminoskupinu lysinu. Následkem toho se proteiny agregují, sítují a stanou se citlivějšími k proteolytické degradaci. Cílem proteolytických enzymů je odstranění oxidovaných proteinů z buňky [27].



Obr. 4. Předpokládaný mechanismus proteinové peroxidace in vivo (červeně vyznačené procesy pravděpodobně vedou ke zlepšení důsledků poškození proteinů) [27]

2.2.2.1. Produkty pokročilé glykace

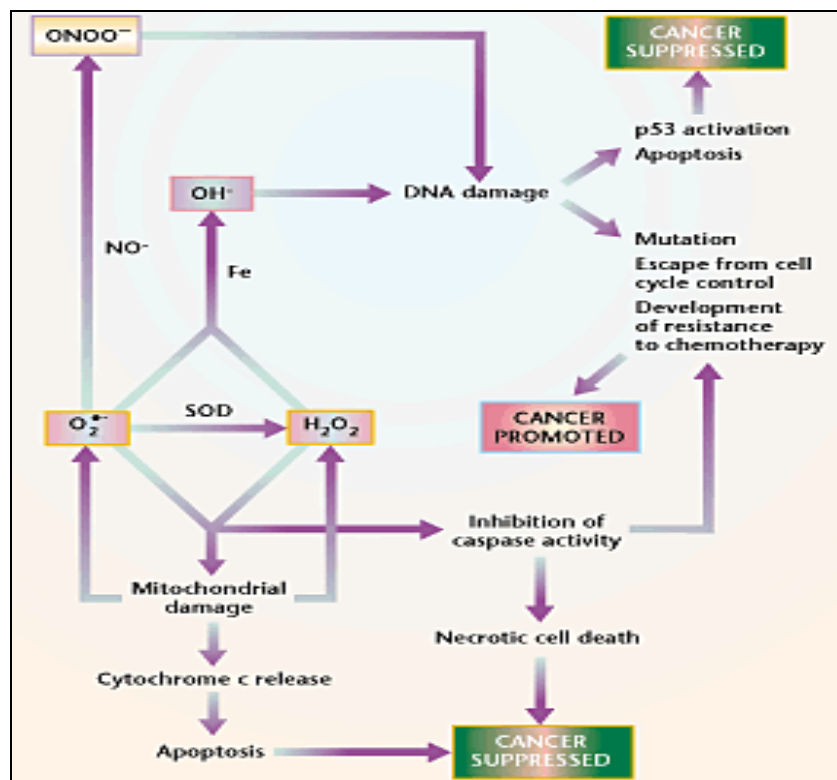
Glykace je neenzymatická vazba glukosy na aminoskupinu aminokyselin různých tkáňových a plazmatických proteinů. V organismu může reversibilně reagovat aldehydová skupina přítomné glukosy s aminoskupinami v postranním řetězci lysinu nebo i s primárními aminoskupinami na N-koncích peptidových řetězců za vzniku Schiffových bazí. Přesmykem se glukosový zbytek přemění na fruktosovou skupinu (Amadoriho přesmyk) – vzniká produkt, který se časem přemění na reaktivnější karbonylové sloučeniny – konečné produkty pokročilé glykace (Advanced Glycation End products – AGE). Tyto produkty se rovněž nazývají Maillardovy podle Louise Maillarda, který jako první popsal hnědnutí bílkovin při zahřívání s cukry.



Obr. 5. Mechanismus poškození cévních buněk intracelulární produkcí AGEs [29]

2.2.3. Poškození DNA

Stejně jako lipidy a proteiny jsou také nukleové kyseliny poškozovány reaktivními formami kyslíku a dusíku, především hydroxylovým radikálem $\text{HO}^\bullet$. Reaguje s deoxyribosou za vzniku malondialdehydu a dalších produktů, modifikuje a uvolňuje purinové a pyrimidinové báze. Následkem těchto reakcí se může přerušit polynukleotidový řetězec, nebo se mohou vytvořit křížové vazby DNA s proteiny. Primární reakcí $\text{HO}^\bullet$ s DNA je odštěpení vodíkového atomu z deoxyribosy, což vede k destrukci sacharidu a přerušení řetězce. $\text{HO}^\bullet$ je schopen připojit se k purinovým a pyrimidinovým bázím a změnit je tak na hydroxyderiváty a oxoderiváty. Následkem takových změn je chybné párování bází při replikaci DNA a zavedení chyby do genetické informace. Poškození DNA se projeví apoptosou, mutagenézí, karcinogenézí a stárnutím [30].



Obr. 6. Mechanismus účinku volných radikálů [31]

2.3. Antioxidační ochranný systém

Antioxidační ochrana organismu představuje složitý komplex mechanismů, které pracují ve vzájemné souhře, doplňují se a mnohdy i potencují, navíc musejí být v rovnováze s prooxidačními látkami, tedy s produkcí RONS [32]. Systémy jsou lokalizovány v různých buněčných strukturách. Antioxidační obranné mechanismy zahrnují neenzymové a enzymové systémy [33]. Z chemického hlediska můžeme za antioxidant považovat každou látku, která zabrání reakci reaktivního metabolitu s jinou látkou. Z biologického hlediska je antioxidant taková sloučenina, která i v malém množství ve srovnání s koncentrací substrátu reaguje s ROS za tvorby relativně stabilních netoxických produktů [34].

Komplexní antioxidační systém zahrnuje několik stupňů ochrany:

- **primární antioxidanty** – zabraňují tvorbě radikálů:
 - eliminací volných iontů Fe nebo Cu různými interními chelatačními činidly (albumin, myoglobin, ferritin, transferrin, ceruloplasmin, metallothionin aj.)
 - inhibicí enzymů, které katalyzují tvorbu ROS
- **sekundární antioxidanty** – vychytávají již vytvořené ROS:
 - enzymové systémy, např. superoxiddismutasa (SOD), glutathionperoxidasa (GPx), glutathionreduktasa (GR), katalasa, metaloenzymy
 - nízkomolekulární sloučeniny, např. glutathion, kyselina askorbová, tokoferoly, bilirubin, kyselina močová, karotenoidy a flavonoidy
- **terciární antioxidanty** – odstraňují molekuly poškozené působením ROS:
 - proteolytické a lipofilní enzymy, př. fosfolipasa A
 - regenerační systémy pro opravu oxidačního poškození DNA (endonukleasy).

2.3.1. Primární antioxidant

Primární antioxidant zabráňují tvorbě nových ROS eliminací iontů přechodných kovů (železo, měď), chelatací (albumin, transferin) nebo inhibicí enzymů, které katalyzují tvorbu nových ROS (alopurin). K eliminaci iontů přechodných kovů obsahuje lidská plazma různé proteiny, které jsou schopny tyto kovy koordinačně navázat do své struktury. Tím jsou tyto kovy vyřazeny z dalšího toxického působení.

2.3.1.1. *Transferin*

Transferin je protein krevní plazmy, který váže atomy Fe^{3+} . Vazebnou kapacitu je možno naplnit z 20-30 %. Apotransferin (transferin s oddisociovanými železitými ionty) má velkou schopnost vázat atomy Fe^{3+} , které se uvolnily z jiných zdrojů, např. ferritinu. Transferin tak zabráňuje tvorbě hydroxylového radikálu $\text{HO}^\bullet$ a peroxidaci lipidů [35].

2.3.1.2. *Ferritin*

Ferritin se vyskytuje v plazmě a v buňkách jako zásobní protein železa. Na rozdíl od transferinu váže ferritin železité ionty pouze slabou vazbou, takže se atomy mohou snadno uvolňovat a katalyzovat tvorbu hydroxylového radikálu. V tomto případě není ferritin považován za antioxidační činidlo, spíše je naopak zdrojem prooxidačně působících iontů Fe^{2+} [35].

2.3.1.3. *Ceruloplasmin*

Ceruloplasmin je protein transportující atomy mědi. Váže téměř všechny měďnaté ionty přítomné v plazmě, které potom nemohou v přítomnosti peroxidu vodíku tvořit hydroxylový radikál. Ceruloplasmin je dále schopen oxidovat železnaté ionty na železité za současné redukce kyslíku na vodu (nevzniká superoxid, železnaté ionty se neúčastní Fentonovy reakce, která je zdrojem $\text{HO}^\bullet$). Takto vzniklé železité ionty se vážou na transferin. Ceruloplasmin se díky těmto vlastnostem řadí mezi nejvýznamnější extracelulární antioxidanty člověka [36].

2.3.1.4. *Albumin*

Lidský albumin je nejvíce zastoupený plazmatický protein, který má specifická vazebná místa pro velké množství různorodých látek (vyšší karboxylové kyseliny, tetrapyrroly, měď atd.) Jeho antioxidační funkce spočívá ve schopnosti vázat ionty mědi a hem. Navázaná měď se v přítomnosti peroxidu vodíku oxiduje na vysoce toxické ionty Cu^{3+} . Při této reakci se měď z albuminu neuvolní a dochází tak k poškození proteinu v místě vazby. Poškozený protein je poté odstraněn a nahrazen [8].

2.3.2. Sekundární antioxidant

Sekundární antioxidant jsou látky, které odstraňují již vytvořené ROS. Podle mechanismu účinku je můžeme rozdělit na:

- scavengery – zachycené ROS přemění na neradikálové molekuly
- trappery – přeměňují ROS na relativně stabilní radikály
- quenchery – zhášejí vytvořené radikály.

Podle biologické funkce se dělí na:

- enzymy (superoxiddismutasa, katalasa, peroxidasa, glutathionperoxidasa, glutathiontransferasa)
- nízkomolekulární antioxidanty (kyselina askorbová, tokoferoly, karotenoidy, flavonoidy, glutathion, kyselina lipová, koenzym Q, bilirubin, kyselina močová) [1].

2.3.2.1. Superoxiddismutasa

Superoxiddismutasa (EC 1.15.1.1) je enzym obsažený prakticky ve všech aerobních organismech. Spontánní dismutace superoxidu na dioxygen a peroxid vodíku je při pH ~ 7 velmi rychlá, přesto ji příroda urychlila superoxiddismutasou o další čtyři řády (rychlostní konstanta je pak $2 \cdot 10^9 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) [1].

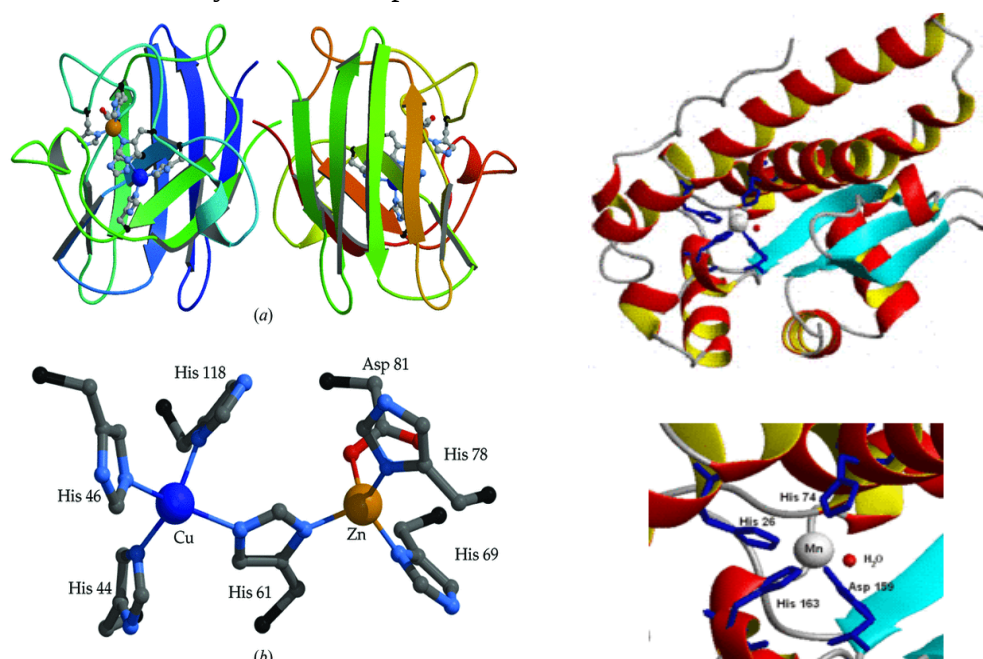
SOD patří do skupiny oxidoreduktas. Je to metaloenzym, který obsahuje ve svém aktivním centru dva stejné nebo různé atomy přechodného kovu v určitém oxidačním stupni. SOD tak tvoří několik izoform, které se liší atomy kovů obsažených v aktivním centru, aminokyselinovým složením a počtem podjednotek [37].

Cu,Zn-SOD se skládá ze dvou identických podjednotek, v každé je jeden atom mědi a jeden atom zinku. Vyskytuje se v cytosolu a v mezimembránovém prostoru mitochondrií. Přenos elektronu z jedné molekuly superoxidu na druhou zajišťuje Cu^{2+} , který se redukuje na Cu^+ a poté zase oxiduje. Zinek má stabilizační funkci, katalýzy se neúčastní.

Mn-SOD je enzymem mitochondriální matrix, kde se vyskytuje jako tetramer. Ve formě dimeru ji lze nalézt také u prokaryot.

Fe-SOD se vyskytuje jako dimer pouze u prokaryot, v živočišných buňkách nebyla nalezena.

EC-SOD neboli extracelulární superoxiddismutasa se skládá ze čtyř podjednotek s atomy mědi a zinku. Má vazebné místo pro heparansulfát, touto strukturou se váže na luminární povrch endotelu a z vazby se uvolní heparinem [1].



Obr. 7. Struktura Cu,Zn-SOD a Mn-SOD [38, 39]

2.3.2.2. Peroxidas

Peroxidasy (EC 1.11.1.1-14) je označení pro širokou skupinu enzymů, které katalyzují reakce typu:



Pro řadu peroxidas je nejvhodnějším substrátem peroxid vodíku:



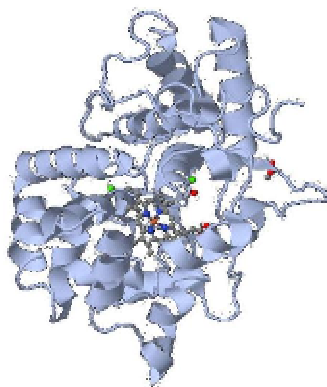
Jiné peroxidasy jsou více aktivní s organickými hydroperoxidy. Jako donor elektronů může sloužit celá řada sloučenin, závisí to na struktuře konkrétního enzymu; některé peroxidasy s dostupným aktivním centrem mohou využít celou řadu organických sloučenin, peroxidasy s uzavřeným aktivním centrem vyžadují sloučeniny specifické.

Peroxidasy lze podle lokalizace rozdělit na několik skupin:

- živočišné
 - laktoperoxidasa
 - myeloperoxidasa
 - thyreoperoxidasa
- rostlinné a mikrobiální
 - intracelulární (kvasinková cytochrom c-peroxidasa, bakteriální peroxidasa)
 - extracelulární plísňové
 - extracelulární rostlinné (křenová peroxidasa – horse radish peroxidase, HRP)

Některé peroxidasy jsou schopny katalyzovat oxidaci halogenů peroxidem vodíku; bývají nazývány jako haloperoxidasy [40].

Peroxidasy mají v praxi široké využití, zejména v biotechnologických procesech. Lignin-peroxidasa a Mn-peroxidasa se účastní degradace ligninu, mají tedy důležité uplatnění v papírnickém průmyslu. Křenová peroxidasa je využívána pro úpravu průmyslových odpadních vod v oxidační polymerizaci fenolů a aromatických aminů na méně toxické produkty. Má rovněž spolu se sójovou peroxidasou velký potenciál v zemědělství pro detoxikaci půdy. Peroxidasy jsou rovněž hojně využívány ve zdravotnictví jako součást diagnostických setů pro stanovení kyseliny močové, glukosy, cholesterolu, laktosy apod. Našly své uplatnění také v imunologii v metodách ELISA, kde jsou používány pro značení protilátek [41].



Obr. 8. Struktura křenové peroxidasy [42]

2.3.2.3. *Glutathionperoxidasa*

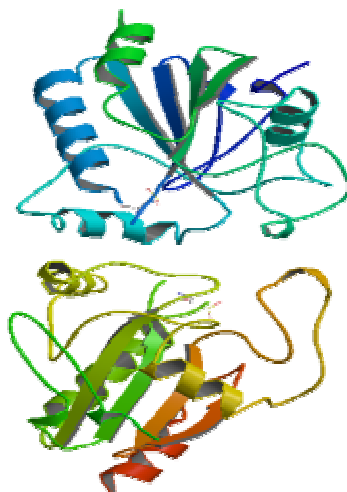
Glutathionperoxidasa (GSH peroxidasa, GPx, EC 1.11.1.9) patří mezi nejdůležitější selenoproteiny, funkční podoby selenu v organismech.

Glutathionperoxidasa existuje ve dvou formách, jako selen-dependentní a selen-independentní, které se liší počtem podjednotek, vazbou selenu v aktivním centru a také katalytickým mechanismem.

Se-independentní glutathionperoxidasa (glutathion-S-transferasa, GST) katalyzuje detoxikaci různých xenobiotik. Atom selenu (Se^{2+}) přítomný v molekule se katalytické funkce nezúčastňuje [43].

Se-dependentní glutathionperoxidasa (GPx) se skládá ze čtyř podjednotek, každá podjednotka obsahuje v aktivním centru jeden atom selenu, který je zde vázán jako selenocystein. GPx se nachází v cytoplasmě a v mitochondriích buňky [44].

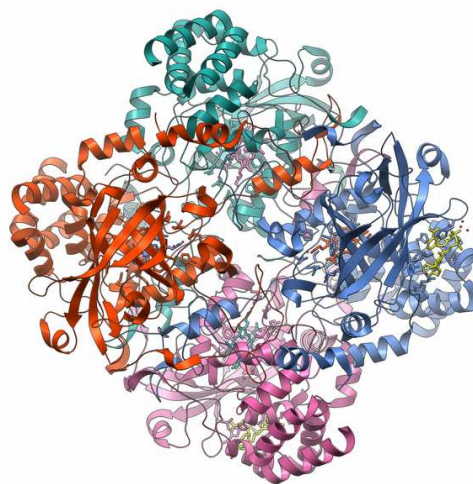
Největší množství GPx se nachází v cytoplasmě erytrocytů. GPx z reakčního prostředí eliminují peroxidy jako potenciální substrát pro Fentonovu reakci. Selen v molekule reaguje rychleji než velmi podobný atom síry, navíc poskytuje do redoxní reakce dva elektrony. To je důležité hlavně při tvorbě kyslíku z peroxidu, protože se netvoří superoxid, který pro svou tvorbu potřebuje pouze jeden elektron. GPx spolupracuje s peptidem glutathionem (GSH), který se v buňkách nachází v relativně vysoké koncentraci. Předpokládá se, že glutathion redukuje selen v GPx a takto redukovaná forma enzymu následně katalyzuje rozklad peroxidu vodíku [37].



Obr. 9. *Struktura enzymu glutathionperoxidasy [45]*

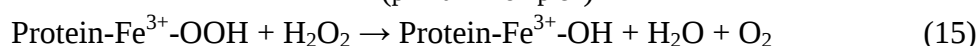
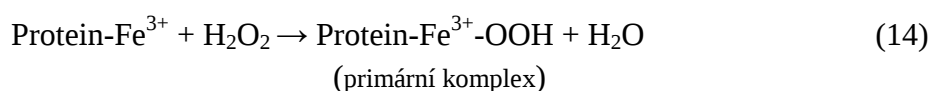
2.3.2.4. *Katalasa*

Katalasa (H_2O_2 : H_2O_2 – oxidoreduktasa; EC 1.11.1.6) je enzym obsažený ve všech aerobních buňkách, kde katalyzuje disproportionaci peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Její hlavní funkcí je ochrana buněk před toxickými účinky peroxidu vodíku. V eukaryotických buňkách je lokalizována v peroxisomech.



Obr. 10. Struktura enzymu katalasy [46]

Katalasa je schopna rozkládat vodík dvěma různými reakčními drahami. V první, známé jako „katalasová“ dráha, jsou konvertovány dvě molekuly peroxidu na vodu a kyslík [47]:



Primární komplex se může rozložit na vodu a kyslík také jinou, „peroxidasovou“ drahou:



kde AH₂ slouží jako donor vodíku [48]. Tuto funkci mohou díky své malé molekulové hmotnosti vykonávat alkoholy. Při koncentraci peroxidu vodíku vyšší než 0,1 mmol.l⁻¹ převažuje katalasová dráha, při nižších koncentracích převažuje dráha peroxidasová. Tato dráha dominuje rovněž v případech, kdy jako substrát slouží alkylperoxyd. Při koncentraci peroxidu vyšší než 100 mmol.l⁻¹ dochází k inhibici enzymu substrátem.

Katalasa je hemoprotein o molekulové hmotnosti 240 kDa; molekula je složena ze čtyř identických podjednotek, z nichž každá váže hem jako prosthetickou skupinu.

Katalasa je inhibována všeobecnými inhibitory (azid, kyanid), specifickým inhibitorem katalasy je aminotriazol. V přítomnosti vhodných substrátů se katalasa rychle vyčerpá. Biosyntéza enzymu je indukována tvorbou peroxidu vodíku během oxidačního stresu [37].

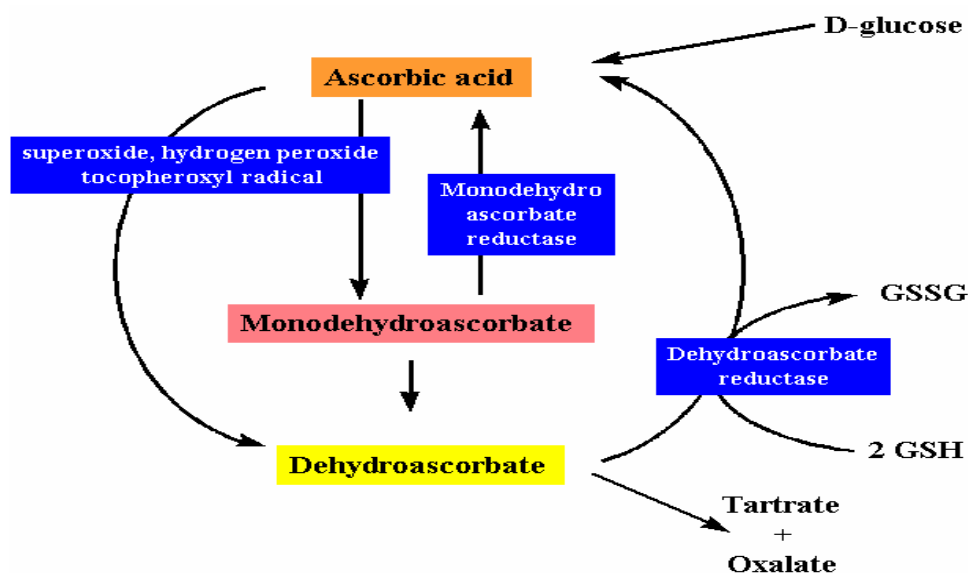
2.3.2.5. Kyselina askorbová – vitamin C

Vitamin C je vitaminem pouze pro člověka a několik dalších živočichů. Hojně se vyskytuje v ovoci a zelenině. Základní biologicky aktivní sloučeninou vitamínu C je L-askorbová kyselina. Názvem vitamin C se označuje nejen kyselina L-askorbová, ale také celý reversibilní oxidačně-redukční systém. Ten zahrnuje kyselinu L-askorbovou, produkt její jedoelektronové oxidace, který se nazývá L-askorbylradikálem a produkt dvouelektronové oxidace, tj. kyselinu L-dehydroaskorbovou.

Velmi důležitými reakcemi souvisejícími s antioxidačními vlastnostmi vitamínu C jsou reakce s aktivními formami kyslíku, resp. s volnými radikály, a reakce s oxidovanými formami vitamínu E, které zabezpečují ochranu vitamínu E a lipidů membrán před oxidací. Askorbát může přímo vychytávat ROS i bez pomoci enzymů; nepřímě se účastní na jejich likvidaci tím, že recykluje vitamín E na redukovanou formu.

Ochrannou funkci má vitamin C i pro labilní formy listové kyseliny. Inhibuje také tvorbu nitrosaminů a působí tak jako modulátor mutagenese a karcinogeneze. Mnoho dalších aktivit vitamínu C je dosud známo jen částečně [49].

Kyselina askorbová je v rostlinách syntetizována z D-glukosy. Jako antioxidant reaguje se superoxidem, peroxidem vodíku nebo s tokoferolovým radikálem za tvorby monodehydroaskorbové kyseliny a/nebo dehydroaskorbové kyseliny. Redukované formy jsou recyklovány zpět na askorbát pomocí NAD(P)H nebo glutathionu, za účasti monodehydroaskorbatreduktasy a dehydroaskorbatreduktasy. Dehydroaskorbát se může také rozložit na kyselinu šťavelovou a vinnou [50].



Obr. 11. Syntéza a degradace kyseliny askorbové v rostlinné tkáni [50]

2.3.2.6. *Tokoferol – vitamin E*

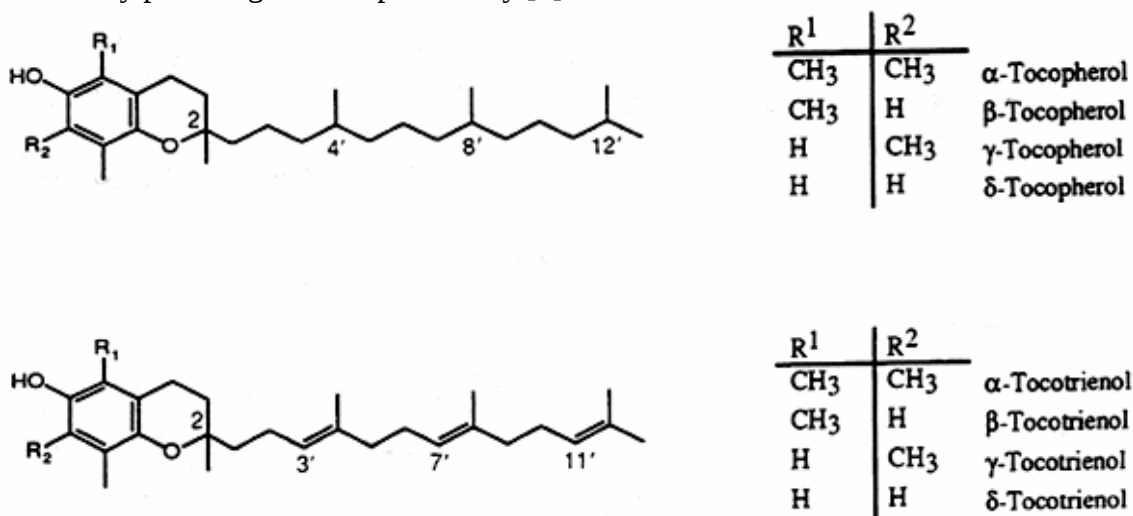
Vitamin E (zvláště α -tokoferol) je nejvýznamnějším lipofilním antioxidantem uplatňujícím se u eukaryotických buněk jako ochrana nenasycených mastných kyselin v lipidech a fosfolipidech před poškozením volnými radikály. Spolu s β -karotenem a ubiquinony chrání strukturu a integritu biomembrán, tedy buněčné neboli cytoplasmatické membrány a zejména membrán vnitrobuněčných organel (buněčné jádro, mitochondrie, lysosomy, endoplasmatické retikulum).

Aktivitu vitamínu E vykazují 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 vitamérů.

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. Jednotlivé tokoferoly a tokotrienoly se liší polohou a počtem methylových skupin v chromanovém cyklu [49].

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 tokoferylový radikál, který je stabilnější než látky, se kterými tokoferol reaguje. Vzniklé hydroperoxydy jsou deaktivovány pomocí glutathionperoxidasy [1].



Obr. 12. Struktura tokoferolů a tokotrienolů [51]

2.3.2.7. Karotenoidy

Karotenoidy jsou významnými a nejrozšířenějšími 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. Živočiškové však nejsou schopni syntetizovat karotenoidy, pouze přeměňují potravou získané rostlinné pigmenty na látky odlišné struktury, nebo je skladují jako takové [49].

Většina karotenoidních látek se řadí mezi tetraterpeny, tedy mezi terpenoidy formálně obsahující osm isoprenoidních jednotek. Za svoji barevnost vděčí řetězci konjugovaných dvojných vazeb, který se vyskytuje v několika základních strukturách a jejich kombinacích.

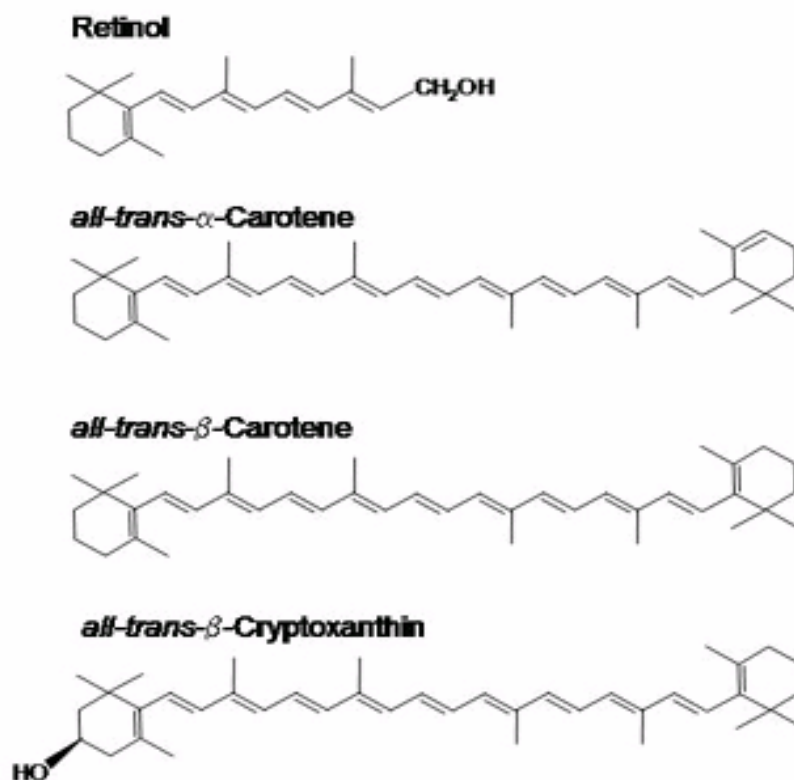
Karotenoidy se dělí na dvě hlavní skupiny :

- uhlovodíky nazývané **karoteny**
- oxidované sloučeniny (alkoholy, ketony aj.) odvozené od karotenů, nazývané **xantofyly**

Asi 50 přirozeně se vyskytujících sloučenin ze skupiny karotenoidů vykazuje aktivitu provitaminu A. Nejvýznamnějším provitaminem A je β -karoten, následovaný α -karotenem,

γ -karotenem a dalšími provitaminy A. Retinol je produktem enzymové degradace těchto prekursorů, která probíhá ve stěně tenkého střeva účinkem karotenasy [52].

V antioxidační ochraně se karotenoidy uplatňují při odstraňování radikálů centrovaných na uhlík a alkylperoxidových radikálů $\text{ROO}^\bullet$ v lipidech. Mechanismus jejich působení je dosud nejasný, pravděpodobně se uplatňují prostřednictvím tokoferolu. Mohou též zhaset singletový kyslík [1].



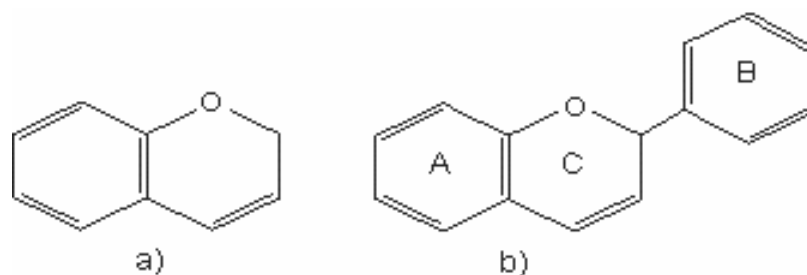
Obr. 13. Struktura karotenoidů [53]

2.3.2.8. Flavonoidy

O flavonoidech se dlouho předpokládalo, že slouží pouze jako květní pigmenty k lákání hmyzu, jako signální molekuly, nebo jako antimikrobiální látky. Dnes však víme, že flavonoidy mohou inhibovat lipoperoxidaci, mohou mít protinádorový, protiischemický, antialergický, nebo protizánětlivý účinek.

Flavonoidní látky neboli flavonoidy jsou značně rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů obsahujících v molekule dva benzenové kruhy spojené tříuhlíkovým řetězcem. Jedná se o uspořádání $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$. Svými vlastnostmi se velmi liší od jiných fenolových pigmentů, a proto jsou uváděny jako samostatná skupina rostlinných barviv.

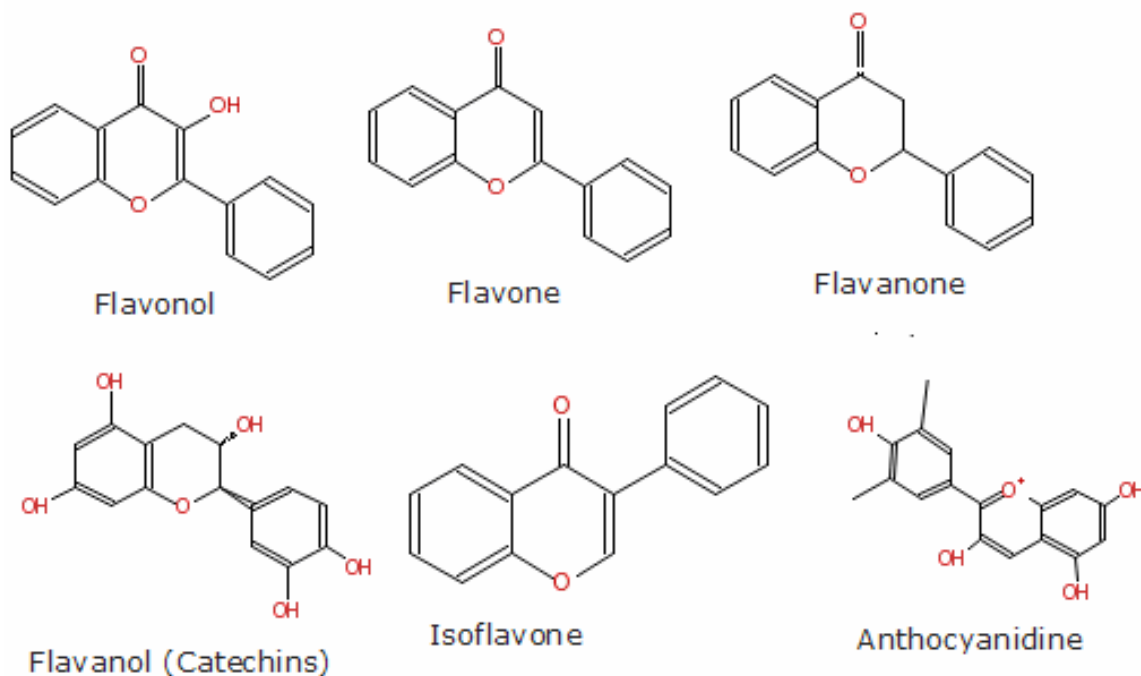
U většiny flavonoidů je C_3 řetězec součástí cyklického (pyranového) kruhu. Jsou tedy odvozeny od kyslíkatých heterocyklických sloučenin 2H-chromenu, substituovaného v poloze C-2 fenylovou skupinou, který se nazývá flavan.



Obr. 14. Struktura a) 2H-chromenu a b) flavanu [54]

Podle stupně oxidace C3 řetězce rozeznávají se tyto základní struktury flavonoidů [54]:

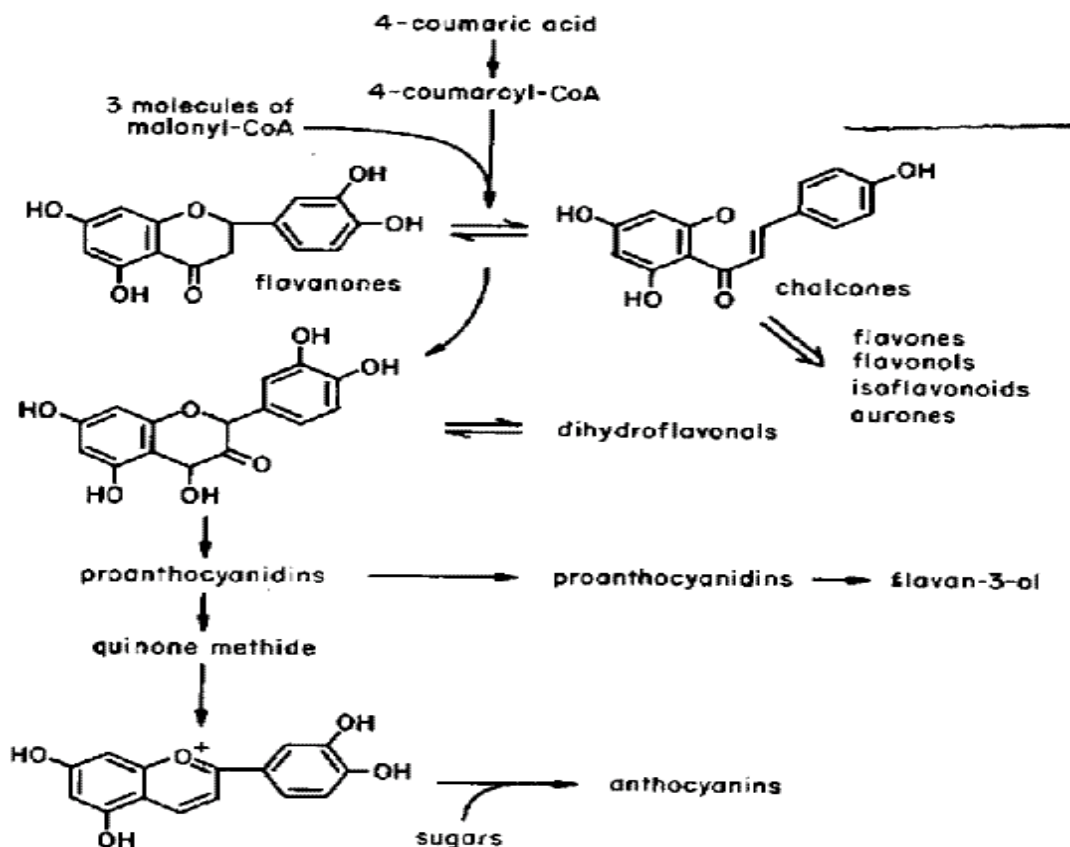
- katechiny (3-flavonoly)
- leukoanthokyanidiny (3,4-flavandioly)
- flavanony
- flavanonoly
- flavony
- flavonoly
- anthokyanidiny
- chalkony a dihydrochalkony
- aurony
- isoflavonoidy.



Obr. 15. Obecná struktura flavonoidů [55]

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. Vyskytují se jako bezbarvé, žluté, červené až modrofialově zbarvené struktury. Skupiny jako katechiny a leukoanthokyanidiny jsou sloučeniny bezbarvé, ale hnědé pigmenty z nich vznikají procesem enzymového hnědnutí [54].



Obr. 16. Biosyntéza flavonoidů v rostlinách [56]

Mechanismus účinků flavonoidů není dosud přesně znám, pravděpodobně inhibují metabolickou dráhu vzniku superoxidu tím, že vychytávají už vytvořený superoxidový radikál. Dále inhibují agregaci krevních destiček a tím zabraňují vzniku krevních sraženin. Díky své schopnosti inhibovat lipoperoxidaci brání rozvoji aterosklerózy. Nejvýznamnější je ale protinádorové působení flavonoidů, přičemž inhibiční účinek se projevuje hlavně v počáteční fázi rakoviny. Flavonoidy mají antimutagenní schopnosti a zabraňují navíc vazbě karcinogenu na DNA [54].

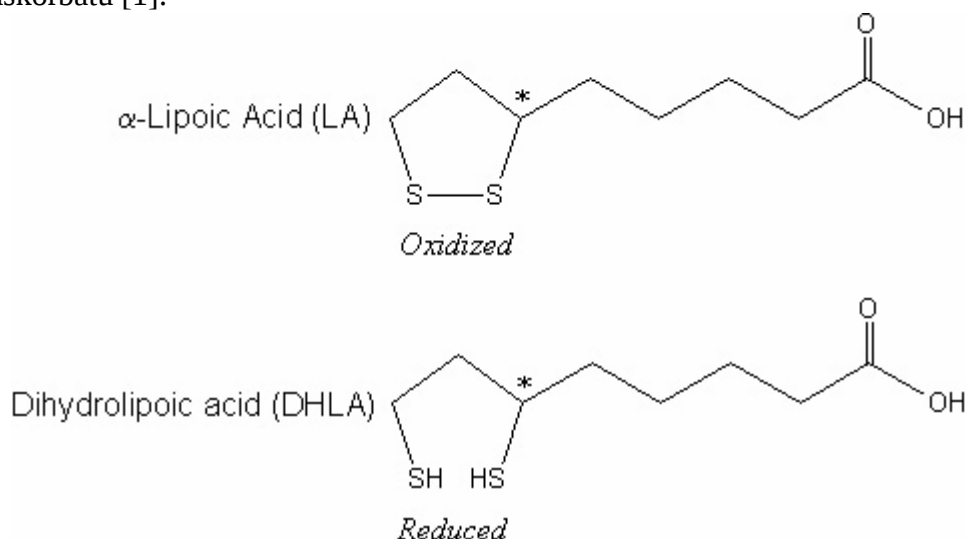
2.3.2.9. Kyselina lipoová

Kyselina lipoová 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:

- přímou reakcí s ROS
- vazbou přechodných kovů za současné tvorby chelátů
- recyklací jiných antioxidantů (tokoferylový radikál)
- ovlivněním genové exprese [37].

Kyselina lipoová reaguje s alkylperoxylovými radikály, askorbylovými radikály, tokoferyllovými radikály a s kyselinou chlornou. Tokoferyllový radikál regeneruje přímo nebo pomocí askorbátu [1].

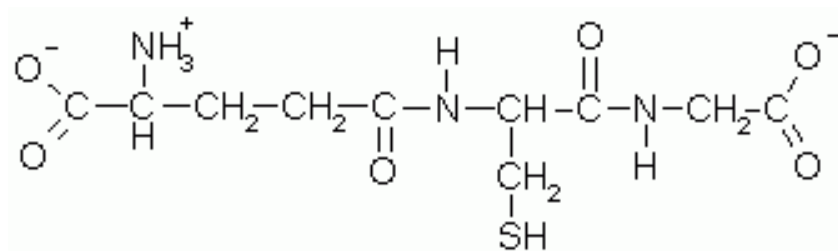


Obr. 17. Kyselina lipoová [57]

2.3.2.10. Glutathion

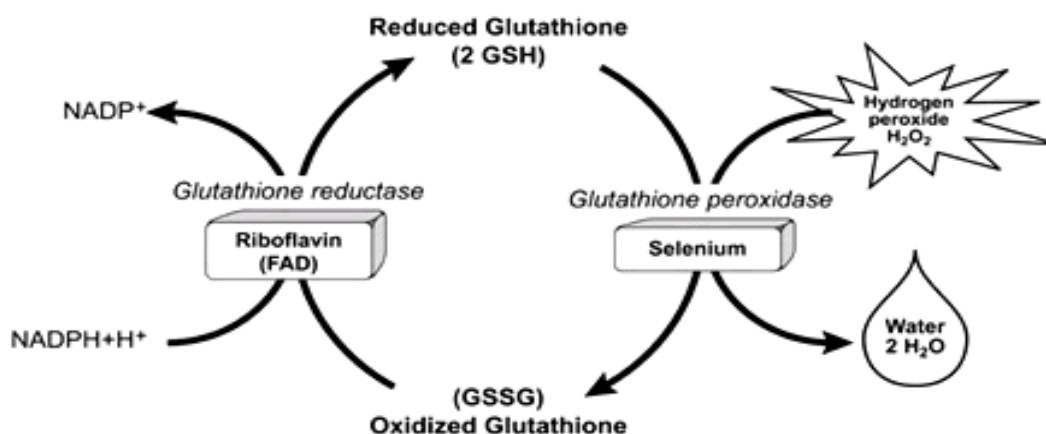
Glutathion je tripeptid (γ -glutamyl-cysteinyl-glycin), patří k multifunkčním intracelulárním neenzymatickým thiolům. Do systému antioxidační ochrany se zapojuje několika způsoby:

- je kofaktorem některých enzymů, které zasahují do detoxikačních mechanismů oxidačního stresu, např. glutathionperoxidasa, glutathiontransferasa
- účastní se přenosu aminokyselin přes buněčnou membránu
- je lapačem hydroxylového radikálu a singletového kyslíku, detoxikuje peroxid vodíku a lipoperoxidy
- přímo nebo nepřímo redukuje tokoferolový radikál



Obr. 18. Struktura glutathionu [58]

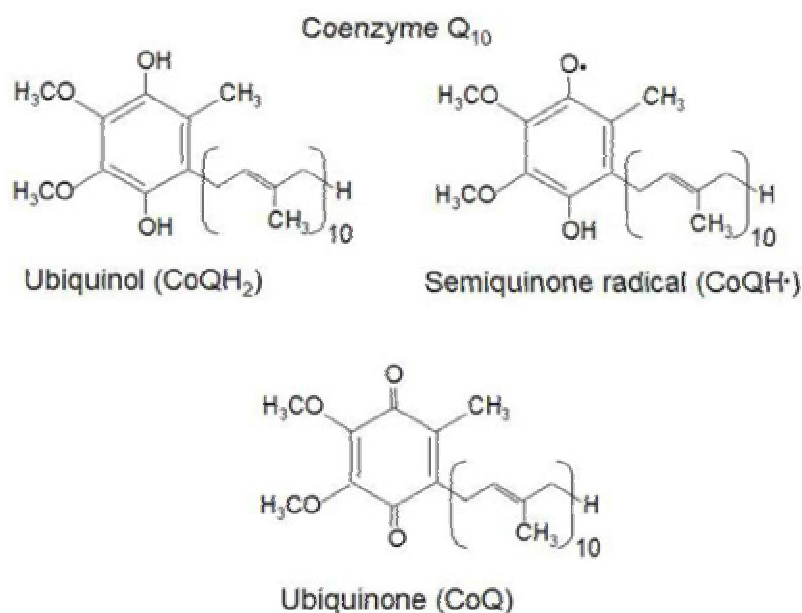
Oxidovaný glutathion je redukován glutathionreduktasou. Poměr oxidovaného a redukováného glutathionu je vhodným ukazatelem oxidačního poškození organismu [37].



Obr. 19. Cyklus glutathionu [59]

2.3.2.11. Koenzym Q (ubichinon)

Koenzym Q (CoQ) je triviální název pro 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-multiprenylbenzochinon. Koenzym Q má v postranním řetězci isoprenové jednotky, jejichž počet se u jednotlivých živočišných druhů liší. Koenzym Q je nedílnou složkou respiračního řetězce.



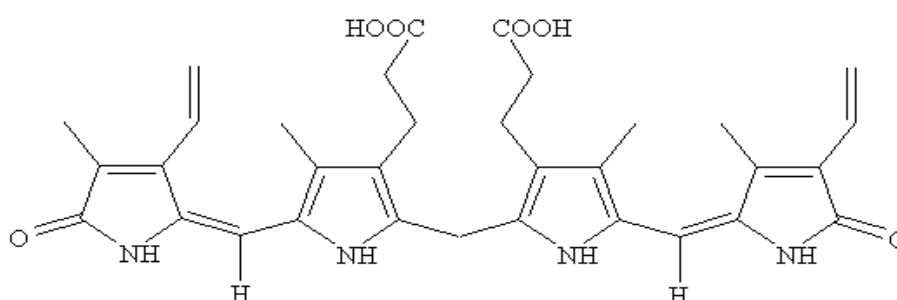
Obr. 20. Chemická struktura koenzymu Q [60]

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. Koenzym Q může přímo reagovat s některými radikály (peroxylový, alkoxylový) nebo může díky svému umístění v membráně regenerovat vitamin E. Redukovaná forma koenzymu Q může reagovat přímo se superoxidovým radikálem, lipidovým radikálem nebo peroxylovým radikálem. [37].

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.

2.3.2.12. Bilirubin

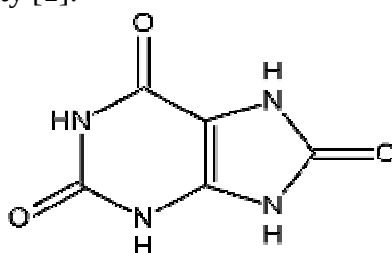
Bilirubin, degradační metabolit hemu, je lineární tetrapyrrol, který má kromě metabolického významu zřejmě také antioxidační význam, a to jak volný, tak vázaný na albumin a jiné proteiny. Obě formy pigmentu inhibují peroxidaci lipidů, pravděpodobně tím, že regenerují tokoferol obsažený v lipoproteinech. Bilirubin vázaný na albumin se mění na biliverdin, který je rozpustný ve vodě. Bilirubin tak exportuje radikálovou reakci z LDL do vodné fáze [61]. Bylo prokázáno, že zháší singletový kyslík [62].



Obr. 21. Struktura bilirubinu [63]

2.3.2.13. Kyselina močová

Kyselina močová je konečným produktem metabolismu odbourávání purinů a byla dlouho považována za odpadní látku. V pozdější době se však zjistilo, že je zároveň nejhojnějším antioxidantem lidské plazmy. Antioxidační schopnosti spočívají ve vychytávání $RO\cdot$ a $HClO$ a ve vazbě železa a mědi do formy, která nepodporuje radikálové reakce. Po reakci s $HO\cdot$ a s komplexy železa s aktivním kyslíkem se kyselina močová mění v radikály, které mohou biologicky škodit. Bývají proto regenerovány pomocí askorbátu nebo neenzymaticky oxidovány na degradační produkty [1].



Obr. 22. Struktura kyseliny močové [64]

2.3.3. Terciární antioxidanty

2.3.3.1. 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 deoxyribosy atd. [8].

Poškozená DNA může být opravena několika způsoby:

- úplná oprava – oprava poškozeného místa do původního stavu
- excizní oprava – vyštěpení poškozeného místa, které se uskutečňuje excizní opravou bází nebo nukleotidů nebo opravou chybného párování
- tolerantní oprava – dochází k obnově funkce DNA, aniž by bylo odstraněno původní poškození; při této opravě se poškození způsobené zlomy a rekombinací obchází replikací [65].

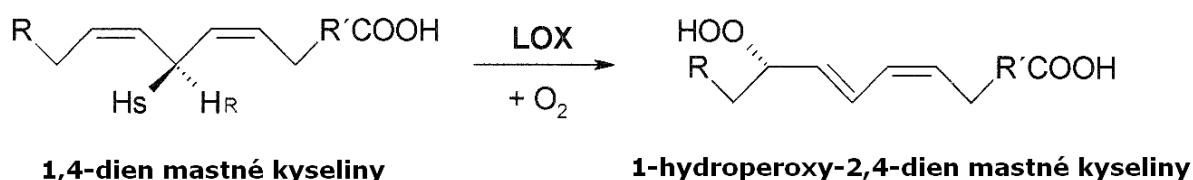
2.3.3.2. *Proteolytické enzymy*

Jako proteolytické enzymy (proteasy) označujeme všechny enzymy, které katalyzují hydrolýzu peptidových vazeb v proteinech a peptidech. Proteasy patří do enzymové třídy hydrolas. Vzhledem k jejich funkci při biodegradaci proteinů, která vede k opětovnému využívání či odbourávání aminokyselin, jsou proteasy v živých systémech široce zastoupeny. Podle místa působení na polypeptidový řetězec se proteasy dělí do dvou skupin: na endoproteasy, které katalyzují hydrolýzu vazeb uvnitř peptidového řetězce, přičemž vznikají peptidy různé velikosti, a exoproteasy, které katalyzují hydrolytické odštěpení samotné koncové aminokyseliny z polypeptidového řetězce. Podle chemické povahy aktivního centra se proteasy dělí na serinové, thiolové, kyselé a metaloproteasy. Mezi nejznámější proteolytické enzymy patří pepsin, trypsin, chymotrypsin, papain a bromelin [66].

2.3.4. *Oxidační enzymy*

2.3.4.1. *Lipoxygenasa*

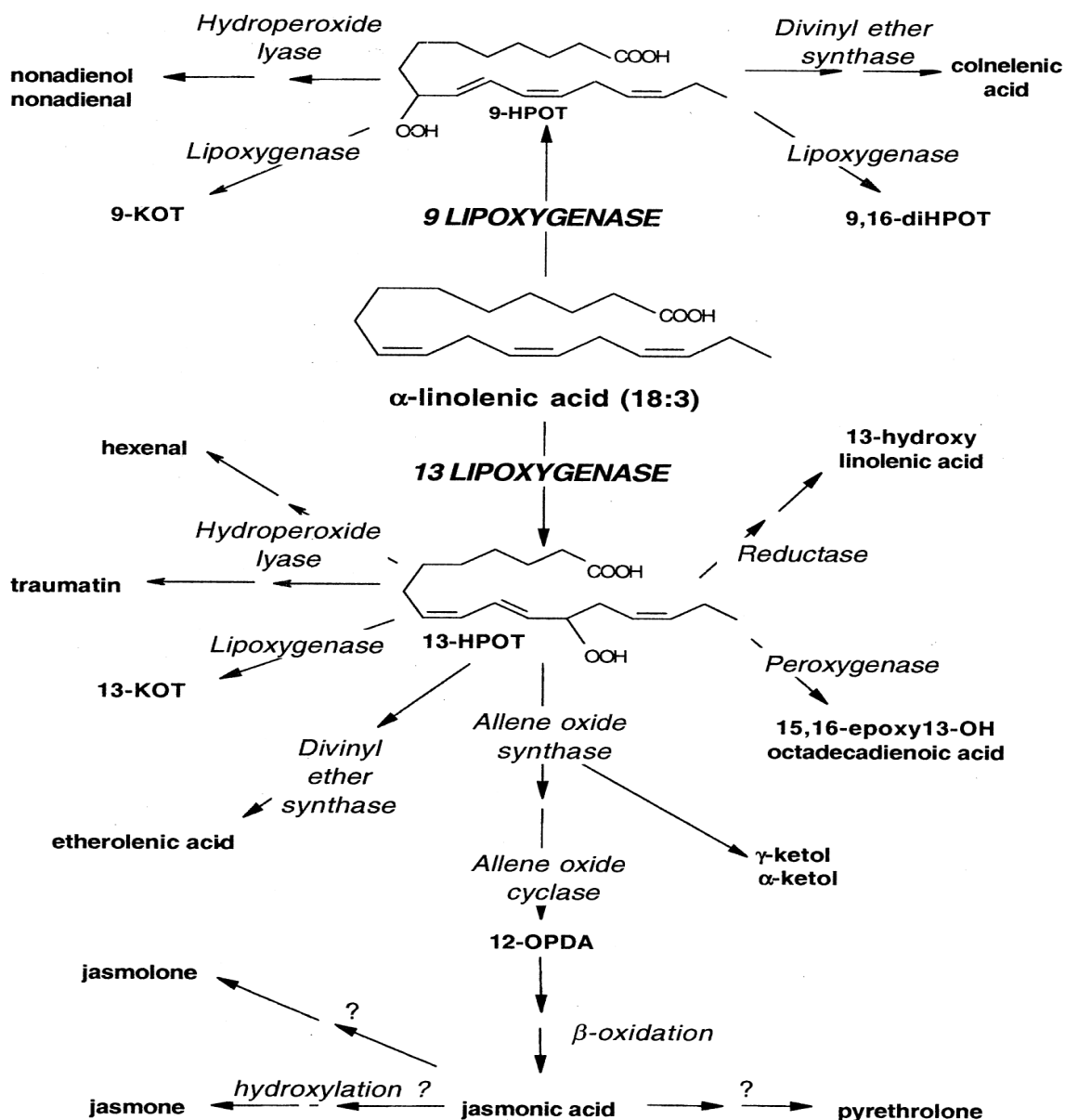
Lipoxygenasy (lipoxidasy, lipoperoxidasy, linoleát: oxygen oxidoreduktasy, EC 1.13.11.12, LOX) je označení pro širokou skupinu rostlinných a živočišných enzymů patřících mezi dioxygenasy. Jsou to metaloenzymy obsahující v aktivním centru nehemové železo. Tyto enzymy katalyzují dioxygenaci polynenasycených mastných kyselin obsahujících cis,cis-1,4- dienovou strukturu za vzniku jejich hydroperoxidových derivátů:



Obr. 23. *Reakce katalyzovaná lipoxygenasou [67]*

V živočišných systémech lipoxygenasa katalyzuje přeměnu kyseliny arachidonové na kyselinu hydroperoxyeikosatetraenovou, což je počátek syntézy regulačních molekul (lipoxiny a leukotrieny), které jsou mediátory zánětlivých procesů a alergických reakcí v organismu [67].

Lipoxygenasy v rostlinách hrají významnou úlohu v metabolické dráze označené jako lipoxygenasová (oktadekanová), jejíž konečné produkty fungují jako růstové regulátory, antimikrobiální a antifungální sloučeniny, aromatické látky a jako signální molekuly. Vzhledem k funkci těchto konečných produktů a na základě vzájemného vztahu mezi zvýšením exprese proteinu LOX a začátkem specifických procesů se předpokládá účast LOX při růstu a také v odpovědi rostlin na stres, čímž může být infekce nebo poranění. Jako substráty slouží pro lipoxygenasu kyselina linolová a linolenová, které jsou hlavními polynenasycenými mastnými kyselinami rostlinných membránových fosfolipidů [67].



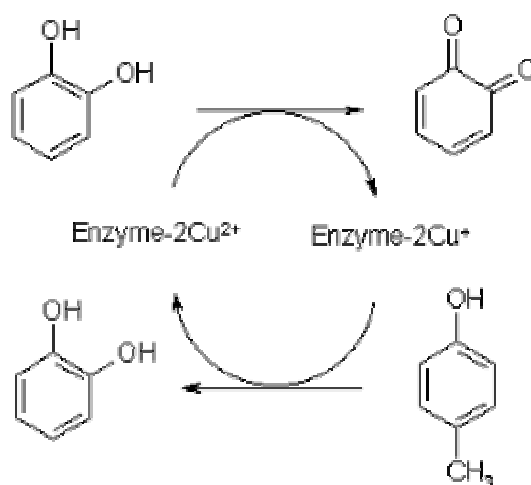
Obr. 24. Metabolická dráha lipoxygenas v rostlinných buňkách [68]

Lipoxygenasa se nachází ve většině rostlinných orgánů, přičemž jejich aktivita se mění v závislosti na stupni vývoje a vlivu stresových faktorů. Nejvyšší aktivita byla naměřena v klíčících semenech a rychle se dělicích pletivech [67, 68].

LOX pravděpodobně hraje důležitou úlohu během programované smrti rostlinných buněk; byla zaznamenána masivní produkce hydroperoxidů volných polynenasycených mastných kyselin, katalyzovaná 9-lipoxygenasou, během hypersenzitivní reakce rostlinných buněk na útok patogenů. Hydroperoxidy mastných kyselin a jejich redukované formy jsou schopny indukovat fragmentaci DNA a buňkovou smrt [69].

2.3.4.2. Polyfenoloxidas

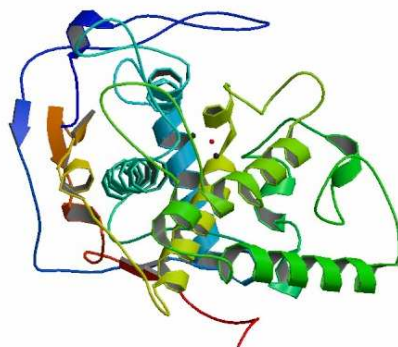
Polyfenoloxidas (tyrosinasa, EC 1.14.18.1, PPO) je tetramer tvořený čtyřmi bílkovinnými řetězci obsahujícími čtyři atomy jednomocné mědi. Enzym katalyzuje oxidaci fenolů na chinony, konkrétně hydroxylaci monofenolů na o-difenoly (kreolasová aktivita) a oxidaci bifenyolů na o-chinony (katecholasová aktivita).



Obr. 25. Schéma reakce katalyzované polyfenoloxidasou [70]

Polyfenoloxidas se nachází v rostlinných materiálech, zejména v ovoci; je lokalizována v chloroplastech. Reakcí vzniklé chinony samovolně polymerují za vzniku černých, hnědých a červených pigmentů (polyfenolů), které způsobují hnědnutí rostlin. Reakce je nazývána enzymovým hnědnutím, které nastává v důsledku fyziologických dějů v rostlině (zrání a stárnutí), poškození tkáně (stlačení, pořezání, potrhání) a patogenní infekcí [71].

Aktivitu polyfenoloxidasy inhibují sloučeniny vytvářející komplexy s mědí; enzym je rovněž inhibován kyselinou benzoovou a kyanidem [72].



Obr. 26. Struktura polyfenoloxidasy [73].

2.4. Metody k posouzení oxidačního poškození organismu

Detekce radikálů bývá velmi obtížná vzhledem ke krátkému času jejich existence. V praxi se proto přistupuje k měření následků jejich působení. Byly vyvinuty metody, které měří produkty radikálových reakcí a ukazatele poškozených biomolekul a stanovují změny v antioxidační kapacitě organismu. Stanovují se spektrofotometrickými, fluorescenčními či chemiluminiscenčními metodami, chromatograficky a imunochemicky [1].

2.4.1. Elektronová paramagnetická rezonance

Jednou z metod detekce volných radikálů je elektronová paramagnetická (spinová) rezonanční spektrometrie. EPR (ESR) přímo prokazuje přítomnost volných radikálů a jejich identitu. Principem je vystavení vzorku mikrovlnnému záření v silném magnetickém poli. Sledují se změny kmitočtu tohoto záření při průchodu vzorkem v závislosti na měnící se intenzitě magnetického pole. Energetické přechody nepárových elektronů se projeví jako typický signál na osciloskopu [74].

2.4.2. Stanovení superoxidu

Superoxidový radikál je možno detekovat přímo měřením absorbance v UV oblasti [75], nebo lze využít jeho schopnosti redukovat donorovou molekulu (cytochrom *c*, nitrotetrazoliová modř) na barevný produkt. [76, 77, 78].

Dalším používaným postupem je kombinace HPLC a chemiluminiscence. Měří se inhibice chemiluminiscence luminolu látkami separovanými při HPLC. Jelikož luminol je schopen reagovat s různými reaktivními kyslíkovými radikály, postihuje tato metoda široké spektrum antioxidační aktivity látek.

2.4.3. Metody pro detekci hydroxylového radikálu

Detekce je založena na vychytávání radikálu látkami, jejichž reakční produkty lze snadno stanovit. Antioxidanty vychytávající $\text{OH}^\bullet$ snižují tvorbu těchto produktů. Jedním z možných postupů je vychytávání $\text{OH}^\bullet$ salicylovou kyselinou. Vznikají hydroxylované produkty salicylové kyseliny, jejichž detekce a kvantifikace se provádí metodou HPLC s UV detekcí [79].

2.4.4. Stanovení peroxidu vodíku

Pro stanovení peroxidu vodíku se používá celá řada metod, např. přímá spektrofotometrie při 240 nm [80], měření kyslíku elektrodou po přidání katalasy [8] nebo fluorimetrická detekce s využitím peroxidasové reakce [81].

2.5. Metody posuzující intenzitu lipidové peroxidace

Bylo vyvinuto mnoho metod hodnotících vliv antioxidantů na lipidovou peroxidaci, od nejjednodušších, které jsou prováděny s jednoduchými lipidy a v jednoduchých fázových systémech, až po složitější biologické modely simulující situaci *in vivo* a využívající biologické membrány jako matrici. Častým postupem je užití fosfolipidových liposomů

nebo studium na mikrosomech. Další modifikací je sledování lipidové peroxidace na tkáňových homogenátech, mitochondriích nebo LDL-částicích [82].

2.5.1. Stanovení malondialdehydu

Jednou z nejužívanějších metod k hodnocení schopnosti látek eliminovat lipidovou peroxidaci je metoda TBA-MDA. Je založena na stanovení jednoho ze sekundárních produktů lipidové peroxidace - malondialdehydu (MDA) - na základě jeho barevné reakce s kyselinou thiobarbiturovou (TBA), měří se absorpance při 532 nm. Spektrofotometrické stanovení aduktů TBA-MDA je jednoduché a citlivé, avšak nespecifické, zahrnuje stanovení všech látek reagujících s TBA (TBARs produkty). Specifičtější vyhodnocením kvantity aduktů TBA-MDA je metoda HPLC [83].

2.5.2. Stanovení 4-hydroxy-2-nonenalu

4-Hydroxy-*trans*-2-nonenal (4-HNE) je vysoce reaktivní produkt lipidové peroxidace, která probíhá na fosfolipidech vázaných na buněčných membránách.

Metody stanovení využívají reakce 4-HNE s 2,4-dinitrofenylhydrazinem na 2,4-dinitrofenylhydrazon (DNPH). Ten lze následně měřit spektrofotometricky při 340 nm nebo detekovat elektrochemicky. Vzhledem k tomu, že s 2,4-dinitrofenylhydrazinem reagují všechny aldehydy, je nutná separace 4-HNE, většinou pomocí HPLC [84]. 4-HNE lze stanovit rovněž pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí; nevýhodou tohoto stanovení je náročná příprava vzorků [85].

2.6. Metody posuzující oxidaci proteinů

Oxidace proteinů mohou v konečném důsledku způsobovat řadu změn v biologickém systému. Řada metod k určení míry oxidací je založena na detekci těchto změn. Může jít například o snížení přirozené fluorescence, změnu isoelektrického bodu či zvyšování nebo snižování molekulové hmotnosti bílkovin v důsledku kovalentních interakcí nebo rozštěpení peptidů [86]. V současnosti nejsou vyvinuty metody ke stanovení individuálních oxidovaných produktů ve směsi oxidovaných a neoxidovaných proteinů.

2.6.1. Stanovení karbonylových skupin proteinů

Karbonylové skupiny pocházejí z oxidativního štěpení proteinových řetězců, přímou oxidací aminokyselin (lysinu, argininu, histidinu, prolinu, glutamové kyseliny a threoninu) nebo navázáním aldehydů a ketonů vzniklých peroxidací lipidů [87].

Principem metody je reakce karbonylové skupiny s 2,4-dinitrofenylhydrazinem na barevný produkt, který lze měřit spektrofotometricky při 370 nm [88]. Specifitu stanovení lze zvýšit použitím identifikačních metod – např. HPLC, elektroforéza nebo Western blotting s použitím anti-dinitrofenylového antiséra a následnou imunochemickou detekcí [86].

2.6.2. Stanovení dihydroxyfenylalaninu

Dihydroxyfenylalanin (DOPA) je produkt hydroxylace thyrozinu, který může sloužit jako důležitý marker při hodnocení oxidačního poškození proteinů. Běžně se stanovuje pomocí fluorescenční detekce po hydrolýze proteinů a jejich rozdělení pomocí HPLC [89].

2.6.3. Stanovení konečných produktů pokročilé glykace

Stanovení AGEs je založeno na imunochemické detekci proteinů modifikovaných glykací; jinou možností je HPLC detekující konkrétní konečné produkty glykace.

Spektrofluorimetrická metoda dle Henleho může být použita ke stanovení skupiny fluoreskujících produktů pokročilé glykace [90].

2.6.4. Stanovení pokročilých produktů oxidace proteinů

Pokročilé produkty oxidace proteinů (Advanced Oxidation Protein Products – AOPP) vznikají účinkem chlorovaných oxidantů, hlavně kyseliny chlorné a chloraminů (produkovaných myeloperoxidase v aktivovaných neutrofilech). Předpokládá se, že jsou strukturně podobné glykovaným proteinům a vykazují podobné biologické aktivity – indukci zánětlivých cytokinů a adhezivních molekul [91]. Zvýšené hladiny AOPP se nacházejí u pacientů s renální nedostatečností nebo po vyjmutí ledviny [92].

Měření AOPP je založeno na spektrofotometrické detekci produktů s charakteristickou absorpcí po reakci s jodidem draselným a kyselinou octovou; vzniklý produkt je měřen při 340 nm [93].

2.7. Metody posuzující poškození nukleových kyselin

2.7.1. Měření nukleových kyselin poškozených HO• radikálem

Metoda k vyhodnocení intenzity oxidačního stresu je založena na sledování oxidačního poškození sacharidů – sleduje se rozklad deoxyribosy v DNA [94]. Fluorescenční metoda je založena na hodnocení rozvinování šroubovice DNA. Štěpy řetězců DNA bývají detekovány pomocí elektroforézy.

2.7.2. Stanovení 8-hydroxy-2'-deoxyguanosinu

8-hydroxy-2'-guanosin (8-OHdG) patří mezi oxidačně modifikované nukleosidy a je proto považován za hlavní biomarker u oxidačního poškození DNA, u karcinogeneze a u degenerativních onemocnění. Ke stanovení se používá HPLC s elektrochemickou detekcí, GC-MS nebo HPLC-MS [95].

2.8. Analýza stopových prvků

Stopové prvky jsou významné komponenty antioxidačního systému a katalyzátory radikálových reakcí. V praxi se sledují zejména selen, zinek, měď, a železo. V současné době patří mezi nejrozšířenější techniky atomová absorpční spektrofotometrie, hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem a optická emisní spektrometrie.

2.9. Analýza antioxidantů

Oxidační stres může být způsoben oslabením antioxidantní ochrany organismu a naopak dlouhodobé oxidační zatížení může oslabit antioxidantní systém. Měření jednotlivých složek antioxidantního systému je prakticky nejvýznamnější a nejdostupnější. Pro stanovení antioxidantních enzymů (superoxiddismutasy, glutathionperoxidasy, katalasy, peroxidasy) jsou nejčastěji používány spektrofotometrické techniky. Nízkomolekulární antioxidanty (kyselina askorbová, karotenoidy, tokoferol atd.) jsou analyzovány nejčastěji pomocí HPLC s UV-VIS nebo coulchemickou detekcí [96].

2.9.1. Metody stanovení aktivity katalasy

Stanovení aktivity katalasy využívají její účasti v rozkladu peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Jednotka aktivity (1 U) je definována jako množství katalasy, které rozloží 1 μmol peroxidu vodíku za 1 minutu za předem definovaných podmínek.

Jednoduché kvantitativní stanovení aktivity katalasy je založeno na přímém spektrofotometrickém měření úbytku známé koncentrace peroxidu vodíku [97]. Lineární pokles je zaznamenáván při 240 nm a aktivita katalasy je vypočtena za pomoci známé hodnoty molárního extinkčního koeficientu peroxidu vodíku – $\epsilon = 43,6 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ [98]. Kromě spektrofotometrického měření je možné stanovit koncentraci zbylého peroxidu manganometricky.

Stanovení aktivity je možné rovněž provádět pomocí polarografie, kde je pomocí kyslíkové elektrody měřen přírůstek kyslíku v reakční směsi [80].

Pro rutinní stanovení většího množství vzorků v krátkém čase se spektrofotometrická metoda nejeví jako vhodná, jelikož vzorky je nutno měřit postupně; došlo tedy k optimalizaci reakce a nástupu kolorimetrie. Kolorimetrické metody jsou založeny na zastavení enzymatické reakce a na reakci zbylého peroxidu vodíku s činidlem za vzniku barevného produktu, který absorbuje ve viditelné oblasti spektra; touto metodou lze měřit více vzorků najednou bez nutnosti vlastnit spektrofotometr. Další výhodou stanovení je eliminace interferujících látek (např. bílkovin), které rovněž absorbují při 240 nm a mohou rušit stanovení.

Jako činidlo vytvářející barevný komplex s peroxidem může sloužit 3,5-dichlor-2-hydroxybenzenesulfonová kyselina, která v přítomnosti peroxidu vodíku reaguje se 4-aminoantipyrinem za vzniku červeného chinoniminového barviva, absorbujícího při 520 nm [99].

Dalším činidlem reagujícím s peroxidem je molybdenan amonný, který vytváří žlutě zbarvený komplex absorbující při 375 nm [100].

2.9.2. Metody stanovení aktivity glutathionperoxidasy

Nejběžnější stanovení aktivity glutathionperoxidasy je založeno na sledování úbytku NADPH v recyklující reakci oxidace a redukce glutathionu. Glutathionperoxidasa (GPx) katalyzuje oxidaci glutathionu (GSH) peroxidem. V přítomnosti glutathionreduktasy (GR) a NADPH je oxidovaný glutathion (GSSG) okamžitě převeden na redukovanou formu se současnou oxidací NADPH na NADP^+ . Sleduje se úbytek absorbance při 340 nm [101].



Tato metoda umožňuje stanovení všech izoform GPx. Pro oxidaci glutathionu lze použít peroxid vodíku, avšak tato reakce bývá velmi rychlá; proto jsou pro oxidaci využívány organické hydroperoxy (terc-buthydroperoxid, kumenhydroperoxid), u nichž je rychlost reakce podstatně nižší [102].

Při jiném stanovení aktivity GPx je využito kapilární elektroforézy. Měření je založeno na separaci a kvantifikaci redukovaného a oxidovaného glutathionu [103].

2.9.3. Metody stanovení aktivity peroxidasy

Stanovení aktivity peroxidasy je založeno na oxidoredukční reakci, ve které peroxidasa katalyzuje redukci peroxidu vodíku na vodu. Jako donor elektronů pro vodík slouží specifické produkty, jejichž molekuly se při reakci konvertují z bezbarvých/nefluorescenčních na barevné/fluorescenční, které je možno stanovovat spektrofotometricky nebo luminometricky. Množství vytvořeného produktu je mírou katalytické aktivity enzymu.

Pro spektrofotometrické stanovení aktivity může jako donor elektronů sloužit N,N-dimethyl-p-fenylendiamin [104], guaiacol [105], TMB - tetramethylbenzidin [106] nebo ABTS - amonná sůl 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny) [107].

Pro luminiscenční stanovení se jako substráty používají fenolické sloučeniny, hlavně pyrogallol [108] nebo hydrazidy – např. luminol [109].

2.9.4. Metody stanovení aktivity superoxiddismutasy

Ke stanovení aktivity enzymu superoxiddismutasy existují přímé i řada i nepřímých metod. U eukaryot lze stanovovat aktivitu celkové SOD nebo jednotlivých izoform – Cu,Zn-SOD i Mn-SOD tak, že jsou upraveny podmínky reakce, či přidáno činidlo, které inhibuje konkrétní izoformu; odečtem aktivity konkrétní izoformy od celkové aktivity lze pak získat hodnoty všech aktivit zúčastněných izoform. Nejčastěji používané činidlo je kyanid draselný, který inhibuje aktivitu Cu,Zn-SOD již v milimolárních koncentracích, zatímco Mn-SOD je rezistentní.

Přímé stanovení aktivity je založeno na spektrofotometrickém sledování úbytku superoxidového radikálu, generovaného superoxidem draselným při pH 9,5. Sleduje se pokles absorbance ($A_{250\text{nm}} - A_{360\text{nm}}$) po přidání vzorku obsahujícího superoxiddismutasu ke směsi, obsahující superoxidový radikál. Tato metoda je určena pro stanovení aktivity Cu,Zn-SOD, protože v alkalickém prostředí je Mn-SOD inhibována [110].

Nepřímé metody ke stanovení aktivity SOD jsou v praxi rozšířenější. Všeobecným principem nepřímé metody je generování superoxidového radikálu, který reaguje s činidlem za vzniku barevné sloučeniny. SOD zhasí superoxidový radikál a tím způsobuje úbytek zbarvení v reakční směsi. Aktivita SOD je hodnocena jako schopnost inhibovat tvorbu barevné sloučeniny.

Mezi nepřímé metody stanovení aktivity patří metoda založená na fotosenzitivní oxidaci glycytryptofanu riboflavinem, který je doprovázen chemiluminscencí. Superoxiddismutasa

blokuje formaci luminiscenčního produktu. Závislost aktivity SOD na poklesu chemiluminiscence je přímo úměrná [111].

Často používanými metodami ke stanovení aktivity jsou reakce s tetrazoliovými solemi; tyto reagují s vygenerovaným superoxidovým radikálem za tvorby barevného formazanu. NBT metoda ke stanovení aktivity Cu,Zn-SOD i Mn-SOD je založena na tom, že obě izoformy inhibují redukci NBT (NitroBlueTetrazoliumchlorid; 2,2'-bis(4-nitrofenyl)-5,5'-difenyl-3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-difenylen)ditetrazolium chlorid). Redukce NBT vede ke vzniku modře zbarveného formazanu a je způsobena superoxidovými radikály, které jsou generovány působením světla na riboflavin [112].

U metody INT je využito tetrazoliové soli INT (IodoNitroTetrazolium Violet; 2-(4-jodfenyl)-3(4-nitrofenol)-5-(fenyltetrazolium) chlorid), který je redukován působením superoxidových radikálů na růžově zbarvený formazan detekovatelný při 505 nm. Superoxidové radikály jsou generovány při vzniku kyseliny močové při reakci xanthinu s xanthinoxidasou.

Jednotka aktivity SOD je u této metody definována jako schopnost inhibovat tuto tvorbu formazanu z 50 % [112].

2.10. Stanovení celkové antioxidační kapacity

Celková antioxidační kapacita je termín charakterizující souhrnnou koncentraci všech látek s antioxidačními účinky ve vzorku. Obecným principem stanovení je cílená tvorba radikálů ve vzorku a stanovení schopnosti vzorku tuto tvorbu zastavit nebo alespoň zpomalit [1].

Pro stanovení celkové antioxidační kapacity byla vyvinuta široká řada metod. Důvodem je schopnost antioxidantů působit různými mechanismy – např. zhášením či vychytáváním radikálů nebo reakcí s přechodnými kovy. Všeobecně jsou metody rozděleny do dvou základních skupin – metody založené na likvidaci kyslíkových a syntetických radikálů a metody založené na likvidaci hydroxylových radikálů [82].

2.10.1. TRAP metoda

Metoda TRAP (Total Radical Trapping Parameter) je založena na generování peroxylových radikálů z 2,2'-azobis-(2-amidinopropan)-dihydrochloridu (ABAP). Po přidání ABAP k biologickému vzorku jsou oxidační reakce monitorovány měřením spotřeby kyslíku pomocí kyslíkové elektrody. Počáteční lag fáze před vzrůstem spotřeby kyslíku je úměrná antioxidační kapacitě vzorku. Měření je standardizováno na známou koncentraci troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-karboxylové kyseliny), ve vodě rozpustného analogu vitamínu E [113].

Tato metoda byla optimalizována Uotilou *et. al* pro chemiluminiscenční měření [114]. Princip reakce spočívá v přidání luminolu (5-amino-2,3-dihydro-1,4-ftalazindionu) do reakční směsi. Luminol detekuje radikály vznikající pyrolýzou ABAP za vzniku signálu měřeného luminometrem. Po přidání vzorku s antioxidanty dojde k vychytávání radikálů a ke snížení chemiluminiscenčního signálu. Jakmile jsou antioxidanty ve vzorku vyčerpány, signál se opět zvýší. Antioxidační kapacita je úměrná době, po kterou je vzorek schopen vychytávat radikály [114, 115].

2.10.2. ABTS^{•+} metoda

Metoda ABTS je založena na schopnosti vzorků vychytávat radikály generované z ABTS (2,2'-azinobis (3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonátu). Měření je standardizováno jako v případě TRAP na známou koncentraci troloxu; podle něj bývá tato metoda také nazývána jako TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) [116].

ABTS je v reakční směsi oxidován peroxidem vodíku na radikál-kation ABTS^{•+}. Radikály reagují se substrátem (metmyoglobin) za vzniku modrozeleného zbarvení, které je měřeno spektrofotometricky při 600 nm. Antioxidanty v biologickém vzorku fungují jako donory elektronů pro ABTS^{•+}. Antioxidační kapacita je vyhodnocena jako míra schopnosti potlačit tvorbu ABTS^{•+} a tím i tvorbu barevného produktu.

2.10.3. DPPH metoda

DPPH metoda je založena na schopnosti vzorku redukovat stabilní radikál DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl) za vzniku DPPH-H (difenyldipikrylhydrazin). Reakce je sledována spektrofotometricky při 517 nm buď kineticky [117] nebo po dosažení rovnováhy v koncovém bodě = end-point [118]. Detekci ubývajícího radikálu DPPH je možno provádět pomocí HPLC, což je vhodné hlavně při měření barevných vzorků, které by mohly při spektrofotometrickém stanovení interferovat [82].

Jako standard pro tuto metodu bývá využíván trolox nebo kyselina askorbová [119].

2.11. Metody stanovení aktivit oxidačních enzymů

2.11.1. Stanovení aktivity lipoxygenasy

Pro stanovení aktivity lipoxygenasy byla vyvinuta řada metod. Nejrozšířenější metodou je spektrofotometrické měření. Principem metody je přímé stanovení vznikajících produktů reakce. Vzniklé hydroperoxy obsahují konjugované dvojné vazby, které silně absorbují při 234 nm [120]. Nevýhodou tohoto stanovení je nutnost pracovat v UV oblasti, což znemožňuje automatizaci metody.

Další metody stanovení aktivity využívají měření úbytku substrátu; pomocí kapilární izotachofórey je možno měřit úbytek kyseliny linolové [121]. Jiné metody využívají měření úbytku kyslíku během reakce pomocí kyslíkové elektrody [122].

Na spektrofotometrickém měření jsou založena kolorimetrická stanovení, která využívají oxidaci látek vzniklými hydroperoxy za vzniku barevné sloučeniny. Jiang *et al.* popisuje schopnost hydroperoxidů oxidovat Fe²⁺ na Fe³⁺. Vzniklé železité kationty vytváří s xylenolovou oranž modrozelené zbarvení, které absorbuje při 560 nm [123]. Na podobném principu je založena metoda podle Anthona a Barrettové; vznikající hydroperoxy způsobují oxidaci 3-methyl-2-benzothiazolinu (MBTH) a 3-(dimethylamino)benzoové kyseliny (DMAB) za vzniku purpurového 4,4-iminobis(benzenaminu) [124].

2.11.2. Stanovení aktivity polyfenoloxidasy

Nejčastějším stanovením aktivity polyfenoloxidasy je spektrofotometrické stanovení; jako substrát pro reakci se využívá thyrosin, který je oxidován PPO na dihydroxyfenylalanin a dále na o-chinon, jehož zvyšující se koncentrace je měřena spektrofotometricky při 280 nm.

Jako donor kyslíku slouží peroxid vodíku [71]. Nevýhodou tohoto stanovení je měření v UV spektru. Pro měření v barevné oblasti spektra je možno využít metody, ve které PPO katalyzuje oxidaci 4-terc-butylcatecholu na 4-terc-butyl-o-benzochinon, který následně reaguje se 4-amino-N,N-diethylanilinem za vzniku modrého produktu s absorpčním maximem při 625 nm [125].

2.12. Metody využívané k izolaci a stanovení aktivních látek v biologických matricích

2.12.1. Extrakce

Extrakce je separační metoda, při které přechází složka ze směsi látek v kapalně či tuhé fázi do jiné kapalně fáze. Na rozdíl od destilace, krystalizace a sublimace je extrakce velmi výhodná pro izolaci tepelně nestálých látek, protože se může provádět i za laboratorní teploty nebo za chladu. Cílem extrakce je selektivní až specifické oddělení analytu od ostatních složek nebo naopak oddělení rušících látek od analytu. [126].

Při extrakci z kapaliny do kapaliny se analyty rozdělují mezi dvě nemísitelné fáze, přičemž podmínkou rozdělení je ustanovení fázové rovnováhy mezi těmito kapalinami – výchozím vzorkem s analytem a rozpouštědlem, do kterého máme zájem analyt v co největší míře převést. V praxi bývá jedním rozpouštědlem voda nebo vodný roztok, zatímco druhé rozpouštědlo je organické, s vodou nemísitelné. Protřepáním těchto kapalin v dělicí baňce se po čase mezi nimi ustaví rovnováha, kterou popisuje Nernstův rozdělovací zákon:

$$k = \frac{c_{org.}}{c_{H_2O}}, \quad (19)$$

kde c_{org} je rovnovážná látková koncentrace složky v organickém rozpouštědle, c_{H_2O} je rovnovážná látková koncentrace složky ve vodě a k je Nernstův rozdělovací koeficient [127].

Účinnost extrakce je udávána jako procentuální podíl látky A, který se vyextrahoval do organické fáze:

$$A (\%) = \frac{100 \cdot k}{k + \frac{V_{H_2O}}{V_{org.}}}; \quad (20)$$

čím je objem organické fáze větší, tím je extrakce účinnější. Poměr objemů organické a vodné fáze $\frac{V_{org.}}{V_{H_2O}}$ se označuje jako fázový poměr β .

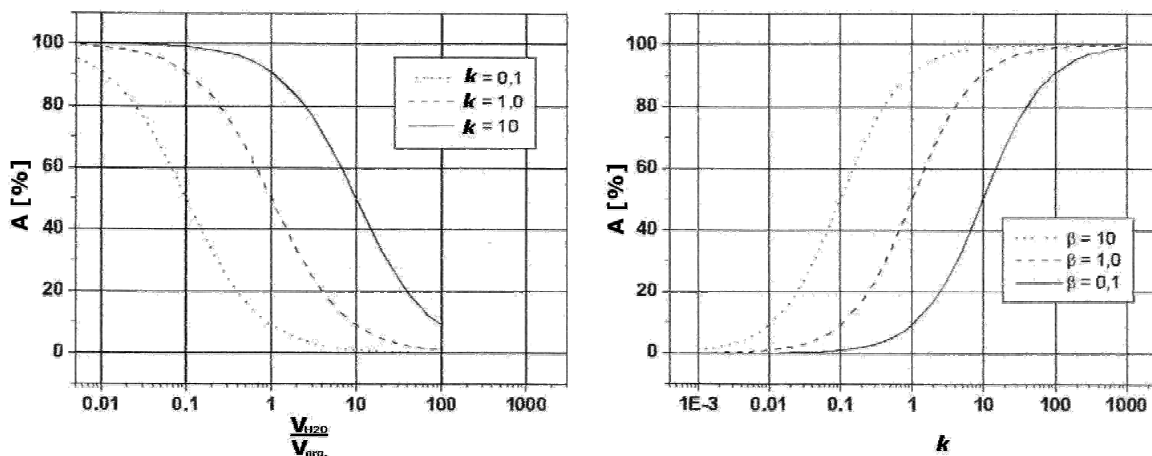
Zvětšení účinnosti extrakce se dosahuje opakovanou extrakcí vodné fáze menším množstvím organické fáze a spojením výsledných extraktů.

Účinnost n opakovaných extrakcí udává výsledný procentový obsah extrahované látky ve spojených extraktech:

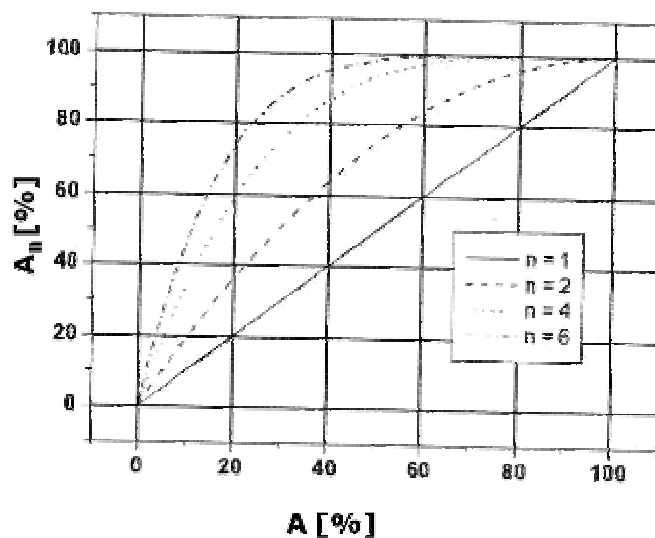
$$A_n (\%) = 100 \left[1 - \left(\frac{100 - A}{100} \right)^n \right] \quad (21)$$

Počet extrakcí nutných k dosažení výsledné účinnosti udává vztah:

$$n = \frac{\log \frac{100 - A_n}{100}}{\log \frac{100 - A}{100}} \quad (22)$$



Obr. 27. Závislost výtěžku extrakce A na poměru objemů fází a na rozdělovacím koeficientu [126]



Obr. 28. Závislost výtěžku n -stupňové extrakce A_n na A [126]

K dosažení 100% extrakce daného analytu by bylo třeba nekonečně mnoho kroků; s rostoucím počtem extrakcí se účinnost blíží 100 %.

V praxi se volí experimentální podmínky tak, aby bylo možno provádět extrakci maximálně třikrát [128].

Pro izolaci vitaminů rozpustných v tucích byly popsány univerzální postupy. Sledované lipofilní vitaminy (A, E) a barviva (β -karoten, lutein,) se ve většině případů extrahují nepolárními organickými rozpouštědly, jako je petrolether, diethylether, ethylacetát a hexan.

Stanovované látky se vyskytují v rostlinných pletivech buď volně, např. v listech, nebo vázané ve formě chromoproteinů, např. v plodech. Kvantitativní izolace je značně závislá na homogenitě vzorku a tudíž na důkladné homogenizaci [129].

2.12.2. Absorpční spektrofotometrie

Absorpční spektrální analýza je založena na schopnosti látek pohlcovat zářivou energii. Absorpce záření je popsána matematickými vztahy, které v integrální formě vedou k Lambertovu-Beerovu zákonu, který je současně znám i jako definice absorbance:

$$\log I_0/I = \varepsilon \cdot c \cdot l = A \quad (23)$$

kde A – absorbance, ε – extinkční koeficient, c – koncentrace látky v roztoku a l – tloušťka optické vrstvy. Lamber-Beerův zákon je zákonem mezním. Platí pro zředěné roztoky, přísně monochromatické záření, a to buď v homogenním nebo heterogenním prostředí. Měří se při konstantní vlnové délce a při konstantní tloušťce kyvety se zjišťuje hodnota absorbance.

Absorpční spektrometrie využívá monochromatického záření UV a VIS spektra, získaného pomocí hranolového nebo mřížkového monochromátoru. V UV oblasti se používá jako zdroj záření deuteriová lampa, ve VIS oblasti lampa halogenová nebo wolframová. Vzorek je umístěn v kyvetě. Skleněná je použitelná pro viditelnou oblast, křemenná pro oblast ultrafialovou [127].

2.12.3. Hmotnostní spektrometrie

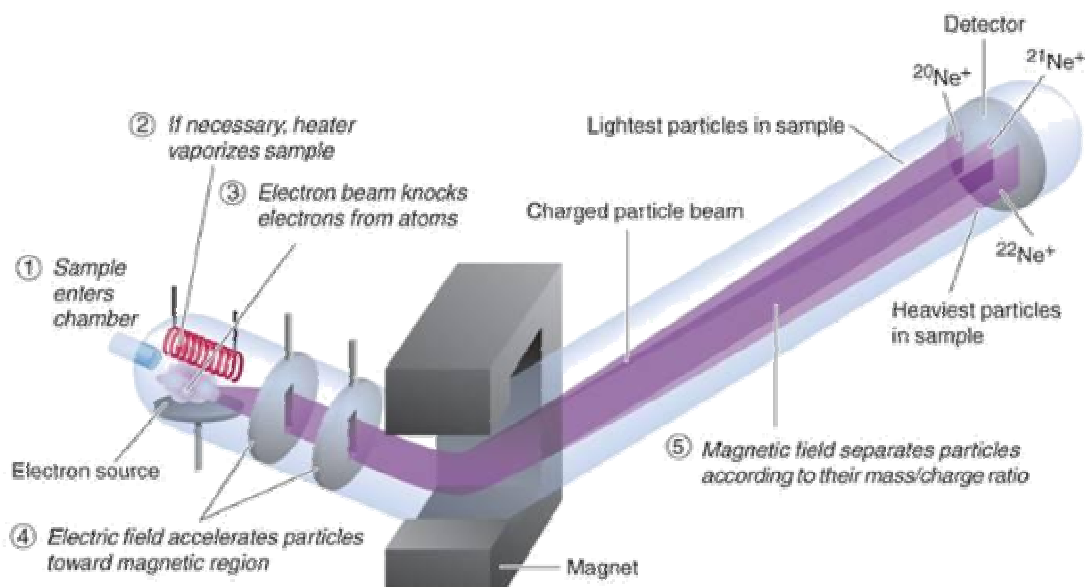
Hmotnostní spektrometrie stanovuje hmotnosti molekul a atomů po jejich převedení na ionty. Podstatou hmotnostní spektrometrie je separace iontů produkovaných v iontovém zdroji přístroje na základě jejich efektivní hmotnosti (m/z , kde m – hmotnost iontu a z – nábojové číslo) a jejich následná detekce. Všechny tyto procesy probíhají v uzavřeném prostoru, ve kterém je pomocí systému pump kontinuálně udržováno vakuum [130].

Hmotnostní spektrometr se skládá z několika částí – iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru, detektoru a počítačové jednotky [131].

K produkci iontů se využívá řady způsobů – ionizace elektronovým paprskem (EI), chemická (CI), ionizace rychlými atomy a ionty (Fast Atom Bombardment – FAB), působením elektrostatického pole (Field Ionisation – FI; Field Desorption – FD), desorpce plasmou (PD), desorpce laserem za přítomnosti matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation – MALDI) nebo pevných částic (SALDI), či ionizace elektrosprejem (ESI) nebo termosprejem (TSI). [130]. Energetická náročnost ionizace závisí na typu analyzované látky. Pro většinu organických látek se pohybuje prahová ionizační energie v rozmezí 7-16 eV [126].

Hmotnostní analyzátor (iontová past, průletový analyzátor TOF, kvadrupolový analyzátor) slouží k rozdělení směsi iontů podle jejich poměru m/z [131].

Detektor poskytuje signál úměrný počtu dopadajících iontů, buď detekcí elektrického proudu, vznikajícího přímým dopadem iontů a nebo pomocí elektronového násobiče pracujícího na principu sekundární emise elektronů, kde dochází k zesilování primárního signálu. Výsledkem metody je záznam iontů zkoumaného vzorku, tzv. hmotnostní spektrum, na kterém je v závislosti na hodnotě m/z zobrazeno zastoupení jednotlivých iontů [130].



Obr. 29. Schéma hmotnostního spektrometru [132]

Hmotnostní spektrometrie je využívána pro strukturní analýzu a identifikaci chemických individuí, poskytuje informace o funkčních skupinách obsažených v molekule analyzované látky, umožňuje určovat izotopové složení zkoumané látky nebo analyzovat nečistoty v látkách. Spojení hmotnostního spektrometru s moderními separačními metodami pak umožňuje provádět stopovou kvalitativní i kvantitativní analýzu látek v komplexních maticích [131].

2.12.4. Chromatografické metody

Pod názvem chromatografické metody zahrnujeme všechny operace, jež spočívají na různých fyzikálně-chemických principech, při nichž dochází k postupnému, mnohonásobně opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi dvěma, popřípadě i více fázemi. Jedna fáze, zvaná stacionární, je umístěna v koloně (při kolonové chromatografii). Druhá, která unáší separované látky, je mobilní fáze. Stacionární fáze, nacházející se ve formě částecek tuhé látky nebo jako kapalina, může být umístěná na povrchu inertního nosiče. Při styku stacionární i mobilní fáze s dělenými látkami dochází k vzájemným interakcím, které jsou základním předpokladem pro jejich úspěšnou separaci [133].

2.12.4.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) se řadí mezi nejčastěji používané separační metody. Vyniká vysokou účinností, dobrou opakovatelností a robustností. Tato metoda je vhodná pro dělení netěkavých a polárních látek, jejichž analýza příbuznou plynovou chromatografií bývá často obtížná.

Vysoké účinnosti a rychlosti se dosahuje u této metody použitím velkých průtoků a tlaků mobilní fáze a krátkých kolon plněných náplněmi z velmi jemných částic. V tomto uzavřeném chromatografickém systému zajišťuje pohyb eluentu vysokotlaké čerpadlo. Kapalinová chromatografie při normálním tlaku vyžaduje pro provedení separace hodiny až dny,

při vysokotlaké vystačíme obvykle s minutami, nejvýše desítkami minut. Použití vysokých tlaků klade značné nároky na instrumentální zařízení HPLC [133].

HPLC je založena na separaci analytů na základě jejich distribuce mezi stacionární a mobilní fází. Během separace dochází k mnoha typům interakcí. Uplatňují se interakce analytů s mobilní fází, interakce mobilní fáze se stacionární fází a sorpce analytů na stacionární fází.

Za předpokladu, že při přechodech analytu (A) z mobilní fáze do fáze stacionární se chromatografický systém přiblíží rovnovážnému stavu, lze tuto distribuci mezi obě fáze popsat distribuční konstantou K_D :

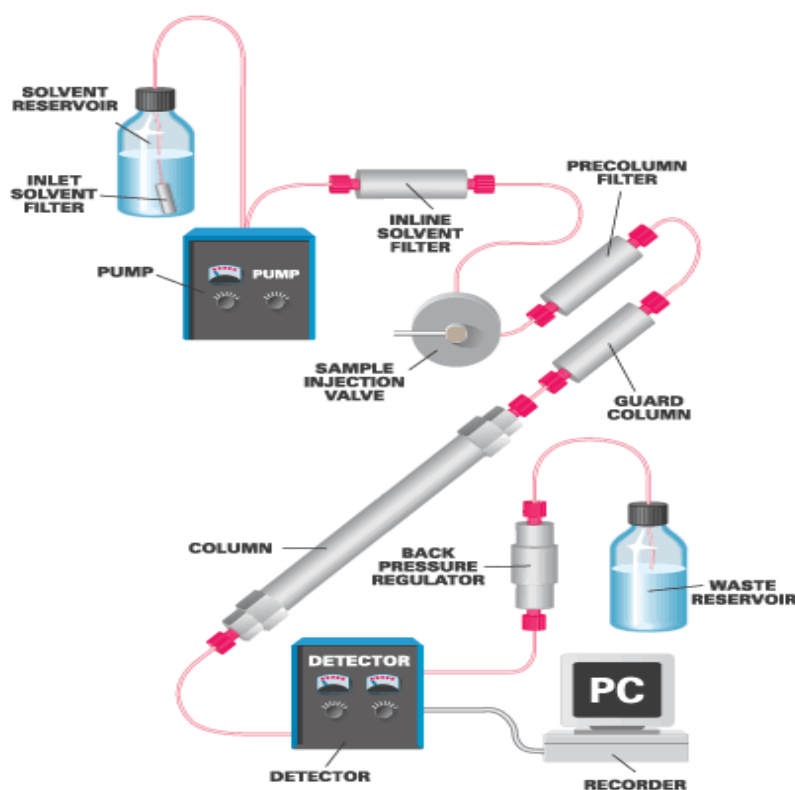
$$K_D = \frac{[A]_s}{[A]_m}, \quad (24)$$

kde $[A]_s$ je rovnovážná koncentrace analytu ve stacionární fázi a $[A]_m$ rovnovážná koncentrace analytu v mobilní fázi.

Na základě rozdílné velikosti této distribuční konstanty jsou některé analyty na koloně zadržovány méně a některé více. To se projeví rozdílem v jejich retenci, která je většinou porovnávána pomocí retenčních faktorů k .

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}, \quad (25)$$

kde t_R je retenční čas analytu (tj. doba od nadávkování vzorku po čas, kdy detektor zaznamená maximum píku), t_M je mrtvý čas (tj. retenční čas látky neinteragující se stacionární fází [133]).



Obr. 30. Schéma HPLC sestavy [134]

Detekce stanovených analytů

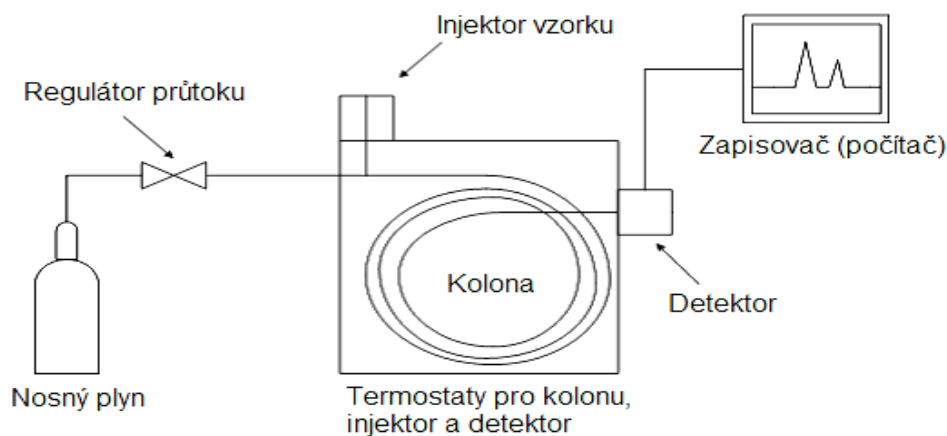
Detektory v HPLC zaznamenávají rozdíl mezi průchodem čisté mobilní fáze a fáze obsahující eluovanou složku. Detektory se nejčastěji dělí na detektory koncentrační a hmotnostní. Koncentrační detektory reagují na změnu hmotnostní koncentrace složky v eluentu. Hmotnostní detektory reagují na změnu hmotnostního toku složky v eluentu. [135].

V HPLC je využívána celá řada detektorů:

- UV/VIS detektory - založeny na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm; kvantitativní vyhodnocení je založeno na Lambert-Beerově zákoně
- fluorimetrické detektory - založeny na principu fluorescence a měření sekundárního záření (emisního), které látka vydá po absorpci primárního elektromagnetického záření (excitačního)
- elektrochemické detektory – používají se k detekci látek, které jsou schopné elektrochemické reakce, probíhající na fázovém rozhraní elektroda - mobilní fáze
- vodivostní detektory - měří elektrickou vodivost eluátu v průtokové cele mezi dvěma elektrodami
- hmotnostní detektor (MS) – založen na generování iontů sledovaných atomů a jejich separaci podle poměru jejich hmotnosti k náboji (m/z) [135].

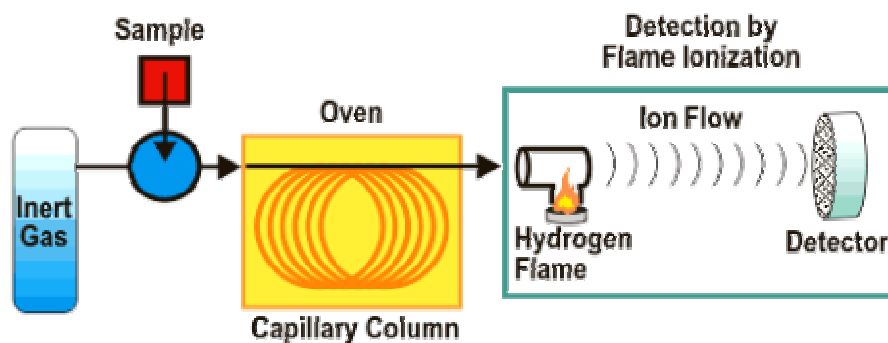
2.12.4.2. Plynová chromatografie – GC

Plynová chromatografie (GC – Gas Chromatography) je separační metoda, která se používá hlavně v analýze těkavých látek. Hlavními výhodami jsou jednoduché provedení analýzy, účinná separace a spotřeba malého množství vzorku.



Obr. 31. Jednoduché schéma plynového chromatografu [136]

Jako stacionární fáze slouží pevná látka (GSC) nebo kapalina (GLC). Mobilní fází je zde plyn, nejčastěji se používají dusík, vodík, helium nebo argon. Průtok mobilní fáze bývá upraven tak, aby došlo k co nejlepšímu rozdělení látek na koloně [136].



Obr. 32. Zjednodušené schéma plynového chromatografu s FID detekcí [137]

Detekce stanovovaných analytů

V plynové chromatografii se používá několik typů detektorů:

- plamenově-ionizační detektor (FID) – založen na vedení vzorku do O₂-H₂ plamene, kde je směs ionizována; vzniklé ionty jsou detekovány na polarizovaných elektrodách; FID je vhodný pro analýzu téměř všech organických látek
- detektor elektronového záchytu (ECD) – selektivní ionizační detektor citlivý na elektronegativní atomy, zejména halogeny
- tepelně-vodivostní detektor (TCD) – založen na změně tepelné kapacity proudícího plynu a změně vodivosti odporového vlákna při průchodu analyzované látky detektorem
- hmotnostní detektor (MS) – založen na generování iontů sledovaných atomů a jejich separaci podle poměru jejich hmotnosti k náboji (m/z).

3. CÍLE PRÁCE

Oxidační poškození biologického systému je velmi složitý proces a pro jeho reparaci a úpravu redoxního stavu buňky je nutno znát hlavní příčiny oxidoredukční nerovnováhy, od které jsou další projevy oxidačního stresu odvozeny. Cílem disertační práce je přispět k poznatkům týkajícím se obsahu látek s antioxidačními účinky v různých typech biologických materiálů a možnost využití těchto znalostí k léčbě následků oxidačního stresu.

Součástí práce je optimalizace metod stanovení vybraných nízkomolekulárních a enzymových antioxidantů v lidském organismu a v potravinách a potravinových doplňcích rostlinného i živočišného původu.

Za účelem splnění cílů práce byla problematika rozdělena na následující dílčí úkoly:

- optimalizace extrakce, identifikace a analýzy obsahu vybraných nízkomolekulárních a enzymových antioxidantů v biologickém materiálu
- výběr a optimalizace metod stanovení obsahu vybraných látek s antioxidačními účinky v extraktech z biologického materiálu
- komplexní analýza obsahu nízkomolekulárních a enzymových antioxidantů ve vybraném biologickém materiálu
- optimalizace stanovení celkové antioxidační aktivity vybraných typů biologického materiálu
- realizace experimentálních klinických studií zaměřených na sledování vlivu exogenní suplementace antioxidanty na vybrané metabolické funkce jedinců.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Přístroje, chemikálie a diagnostické soupravy

4.1.1. Přístroje

sestava HPLC (Ecom, CZ)

- vysokotlaké čerpadlo LCP 4020
- programátor gradientu GP5
- dávkovací analytický ventil smyčkový C R54157
- termostat kolon LCO 101
- spektrofotometrický detektor LCD 2084
- integrátor DataApex CSW verze 1.7

plynový chromatograf Trace GC Ultra (Thermo Electron Corporation, USA)

- plamenově ionizační detektor (FID)
- autoinjektor AI 3000

sestava HPLC (Thermo Fisher Scientific, USA)

- binární gradientová pumpa P2000
- programovatelný autosampler AS3000 s termostatem kolon
- fluorescenční detektor FL3000

automatický analyzátor HITACHI 717 (Roche, SRN)

automatický analyzátor HITACHI 902 (Roche, SRN)

HbA1C analyzátor DS 5 (Drew Scientific Ltd., GB)

UV ± VIS spektrofotometr Helios α, (Unicam, GB)

UV ± VIS spektrofotometr Cary (Varian, USA)

BioOrbit Luminometer 1251 (Turku, Finsko)

analytické váhy (Boeco, SRN)

vakuová odparka JK (Ika-Werke, SRN)

centrifuga U-32R (Boeco, SRN)

ultrazvuk PS02000 (Powersonic s r.o., SR)

4.1.2. Chemikálie

4.1.2.1. Standardní chemikálie

Rutin (Sigma-Aldrich, SRN)

Quercetin (Sigma-Aldrich, SRN)

L-Ascorbic acid (Sigma-Aldrich, SRN)

D,L-α-tocopherol (Sigma-Aldrich, SRN)

β -karoten (Sigma-Aldrich, SRN)

Lutein (α-carotene-3,3'-diol) (Sigma-Aldrich, SRN)

Kyselina gallová (Sigma-Aldrich, SRN)

Katechin (Sigma-Aldrich, SRN)

All-trans-retinol (Sigma-Aldrich, SRN)

Fatty Acid Methyl Esters – směs methylesterů mastných kyselin (Supelco, USA)

4.1.2.2. *Ostatní chemikálie*

Ethanol pro UV spektrofotometrii (Lach-Ner, s r.o., ČR)
Methanol, p.a. (Lach-Ner, s r.o., ČR)
Diethylether p.a. (Lach-Ner, s r.o., ČR)
Kyselina o-fosforečná, p.a. (Lach-Ner, s r.o., ČR)
Folin-Ciocalteuovo činidlo (Vitrum, ČR)
Peroxid vodíku 30% , p.a. (Sigma-Aldrich, SRN)
Methanol pro HPLC, Gradient Grade (Sigma-Aldrich, SRN)
Acetonitril pro HPLC, Gradient Grade (Sigma-Aldrich, SRN)
Katalasa z hovězích jater, 2000-5000 U.mg⁻¹ proteinu (Sigma-Aldrich, SRN)
Nitrotetrazolium blue chlorid 98% (Sigma-Aldrich, SRN)
D,L-methionin 99% (Sigma-Aldrich, SRN)
Riboflavin 98% (Sigma-Aldrich, SRN)
Guaiacol (Sigma-Aldrich, SRN)
Peroxidasa křenová 50-150 U.mg⁻¹ (Sigma-Aldrich, SRN)
Kyselina linolová 99% (Sigma-Aldrich, SRN)
TRIS-HCl, p.a. (Sigma-Aldrich, SRN)
Xylenolová oranž (Sigma-Aldrich, SRN)
Luminol 97% (Sigma-Aldrich, SRN)
Trolox ((±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) 97% (Sigma)
Kyselina octová ledová (Sigma-Aldrich, SRN)
Chloramin T 98% (Sigma-Aldrich, SRN)
BF₃/metOH 14% (Sigma-Aldrich, SRN)

Ostatní použité chemikálie byly vesměs čistoty p.a. a byly získány od běžných dodavatelů.

4.1.3. Diagnostické soupravy

Total Antioxidant Status (kat. č. NX2332; Randox Laboratories, UK)
RANSOD (kat. č. SD125, Randox Laboratories, UK)
RANSEL (kat. č. RS504, Randox Laboratories, UK)
Močovina (kat. č. 12701, Bio-Vendor, CZ)
Kreatinin (kat. č. 12151, Bio-Vendor, CZ)
Kyselina močová (kat. č. 0126110, DOT Diagnostics, CZ)
Cholesterol PAP (kat. č. 11875540, Roche Diagnostics)
HDL (kat. č. CH2665, Randox Laboratories, UK)
LDL (kat. č. CH2657, Randox Laboratories, UK)
Triacylglyceroly (kat. č. TR1697, Randox Laboratories, UK)
Apolipoprotein A (kat. č. 981702, Bio-Vendor, CZ)
Apolipoprotein B (kat. č. 981703, Bio-Vendor, CZ)
HbA1c (kat. č. 981659, Bio-Vendor, CZ)
Bilirubin T (DPD) (kat. č. 11489194, Roche Diagnostics)
Albumin (kat. č. AB362, Randox Laboratories, UK)
Celková bílkovina (kat. č. 12751, Bio-Vendor, CZ)

4.2. Biologický materiál

4.2.1. Krev a sérum

Při realizaci klinických studií vlivu antioxidantů na lidský organismus byly získávány vzorky krve vybraných skupin dobrovolníků. Pro analýzu nízkomolekulárních antioxidantů byly prováděny odběry srážlivé krve, ze které bylo následnou centrifugací separováno sérum. Pro analýzu enzymových antioxidantů byla použita plná krev, odebíraná do zkumavek obsahujících protisrážlivé činidlo heparin.

4.2.2. Potravinové doplňky

V klinických studiích, prováděných za účelem zjištění vlivu potravinových doplňků a potravin na metabolický a antioxidační status člověka byl v první studii použit přírodní preparát Nature Bounty EPA (*Walmart, ČR*) obsahující rybí olej s vysokým obsahem omega-3-nenasycených mastných kyselin a vitamínu E.

4.2.3. Rostlinný materiál

4.2.3.1. Jablka

Ve druhé realizované studii byla jako tuzemský přirozený zdroj antioxidantů vybrána jablka odrůdy Golden Delicious a Idared, zakoupená v maloobchodní síti.

4.2.3.2. Ječmen a slad

Ve spolupráci s Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským v Brně byly vybrány vzorky sladovnického ječmene šesti odrůd – Bojos, Jersey, Malz, Radegast, Sebastian, Tolar. Ječmeny byly vypěstovány na čtyřech různých lokalitách v okresech Brno-venkov, Karlovy Vary, Prostějov a Břeclav za použití standardních pěstitelských postupů. Pěstované rostliny byly ošetřeny standardními postřiky, přičemž jedna polovina byla dodatečně ošetřena speciálním postřikem proti onemocnění způsobeném plísněmi rodu *Fusarium*.

Z dodaných vzorků obilky ječmene se za dohodnutých podmínek máčení, klíčení a hvozdní vyrobil slad. Mikroskladovací metoda byla prováděna na Sladařském ústavu VÚPS.

K analýze byly vybrány soubory vzorků stejných odrůd pěstovaných na stejných lokalitách po dobu dvou let. Tyto vzorky byly využity při optimalizaci metod pro stanovení aktivit antioxidačních enzymů a pro stanovení vitamínu E.

Speciální série ječmenů šlechtěných za účelem nízké hladiny lipoxygenázy byla použita na analýzu aktivity enzymu LOX a na studium jeho regulace. Vzorky byly získány ve spolupráci s podnikem Agrotest fyto, s.r.o. v Kroměříži.

4.3. Stanovení látek ovlivňujících antioxidační status organismu

4.3.1. Stanovení aktivity enzymu katalasy

Měření aktivity katalasy probíhalo ve spolupráci s VÚPS v Brně, kde je toto stanovení používáno pro charakterizaci antioxidačního statutu obilky ječmene. Spektrofotometrické měření bylo prováděno za použití předepsaných postupů. Následně byla vyzkoušena

a optimalizována kolorimetrická metoda, která byla později použita pro automatizaci stanovení a rovněž byla využita pro stanovení aktivity katalasy v lidské krvi.

4.3.1.1. Příprava vzorků

Příprava extraktu z ječmene a ze sladu

10g ječmene nebo sladu bylo rozemleto na šrot a smícháno s 25 ml 0,05 mol.l⁻¹ fosfátového pufru o pH = 7. Směs byla míchána 1 hodinu při 4 – 6 °C. Po ukončení míchání a usazení pevných částic byl roztok nad sedimentem zfiltrován a filtrát použit k analýze.

Příprava extraktu z lidské krve

Aktivita katalasy byla stanovována rovněž v lyzátu erytrocytů. Plná krev byla odebírána do zkumavek s protisrážlivým činidlem heparinem. Po centrifugaci a odsátí plasmy bylo odebráno 0,5 ml krvinek do čisté zkumavky. Vzorek byl čtyřikrát promyt fyziologickým roztokem. Promyté krvinky byly rozbity přidáním 2 ml ledové destilované vody. Získaný lyzát byl zředěn v poměru 1:400 0,01 mol.l⁻¹ fosfátovým pufrem o pH = 7,0 a následně použit k analýze.

4.3.1.2. Spektrofotometrické stanovení aktivity katalasy

0,1 ml extraktu bylo v křemenné kyvetě smícháno s 2,9 ml 0,010 mol.l⁻¹ peroxidu vodíku. Kyveta byla vložena do spektrofotometru a při 240 nm byl sledován pokles absorbance po dobu 90 sekund. Koncentrace spotřebovaného peroxidu byla vypočtena poměrem rozdílů absorbancí lineárního úseku křivky a molárního extinkčního koeficientu peroxidu.

4.3.1.3. Kolorimetrické stanovení aktivity katalasy

Pro kolorimetrické stanovení aktivity katalasy byla zvolena metoda dle Gótha [100]. Principem metody je inhibice enzymové aktivity přídavkem molybdenanu amonného, který vytváří s nespotebovaným peroxidem vodíku žluté zbarvení absorbující ve viditelné oblasti spektra.

Vzorek extraktu byl ve zkumavce smíchán s peroxidem vodíku a po 90 sekundách byla reakce zastavena přidáním roztoku molybdenanu amonného. Pro promíchání byla směs měřena při 375 nm proti blanku. Nespotebované množství peroxidu vodíku ve vzorku bylo spočítáno z kalibrační křivky, která byla zkonstruována za použití roztoků o známé koncentraci peroxidu.

Aktivita katalasy byla stanovena z rozdílu počáteční a konečné koncentrace peroxidu za jednotku času a přepočtena na jednotky U.g⁻¹ sušiny za použití známé navážky a známého obsahu vody ve vzorku.

Optimalizace kolorimetrické metody

Zvolenou kolorimetrickou metodu bylo nutno před rutinním používání optimalizovat. Vzhledem k nelinearitě kalibrací bylo provedeno testování analýzy vzorků za použití různých koncentrací substrátu a molybdenanového činidla. Pro analýzu byla zvolena nová vlnová délka a optimalizovány koncentrace použitých reagensů.

Upravená kolorimetrická metoda byla následně použita pro analýzu aktivity katalasy s použitím automatického analyzátoru.

Automatizace metody

Analýza byla provedena na automatickém analyzátoru Hitachi 902 ve spolupráci s privátní laboratoří Vetlab v Brně. Analyzátor může pro jednu metodu používat až tři různé druhy reagensů, které pipetuje v přesně definovaném čase. Optimalizací kolorimetrické metody pro stanovení aktivity katalasy bylo umožněno převést tuto manuální metodu na automatický analyzátor, čímž bylo dosaženo rychleji získaných výsledků za současné minimalizace lidské chyby.

4.3.1.4. Srovnání metod stanovení aktivity katalasy

Pro srovnání obou použitých metod – spektrofotometrické a kolorimetrické – bylo využito proměření aktivity komerčně vyrobené katalasy. Lyofilizát katalasy extrahovaný z hovězích jater byl naředěn $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ fosfátovým pufrům o $\text{pH} = 7,0$ na aktivity o známé hodnotě. $0,1 \text{ ml}$ enzymového roztoku bylo použito v spektrofotometrické i kolorimetrické analýze.

4.3.2. Stanovení aktivity enzymu superoxiddismutasy v biologickém materiálu

Měření aktivity superoxiddismutasy probíhalo ve spolupráci s VÚPS v Brně; tato metoda je spolu s analýzou aktivity katalasy stanovována pro charakterizaci antioxidačního stavu obilky ječmene.

4.3.2.1. Příprava vzorků

Příprava extraktů z ječmene a sladu

Pro extrakci SOD z obilky ječmene či sladu byl zvolen postup vyvinutý na VÚPS ve spolupráci s Mendlovou univerzitou [138].

25 g ječmene nebo sladu bylo rozemleto na šrot a smícháno s 225 ml vody o teplotě 45°C . Vzorky byly rmutovány v lázni o teplotě 45°C po dobu 15 minut . Poté byly ponechány 30 minut při laboratorní teplotě a následně přefiltrovány. Čiré filtráty byly zředěny $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ fosfátovým pufrům o $\text{pH} = 7,0$ v poměru $1:10$ a použity k analýze.

Příprava extraktů z lidské krve

Aktivita superoxiddismutasy byla stanovována v lyzátu erytrocytů. Postup získání lyzátu byl identický jako v případě stanovení aktivity katalasy (kap. 4.3.1.1.). Lyzát byl zředěn $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ fosfátovým pufrům o $\text{pH} = 7,0$ v poměru $1:100$ a následně použit k analýze.

4.3.2.2. Analýza aktivity SOD metodou NBT

Reakční směs obsahovala $100 \text{ }\mu\text{l}$ EDTA v 50 mmol.l^{-1} roztoku fosfátového pufru, $900 \text{ }\mu\text{l}$ 50 mmol.l^{-1} fosfátového pufru o $\text{pH} = 7,8$, $100 \text{ }\mu\text{l}$ 1 mmol.l^{-1} NBT, $150 \text{ }\mu\text{l}$ $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ methioninu, $30 \text{ }\mu\text{l}$ $0,16 \text{ mol.l}^{-1}$ riboflavinu a $1720 \text{ }\mu\text{l}$ vzorku (destilované vody – blank). Tato směs byla připravena v temnu a byla změřena absorbance při 550 nm . Reakce byla nastartována umístěním kyvety se vzorkem pod 15 W zářivku po dobu 3 minut . Poté byla znovu změřena absorbance při 550 nm . Do výpočtu byl zahrnut rozdíl těchto absorbancí.

Aktivita SOD byla vypočítána v jednotkách U, kdy 1 U je definována jako schopnost enzymu inhibovat tvorbu formazanu z 50 %:

$$\text{Aktivita (U)} = \frac{1 - \frac{\Delta A_{\text{vzorek}}}{\Delta A_{\text{blank}}}}{0,50} \quad (26)$$

4.3.2.3. Analýza aktivity SOD metodou INT – komerčně dostupný set

Metodu INT využívá komerční diagnostická souprava RANSOD (Randox Laboratories, UK). Pro stanovení aktivity SOD je třeba použít metodu kalibrační křivky s pomocí standardních roztoků o známé aktivitě SOD.

Reakční směs obsahovala 50 µl vzorku a 1700 µl substrátu (xanthin + INT). Po promíchání směsi a odečtení absorbance při 505 nm byla reakce nastartována 250 µl xanthinoxidasy; po 3 minutách byla odečtena druhá absorbance.

Aktivita SOD byla vypočítána z kalibrační křivky vytvořené měřením standardních roztoků o známé aktivitě. Procenta inhibice standardů byla vypočtena z rovnice:

$$\% \text{ inhibice} = 100 - \frac{\Delta A_{\text{std} / \text{min}}}{\Delta A_{\text{blank} / \text{min}}} \cdot 100 \quad (27)$$

Do grafu byla vynesena závislost % inhibice proti logaritmu aktivity standardu.

4.3.2.4. Optimalizace analýzy aktivity SOD

Stabilita enzymu v extraktu vzorku

Kvůli prodlevám ve stanovení z důvodu přípravy vzorků byla proměřena aktivita SOD ve vybraném vzorku ječmene v různých časových intervalech, aby se ověřila její stabilita v extraktu. Z jednoho vzorku ječmene byly vyrobeny tři extrakty a ty následně proměřovány po 2, 5, 8, 21 a 24 hodinách.

Automatizace metody

Pro rychlejší stanovení velkého počtu vzorků a z důvodů minimalizace chyb při manuálním měření byla metoda optimalizována pro automatické stanovení. Po nastavení parametrů byly vzorky změřeny na automatickém analyzátoru Hitachi 902. Parametry metody byly naprogramovány za pomoci aplikačního protokolu, dodaného výrobcem reagentů.

4.3.2.5. Porovnání metod NBT a INT

Pro srovnání obou použitých metod bylo využito proměření aktivity standardních roztoků o známé aktivitě SOD, dostupných v komerční soupravě RANSOD. Výsledky byly zaneseny do grafu a ze závislosti byla získána rovnice a korelační koeficient.

4.3.3. Stanovení aktivity peroxidasy

Aktivita peroxidasy byla analyzována v ječmeni a ve sladu. Pro stanovení aktivity byla vybrána kolorimetrická metoda. Jako substrát a donor elektronů byl zvolen guaiacol, který se při reakci oxiduje na barevný tetraguaiacol, jež absorbuje při 595 nm.

4.3.3.1. Příprava extraktů z ječmene a sladu

10 g ječmene nebo sladu bylo rozemleto na šrot a smícháno s 25 ml 0,1 mol.l⁻¹ fosfátového pufru o pH = 7. Směs byla míchána 1 hodinu při 4 – 6 °C. Po ukončení míchání a usazení pevných částic byl roztok nad sedimentem zfiltrován a filtrát použit k analýze.

4.3.3.2. Spektrofotometrické stanovení aktivity peroxidasy

0,2 ml extraktu bylo smícháno s 1,6 ml 0,1 mol.l⁻¹ fosfátového pufru, 10 µl 0,1% roztoku guaiacolu a reakce byla nastartována přidavkem 1,2 ml 0,03% peroxidu vodíku. Měřil se nárůst absorpance při 595 nm. Látkové množství vzniklého produktu se vypočítalo z Lambert-Beerova zákona pomocí známého molárního absorpčního koeficientu pro tetraguaiacol.

Aktivita peroxidasy byla přepočtena na U.g⁻¹ sušiny za použití známé navážky a změřeného obsahu vody ve vzorku.

4.3.3.3. Optimalizace stanovení aktivity peroxidasy

Pro správné provedení metody byly ověřeny následující faktory, které mají vliv na stanovení aktivity enzymu: optimální pH, teplota, koncentrace enzymu a substrátu.

Vliv pH prostředí na aktivitu peroxidasy

Barevná sloučenina vznikající při reakci guaiacolu s peroxidem za účasti komerčně vyrobené peroxidasy byla vytvářena v několika reakčních směsích obsahujících pufr o různém pH.

Vliv teploty na aktivitu peroxidasy

Pro testování teplotního optima byla použita komerčně vyrobená křenová peroxidasa. Lyofilizovaná peroxidasa byla rozpuštěna v 0,1 mol.l⁻¹ fosfátovém pufru, pH = 7,0 a byla přidávána k reakční směsi o teplotě od 15 °C do 75 °C. Vypočtená aktivita enzymu byla převedena na %.

Vliv koncentrace enzymu na průběh reakce

Byla sledována absorpance barevného produktu reakce po přidání různých množství komerčně vyrobené peroxidasy. Do reakční směsi bylo přidáno 100 µl enzymového roztoku o aktivitě 10, 20, 40 a 80 U.ml⁻¹. Sledoval se nárůst absorpance po dobu 1,5 minuty.

Vliv koncentrace substrátu na aktivitu peroxidasy

Do reakčních směsí obsahujících koncentrace guaiacolu v rozsahu 0,0005-0,05 mol.l⁻¹ bylo přidáno 100 µl enzymového roztoku o aktivitě 40 U.ml⁻¹ a sledoval se nárůst absorpance vznikajícího tetraguaiacolu při 595 nm. Z časové závislosti na koncentraci guaiacolu byla vypočítána počáteční rychlost reakce a sestrojena saturační křivka.

4.3.4. Stanovení aktivity glutathionperoxidasy

Aktivita glutathionperoxidasy byla sledována v lidské krvi. Ke spektrofotometrickému stanovení aktivity glutathionperoxidasy bylo využito komerčně dostupného setu RANSEL

(Randox Laboratories, UK). Metoda je založena na oxidaci glutathionu kumenhydroperoxidem a následné oxidaci NADPH. Úbytek absorbance NADPH je sledován fotometricky při 340 nm.

4.3.4.1. Příprava vzorku

Pro stanovení aktivity se používala plná heparinizovaná krev. Ta byla zředěna 20x diluentem; diluent sloužil k převedení přítomného glutathionu na redukovanou formu. V lidské krvi jsou přítomny další peroxidasy, které mohou způsobit falešně vysoké hodnoty. Z tohoto důvodu byla následně krev zředěna Drabkinovým činidlem; činidlo obsahuje kyanid draselný, který inhibuje ostatní peroxidasy ve vzorku a tím zabraňuje jejich interferenci.

4.3.4.2. Analýza aktivity glutathionperoxidasy

Reakční směs obsahovala 50 µl zředěného vzorku (nebo destilované vody – blank) a 2500 µl substrátu (NADPH + glutathion + glutathionreduktasa). Po odečtení absorbance A_1 byla reakce nastartována přidáním 100 µl kumenhydroperoxidu. Po 2 minutách byla odečtena absorbance A_2 . Aktivita GPx byla vypočítána ze vzorce:

$$U.l^{-1} \text{ hemolýzátu} = 8412 \cdot \Delta A_{340nm/min} \cdot \text{ředicí faktor} \quad (28)$$

Automatizace metody

Vzhledem k dostupnosti komerčního setu pro kolorimetrické stanovení aktivity glutathionperoxidasy byly parametry metody byly naprogramovány za pomoci aplikačního protokolu pro analyzátor Hitachi 902, který firma poskytla. Analýzy byly provedeny ve spolupráci s privátní laboratoří v Brně.

4.3.5. Stanovení aktivity enzymu lipoxygenasy v ječmeni a ve sladu

Aktivita LOX byla analyzována v ječmeni a ve sladu ve spolupráci s VÚPS v Brně. Pro spektrofotometrické stanovení bylo použito metody podle McDonalda [120], založené na přímém měření vznikajících konjugovaných dienu při 234 nm. Následně byla vyzkoušena a optimalizována kolorimetrická metoda dle Jianga [123].

4.3.5.1. Příprava extraktu z ječmene nebo sladu

Vzorek ječmene nebo sladu byl rozemlet na jemný šrot. 5 g šrotu bylo mícháno s 25 ml 0,2 mol.l⁻¹ borátového pufru o pH = 9,0 po dobu 1 hodiny při 4°C. Po usazení sedimentu byla kapalná část směsi slita, zfiltrována a filtrát použit k analýze.

4.3.5.2. Spektrofotometrické stanovení aktivity LOX

50 µl extraktu vzorku bylo smícháno s reakční směsí obsahující 0,95 ml 0,2 mol.l⁻¹ borátového pufru o pH = 9,0 a 2 ml 0,53 mmol.l⁻¹ linolové kyseliny v borátovém pufru. Byla sledována absorbance při 234 nm proti blanku po dobu 1-3 minut. Z lineárního úseku naměřené absorbance byla odečtena ΔA_{234} . Aktivita lipoxygenasy byla vypočítána v jednotkách U.ml⁻¹, kdy jedna jednotka způsobí nárůst absorbance za 1 minutu o hodnotu 0,001 při pH = 9,0 a teplotě 25 °C.

4.3.5.3. Kolorimetrické stanovení aktivity LOX

Pro kolorimetrické stanovení aktivity LOX byla zvolena metoda s xylenolovou oranží [116]. 50 µl extraktu bylo smícháno s 950 µl TRIS-HCl pufru o pH = 7,5 a 2 ml směsi obsahující 0,5 mmol.l⁻¹ kyseliny linolové, 0,01 % xylenolové oranže a 0,03 % FeSO₄.7H₂O. Absorbance byla odečítána při 550 nm proti blanku. Aktivita LOX byla vypočítána z kalibrační křivky vytvořené měřením standardních roztoků o známé aktivitě.

4.3.5.4. Porovnání spektrofotometrické a kolorimetrické metody

Pro srovnání obou použitých metod bylo využito proměření aktivity vybraných vzorků ječmene, které byly proměřeny oběma metodami. Z obdržných výsledků byla získána rovnice lineární regrese a vypočten korelační koeficient.

4.3.6. Stanovení antioxidační kapacity v lidském séru

4.3.6.1. ABTS metoda

Pro stanovení antioxidační kapacity metodou ABTS byl zvolen komerčně dostupný diagnostický set TAS (Total Antioxidant Status, Randox Laboratories, UK). ABTS je zde inkubován s peroxidasou (metmyoglobin) a působením peroxidu vodíku se mění na radikálovou formu ABTS[•], která má relativně stabilní zelenomodré zbarvení detekovatelné při 600 nm. Antioxidanty v séru způsobují potlačení produkce této barvy, která je úměrná jejich koncentraci.

Reakční směs obsahovala 20 µl vzorku a 1 ml chromogenu; po promíchání směsi a odečtení absorbance A₁ byla reakce nastartována přidáním 20 µl substrátu. Přesně po 3 min. byla odečtena absorbance A₂. Stejným způsobem byl proměřen blank a standard. Celková antioxidační kapacita byla vypočítána podle vzorce:

$$TAS (mmol.l^{-1}) = \frac{\Delta A_{blank} - \Delta A_{vzorek}}{\Delta A_{blank} - \Delta A_{std}} \cdot C_{std} \quad (29)$$

Automatizace stanovení TAS

Pro rychlejší stanovení velkého počtu vzorků a z důvodů minimalizace chyb při manuálním měření byla metoda stanovována pomocí automatického analyzátoru. Parametry metody byly naprogramovány za pomoci aplikačního protokolu, dodaného výrobcem reagentů.

4.3.6.2. TRAP metoda

Stanovení antioxidační kapacity metodou TRAP probíhalo ve spolupráci s Biofyzikálním ústavem AV ČR Brno. Reakce byly prováděny na mikrotitrační destičce a pro chemiluminiscenční měření byl využit BioOrbit luminometr 1251 (Turku, Finsko).

Reakční směs obsahovala 475 µl PBS pufru, 50 µl 10 mmol.l⁻¹ luminolu ve 100 mmol.l⁻¹ borátovém pufru (pH = 10,0) a 20 µl séra. Směs byla inkubována 10 minut při 37 °C; reakce byla nastartována následným přidáním 50 µl 400 mmol.l⁻¹ ABAP v PBS pufru. Jako standardu bylo využito známé množství troloxu (8 nmol.l⁻¹), který byl zpracován stejným způsobem jako vzorek.

Stechiometrický faktor troloxu (počet peroxylových radikálů vychytených jednou molekulou antioxidantu) je 2,0. Hodnota antioxidační kapacity pro vzorek byla vypočítána z rovnice:

$$\text{TRAP}_{\text{exp}} = 2,0[\text{trolox}] \frac{\tau_{\text{sérum}}}{f \cdot \tau_{\text{trolox}}}, \quad (30)$$

kde f = ředící faktor.

Porovnání metod TRAP a ABTS

Metody stanovení antioxidační aktivity TRAP a ABTS byly využity při klinické studii v roce 2007. Účelem studie bylo srovnání antioxidačního statutu mezi osobami se zvýšeným příjmem ovoce bohatého na antioxidanty a osobami, které se stravovaly dle svého běžného jídelníčku. Všechny vzorky sér byly stanoveny oběma metodami a porovnány.

4.3.7. Stanovení AOPP a AGEs v lidském séru

4.3.7.1. Stanovení AGEs

Stanovení konečných produktů pokročilé glykace, konkrétně produktů s fluorescenčními vlastnostmi, bylo založeno na spektrofotometrické detekci podle Henleho [90] a Munche [139], která byla modifikována dle Kalousové [91]. Sérum získané centrifugací krve bylo zředěno 50x PBS puforem o $\text{pH} = 7,4$ a použito k spektrofotometrickému měření. Intenzita záření byla odečítána při emisní vlnové délce 440 nm a excitační vlnové délce 350 nm. Fluorescenční intenzita vzorku byla vyhodnocena softwarem fluorimetru a vyjádřena v jednotkách AU.

4.3.7.2. Stanovení AOPP

Stanovení vybraných oxidovaných produktů proteinů s charakteristickou absorbancí bylo založeno na spektrofotometrické detekci dle Witko-Sarsatové [92], která byla modifikována dle Kalousové [91]. 400 μl krevního séra bylo zředěno v poměru 1:5 PBS puforem o $\text{pH} = 7,4$. Ke vzorku bylo přidáno 20 μl 1,16 mol/l KI a 40 μl kyseliny octové. Jako blank bylo využito 400 μl PBS pufru místo vzorku. Po promíchání byla směs proměřena na spektrofotometru při 340 nm proti blanku. Pro kalibraci byl použit chloramin T v koncentračním rozmezí 15 – 250 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Koncentrace AOPP byla vyjádřena v chloraminových jednotkách $\mu\text{mol.l}^{-1}$.

4.3.8. Stanovení nízkomolekulárních antioxidantů v biologickém materiálu

4.3.8.1. Stanovení α -tokoferolu, retinolu a karotenoidů v lidském séru

Analýza lipofilních vitamínů a provitaminů v séru probíhala v laboratoři ÚCHPBT FCH VUT v Brně.

Extrakce lipofilních vitamínů z lidského séra

Přesně odměřený objem séra (0,5 – 1,0 ml) byl deproteinován 0,5 ml absolutního ethanolu. Po odstranění vysrážených proteinů byly ze séra extrahovány lipofilní látky pomocí 5 ml diethyletheru po dobu půl hodiny v chladu a temnu. Etherová frakce byla následně

odpařena na rotační vakuové odparce. Získaný odparek byl rozpuštěn v 0,5 ml methanolu a použit k analýze.

Analýza α -tokoferolu a retinolu

Měření hladin retinolu a α -tokoferolu probíhalo metodou simultánní RP-HPLC s VIS detekcí a programovanou změnou vlnové délky. Separace probíhala na chromatografické koloně MAG 1 z nerezové oceli o rozměrech 4,6 x 150 mm naplněné sorbentem Biospher PSI 200 C18 (zrnění 7 μ m). Kolona byla opatřena předkolonou o rozměrech 4,6 x 20 mm naplněnou sorbentem stejných vlastností jako v koloně. Teplota kolony byla 45 °C, objem dávkovací smyčky 100 μ l; eluce probíhala izokraticky s použitím methanolu jako mobilní fáze. Průtok kolonou byl nastaven na 1,0 ml/min. Detekce byla prováděna spektrofotometricky v programovém modu: 0 – 3,5 min při vlnové délce 325 nm (absorpční maximum retinolu), 3,5 – 10 min při vlnové délce 289 nm (maximum tokoferolů). Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno pomocí externí kalibrace s použitím vybraných standardů.

Analýza karotenoidů

Karotenoidy byly analyzovány za stejných podmínek jako retinol a α -tokoferol; pouze detekce probíhala při vlnové délce 450 nm, která odpovídá absorpčnímu maximu karotenoidů. Separace na koloně probíhala 15 minut. Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno pomocí externí kalibrace s použitím standardních roztoků.

4.3.8.2. Stanovení vitamínu E a karotenoidů v ječmeni a ve sladu

Analýza lipofilních vitamínů a provitaminů v ječmeni a ve sladu probíhala ve spolupráci s Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským v Brně za použití předepsaných postupů.

Extrakce lipofilních vitamínů a provitaminů z ječmene a sladu

Vzorek ječmene nebo sladu byl rozemlet na šrot. Ke 2 g vzorku bylo přidáno malé množství kyseliny askorbové a 50 ml absolutního ethanolu. Po protřepání byla směs ponechána chvíli ustát a poté se přidalo 10 ml 50% KOH. Po promíchání byla baňka s obsahem napuštěna dusíkem, důkladně uzavřena a ponechána přes noc na temném a chladném místě.

Druhý den byla směs opatrně promíchána, převedena do dělicí baňky a extrahována dvakrát 50 ml diethyletheru. Získané etherové frakce byly spojeny, převedeny do čisté dělicí baňky a dvakrát promyty 100 ml vody. Po oddělení fází byla etherová frakce převedena do baňky, vysušena pomocí bezvodého síranu sodného a poté odpařena na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn ve 4 ml methanolu a použit k analýze.

Analýza vitamínu E v ječmeni a ve sladu

Analýza probíhala metodou RP-HPLC s fluorescenční detekcí. K měření byl použit kapalinový chromatograf SpectraSystem s čerpadlem P2000. Separace probíhala při laboratorní teplotě na koloně Watrex 250 x 4 mm z nerezové oceli naplněné sorbentem Nucleosil 120-5 C 18; kolona byla opatřena předkolonou o rozměrech 4,6 x 20 mm naplněnou sorbentem stejných vlastností jako v koloně. Mobilní fází byl methanol, průtok kolonou

1,0 ml.min⁻¹. Objem dávkovací smyčky byl 20 µl. Detekce probíhala pomocí fluorescenčního detektoru FL3000 – excitace při 290 nm a emise při 330 nm.

Při analýze, která probíhala přibližně 12 minut, byly detekovány píky tokotrienolů a tokoferolů. Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno pomocí externí kalibrace s použitím vybraných standardů. Z vyhodnoceného množství jednotlivých analytů byla vypočtena celková suma vitamínu E a jeho aktivita v mg.kg⁻¹ vzorku [140].

Analýza luteinu a β-karotenu v ječmeni a ve sladu

Lutein a β-karoten byly analyzovány za stejných podmínek jako vitamín E, pouze byla použita VIS detekce při 450 nm, která odpovídá absorpčnímu maximu karotenoidů. Separace na koloně probíhala asi 25 minut. Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno pomocí externí kalibrace s použitím standardních roztoků.

Využití hmotnostní spektrometrie pro analýzu karotenoidů metodou RP-HPLC/ESI-MS

K identifikaci a analýzám β-karotenu a luteinu ve vybraných vzorcích sladu byl využit systém HPLC od firmy Ecom spol. s r.o. (ČR) ve spojení s hmotnostním detektorem LCQ Advantage Max od firmy Thermo Finnigan (USA) vybaveným měkkou ionizační technikou elektrosprejem (ESI), optickým fokusačním systémem dvou oktapolů a iontovou pastí jako analyzátozem. Analýzy byly prováděny v laboratořích ÚPCHBT VUT v Brně.

Nastavení parametrů analýz:

Typ analýzy	záporný mód
Metoda	off-line
Rozsah m/z	400 – 600
Napětí na kapiláře (kV)	0,5
Průtok sušícího plynu (N ₂)	20
Teplota kapiláry	200
Průtok mobilní fáze (µl.min ⁻¹)	100

4.3.9. Analýza celkových flavonoidů a polyfenolů v séru

4.3.9.1. Analýza celkových flavonoidů

Stanovení celkového obsahu flavonoidů bylo prováděno orientační metodou s hlinitou solí a dusitanem [141].

Reakční směs obsahovala 0,5 ml vzorku, 1,5 ml H₂O a 0,2 ml 5% roztoku NaNO₂; po promíchání a po 5 minutách bylo přidáno 0,2 ml 10 % AlCl₃. Roztok byl důkladně promíchán a ponechán stát 5 minut. Poté bylo přidáno 1,5 ml 1 mol.l⁻¹ NaOH a 1 ml H₂O, promícháno a ponecháno stát 15 minut. Absorbance byla změřena při 510 nm proti slepému vzorku (destilovaná voda).

Kalibrace metody byla provedena s použitím standardu katechinu. Standard byl rozpuštěn v malém množství absolutního ethanolu a pro kalibraci ředěn destilovanou vodou. Byla připravena kalibrační řada roztoků katechinu o obsahu 20 – 310 mg.l⁻¹ a změřena stejným způsobem jako vzorky. Množství celkových flavonoidů ve vzorku bylo vypočítáno z rovnice kalibrační křivky.

4.3.9.2. Analýza celkových polyfenolů

Stanovení celkového obsahu polyfenolů bylo provedeno kolorimetrickou metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem [141].

Reakční směs obsahovala 1 ml Folin-Ciocalteuova činidla zředěného destilovanou vodou v poměru 1 : 9, 1 ml destilované vody a 50 μ l vzorku nebo vody jako blanku. Po promíchání byla směs ponechána 5 minut stát a poté byl přidán 1 ml nasyceného roztoku NaCO_3 (7,5 g NaCO_3 + 95 ml H_2O) a směs opět promíchána. Po 15 minutách byly vzorky proměřeny na spektrofotometru při 750 nm proti blanku.

Kalibrace metody byla provedena s použitím 6,0 mol.l⁻¹ roztoku kyseliny gallové, která sloužila jako standard. Byla připravena kalibrační řada roztoků kyseliny gallové o obsahu 110 – 560 mg.l⁻¹ a změřena stejným způsobem jako vzorky. Množství celkových polyfenolů ve vzorku bylo vypočítáno z rovnice kalibrační křivky.

4.3.10. Analýza mastných kyselin v séru

Mastné kyseliny v séru byly analyzovány metodou GC-FID ve spolupráci s Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským v Brně. Analýze předcházela extrakce a esterifikace mastných kyselin, při které byla optimalizována zjednodušená metoda dle Kanga [142].

Extrakce a esterifikace mastných kyselin

50 μ l séra bylo smícháno ve skleněné vialce s 1 ml hexanu a 1 ml 14% BF_3 /metOH. Vialka byla pevně uzavřena a směs byla zahřívána 1 hodinu při 100°C. Po ochlazení na pokojovou teplotu byla vialka otevřena, horní hexanová fáze obsahující methylestery mastných kyselin přenesena do uzavíratelné mikrozkušavky; za účelem přečištění byl k hexanové frakci přidán 1 ml destilované vody a po důkladném protřepání a oddělení fází byla horní hexanová fáze přenesena do vialky a odpařena pomocí dusíku. Odparek byl rozpuštěn v 1 ml methanolu a použit k analýze.

Analýza mastných kyselin pomocí CG-FID

Mastné kyseliny byly analyzovány pomocí plynového chromatografu s plamenově-ionizační detekcí. Separace probíhala na kapilární koloně DB-WAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) s vázanou polární stacionární fází (polyethylenglykol). Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno pomocí externí standardní směsi 37 methylesterů mastných kyselin.

Chromatografické podmínky:

Doba analýzy	55 min
Nástřikové množství	1 μ l
Nosný plyn	helium, konstantní průtok 2 ml/min
Injektor	PTV v režimu CT splitless
Teplota injektoru	250 °C
Splitless time	0,8 min
Teplotní program	80 °C (4 min drženo) – 5 °C/min – 130 °C (drženo 21 min)
Teplota detektoru	250 °C
Průtok H_2	35 ml.min ⁻¹
Průtok vzduchu	350 ml.min ⁻¹
Průtok N_2	30 ml/min (pomocný plyn – Makeup gas)

4.4. Koncepce a organizace klinických studií

4.4.1. Koncepce klinických studií

Klinické studie bývají prováděny za účelem potvrzení bezpečnosti a efektivity nové látky či preparátu. Zahrnují podávání definované dávky preparátu dobrovolníkům po určitou dobu, během níž bývají v pravidelných intervalech odebrány vzorky. V těchto vzorcích jsou vyšetřovány vybrané parametry, na jejichž hladiny bývá zaměřen účinek preparátu. Vzhledem k tomu, že na rozdíl od laboratorních pokusných zvířat je každý lidský organismus díky expozici rozdílným prostředím velmi specifický, je prakticky nezbytné kromě těchto vybraných parametrů sledovat celkový metabolický status celého organismu.

V rámci práce byly provedeny dva experimenty založené na studiu vlivu podávaných antioxidantů na vybrané metabolické funkce člověka.

4.4.2. Klinický experiment I

Kardiovaskulární choroby patří mezi nejvýznamnější onemocnění postihující vyspělou civilizaci. Jsou řazeny na první místo v příčinách úmrtí jedinců v celé Evropě a USA. Většina těchto chorob bývá zapříčiněna aterosklerosou. Jde o poškození krevních cév způsobené vysokou hladinou cholesterolu v krvi, zvláště LDL cholesterolu a triacylglycerolů. Reaktivní formy kyslíku napadají a oxidují tyto molekuly. Oxidované formy LDL vedou ke vzniku aterosklerotických plátů, které se usazují na stěny cév, což má za následek zúžení průsvitu a může skončit ucpáním cévy.

První klinický experiment byl zaměřen na podávání přírodního preparátu obsahujícího polynenasycené mastné kyseliny a vitamin E. Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA), zvláště skupina zahrnující omega-3-nenasycené mastné kyseliny, mají vliv na snižování hladiny triacylglycerolů, zabraňují v krevním řečišti shlukování a usazování aterosklerotických plátů, mají protizánětlivé a protisrážlivé účinky. V kombinaci s vitamínem E, který zabraňuje jejich oxidaci reaktivními formami, jsou prezentovány jako účinný potravinový doplněk při prevenci aterosklerosy.

4.4.2.1. Soubor jedinců

Klinické studie I se zúčastnilo 38 dobrovolníků ve věku od 26 do 64 let, kteří byli rozděleni do čtyř skupin podle předběžného screeningu jejich lipidového profilu. První skupinu tvořilo 10 jedinců s hyperlipidemií, u nichž byly nalezeny hladiny celkového cholesterolu vyšší než $6,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ a hladiny LDL-cholesterolu vyšší než $4,0 \text{ mmol.l}^{-1}$. Do druhé skupiny bylo zařazeno 12 lidí s mírnou hyperlipidemií, u nichž se hladiny celkového cholesterolu pohybovaly mezi $5,0 - 6,5 \text{ mmol.l}^{-1}$. Třetí (8 jedinců) a čtvrtou (8 jedinců) skupinu tvořili zdraví jedinci, u nichž se hodnoty celkového cholesterolu pohybovaly v normálních mezích, tedy v hodnotách nepřesahujících $5,0 \text{ mmol.l}^{-1}$.

4.4.2.2. Schéma studie

Klinická studie probíhala od října 2005 do června 2006. Toto období bylo rozčleněno na tři periody: v první fázi od října do konce prosince 2005 měly všechny skupiny běžný stravovací režim. V období od ledna do konce března 2006 užívaly skupiny 1 – 3 potravinový

doplňek o složení uvedeném v tab. 4., vždy 3 kapsle denně. Čtvrtá skupina měla běžnou stravu. Počátkem dubna se první tři skupiny vrátily k běžnému stravovacímu režimu.

Během celého období byla všem jedincům pravidelně odebírána krev a separované sérum bylo použito k analýze vybraných parametrů.

Tab. 4. Deklarované složení potravinového doplňku

Nature Bounty EPA (obsah 1 kapsle)	
Vitamin E	1,12 mg
Rybí olej	1000 mg
- z toho aktivní látky:	180 mg eikosapentaneové kyseliny
	120 mg dokosahexaneové kyseliny

4.4.3. Klinický experiment II

Druhý klinický experiment byl zaměřen na sledování metabolického a antioxidačního statusu po dočasně zvýšeném příjmu antioxidantů přirozeně obsažených v běžně dostupných surovinách. Jako tuzemský a bohatý zdroj antioxidantů byla vybrána jablka. Po cíleně zvýšené konzumaci jablek byly sledovány hladiny nízkomolekulárních a enzymových antioxidantů v krvi u vybrané skupiny zdravých jedinců.

4.4.3.1. Soubor sledovaných jedinců

Klinické studie II se zúčastnilo 16 dobrovolníků ve věku mezi 24 až 58 lety, rozdělených do dvou skupin. Většina jedinců vykazovala na začátku studie dobrý zdravotní stav.

4.4.3.2. Schéma studie

Experiment proběhl v období říjen 2006 – duben 2007 a byl rozdělen do tří fází. V první fázi od října do prosince 2006 měly obě skupiny běžnou stravu. Od ledna do poloviny února 2007 byla běžná strava 8 jedincům doplněna o jablka tak, aby jejich denní příjem dosahoval 500 g syrové hmotnosti. Druhá skupina tvořená 8 jedinci pokračovala v běžné stravě. Třetí fáze byla zaměřena na kontrolu metabolických parametrů poté, co se první skupina vrátila do normálního stravovacího režimu. U všech jedinců byly provedeny odběry plné a srážlivé krve; ze sražené krve bylo získáno sérum pro analýzu základních metabolických parametrů a nízkomolekulárních antioxidantů. Ze vzorků plné krve byly analyzovány hlavní antioxidační enzymy.

4.4.4. Analýza základních biochemických parametrů v lidském séru

Z krve, odebrané v průběhu obou klinických studií, bylo po centrifugaci separováno sérum a použito pro analýzu. Biochemické parametry byly u všech skupin analyzovány v laboratoři klinické biochemie v nemocnici Kyjov za použití akreditovaných metod a se souhlasem Etické komise Nemocnice Kyjov. Byla zde rovněž analyzována celková antioxidační kapacita séra metodou ABTS. Přehled parametrů, metod, kterými byly analyzovány a jejich fyziologické rozmezí udává tab. 5.

Tab. 5. Přehled vyšetřovaných parametrů a metod jejich stanovení

Parametr	Fyziologické rozmezí	Metoda
Močovina	2,80 – 8,20 mmol.l ⁻¹	UV enzymová metoda
Kreatinin	muži 40 – 107 μmol.l ⁻¹ ženy 40 – 104 μmol.l ⁻¹	Jaffého metoda bez deproteinace (kineticky)
Kyselina močová	muži 200 – 420 μmol.l ⁻¹ ženy 140 – 340 μmol.l ⁻¹	Enzymová fotometrická metoda
Albumin	33 – 55 g.l ⁻¹	Bromkresolový purpur (BCP)
Cholesterol celkový	3,50 – 5,00 mmol.l ⁻¹	Enzymová metoda
HDL cholesterol	muži 1,29 a více mmol.l ⁻¹ ženy 1,40 a více mmol.l ⁻¹	Enzymová metoda přímá
LDL cholesterol	1,20 – 3,00 mmol.l ⁻¹	Enzymová metoda přímá
Triacylglyceroly	0,68 – 2,00 mmol.l ⁻¹	Fotometrické enzymové stanovení
Aterogenní index	do 3,00	(CHOL – HDL)/HDL
Apolipoprotein A	1,10 – 2,50 g.l ⁻¹	Imunonefelometrie
Apolipoprotein B	do 1,10 g.l ⁻¹	Imunonefelometrie
Index ApoA ₁ /ApoB	muži 1,50 a více ženy 1,70 a více	ApoA ₁ /ApoB
Glykovaný hemoglobin	2,8 – 4,0 %	Kapalinová chromatografie
Total antioxidant status	1,30 – 1,77 mmol.l ⁻¹	Kolorimetrická metoda

4.4.5. Analýza antioxidační kapacity metodou TRAP

Analýza antioxidační kapacity séra metodou TRAP byla prováděna ve spolupráci s Biofyzikálním ústavem Akademie věd v Brně, na oddělení patofyziologie volných radikálů (kap. 4.3.6.2.).

4.4.6. Analýza nízkomolekulárních antioxidantů v lidském séru

Nízkomolekulární antioxidanty v séru byly analyzovány v laboratořích ÚPCHBT VUT v Brně za použití optimalizovaných metod (kap. 4.3.8.1.).

4.4.7. Analýza antioxidačních enzymů v krevních buňkách

Aktivity antioxidačních enzymů v krvinkách byly stanovovány v privátní laboratoři Vetlab v Brně za použití optimalizovaných metod (kap. 4.3.1., 4.3.2., 4.3.4.).

4.5. Statistické zpracování výsledků

Výsledky opakovaných měření jsou v důsledku nahodilých chyb rozmístěny v okolí nejpravděpodobnější střední hodnoty. Odhadem této střední hodnoty je aritmetický průměr $\bar{x}$:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i, \quad (31)$$

kde n je počet analýz a x_i (pro $i = 1, 2, 3 \dots n$) jsou jednotlivé naměřené hodnoty.

Rozdíl hodnoty výsledku a průměrné hodnoty střední hodnoty vyjadřuje směrodatná odchylka s , která vrací míru rozptýlenosti do měřítka původních dat:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}, \quad (32)$$

kde n je počet analýz, x_i (pro $i = 1, 2, 3 \dots n$) jsou jednotlivé naměřené hodnoty a $\bar{x}$ je aritmetický průměr.

Relativní směrodatná odchylka (tzv. chyba metody) s_r udává procentuální rozptyl od střední hodnoty:

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \text{ [%]}. \quad (33)$$

Vzájemná korelační závislost uvažovaných náhodných veličin se nazývá korelace. Rozlišuje se jednoduchá korelace (korelace dvou náhodných veličin) a mnohonásobná regrese (korelace jedné náhodné veličiny a skupiny dvou a více náhodných veličin).

Těsnost vztahu proměnných x a y je určována pomocí Pearsonova korelačního koeficientu:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{(n-1) \cdot s_x \cdot s_y}, \quad (34)$$

kde n je počet analýz, x_i a y_i (pro $i = 1, 2, 3 \dots n$) jsou jednotlivé naměřené hodnoty dvou veličin, $\bar{x}, \bar{y}$ jsou aritmetické průměry dvou veličin a s_x, s_y jsou hodnoty odhadu směrodatné odchylky. Korelační koeficient je bezrozměrná veličina nabývající hodnot mezi -1 a 1. Jestliže koeficient nabývá krajních hodnot $r = -1$ nebo $r = 1$, potom je vztah mezi dvěma veličinami označen jako lineární. Pro hodnotu $r = 0$ je lineární vztah mezi dvěma veličinami vyloučen [143].

Výsledky stanovení byly vyjadřovány jako průměrné hodnoty $\pm$ směrodatné odchylky. Výsledky byly analyzovány pomocí Studentova t-testu za použití programu Statistica for Windows 5.0 (Statsoft, USA). Rozdíly na hladině pravděpodobnosti $p < 0,05$ byly považovány za statisticky signifikantní

5. VÝSLEDKY

Předložená práce je zaměřena na analýzu enzymových a neenzymových antioxidantů v různých druzích biologického materiálu. První část práce je zaměřena na sledování změny vybraných antioxidantů v ječmeni a sladu v souvislosti se studiem aktivace antioxidantních mechanismů v závislosti na vnějších faktorech. Druhá část práce je zaměřena na sledování změn enzymových i nízkomolekulárních antioxidantů u humánních souborů za účelem posouzení vztahů mezi aktivitami jednotlivých složek antioxidantního komplexu. Výběr biologického materiálu a zaměření obou částí práce úzce souvisí s pracovním zařízením a bylo prováděno v souladu s potřebami pracoviště doktorandky.

V první fázi práce bylo třeba optimalizovat metody stanovení aktivity antioxidantních enzymů s ohledem jednak na kinetiku reakce, dále na substrátovou specifitu a v neposlední řadě na charakter biologických vzorků.

5.1. Optimalizace stanovení enzymových aktivit

5.1.1. Katalasa – vývoj kolorimetrické metody

Katalasa je enzym katalyzující rozklad peroxidu vodíku v biologických systémech. Aktivitu katalasy lze ve vzorcích stanovit přímo měřením úbytku koncentrace peroxidu nebo nepřímo s využitím kolorimetrie, kdy je po přidavku dalšího činidla měřen barevný produkt vznikající reakcí tohoto činidla a zbylého peroxidu.

Vývoj kolorimetrické metody byl v této práci důležitý kvůli nutnosti rychlého zpracování velkého množství vzorků; dalším důvodem byla možnost budoucího nastavení kolorimetrické metody na automatickém analyzátoru, čímž by došlo k velké úspoře objemu chemikálií, pracovních sil a také k eliminaci chyb způsobených lidskou rukou.

Pro vývoj a optimalizaci byla zvolena jednoduchá metoda s molybdenanem amonným podle Gótha [100].

5.1.1.1. Změna vlnové délky

Molybdenan amonný tvoří s peroxidem vodíku žluté zbarvení, jehož absorpční maximum je při 355 nm. Z důvodu naměřené vysoké absorbance přesahující hodnotu 1,0 byla v literárním zdroji uvedena použitá vlnová délka 405 nm.

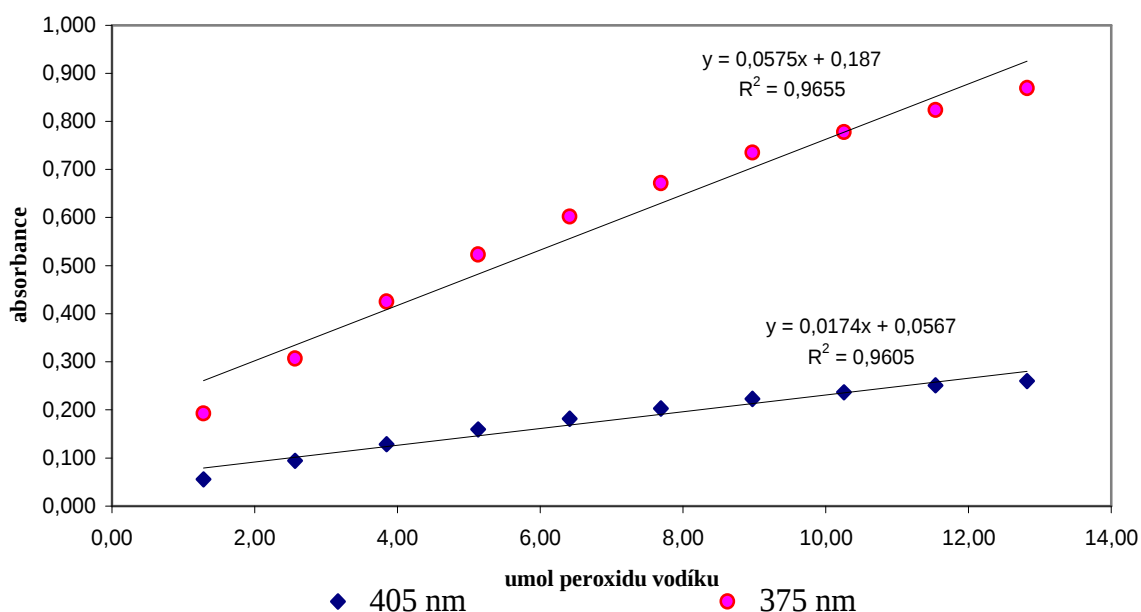
Za účelem převést do budoucna analýzu aktivity katalasy z manuálního na automatické stanovení bylo nutné tuto vlnovou délku upravit. Automatický analyzátor obsahuje filtry jen pro určité vlnové délky viditelného spektra, proto byla navržena nová vlnová délka 375 nm, blíží se absorpčnímu maximu žlutého komplexu a současně nastavitelná na analyzátoru. Linearita kalibrační křivky a vysoká absorbance vzniklého komplexu byla následně řešena úpravou počátečních koncentrací substrátu a molybdenanového činidla.

5.1.1.2. Volba počáteční koncentrace substrátu a molybdenanu

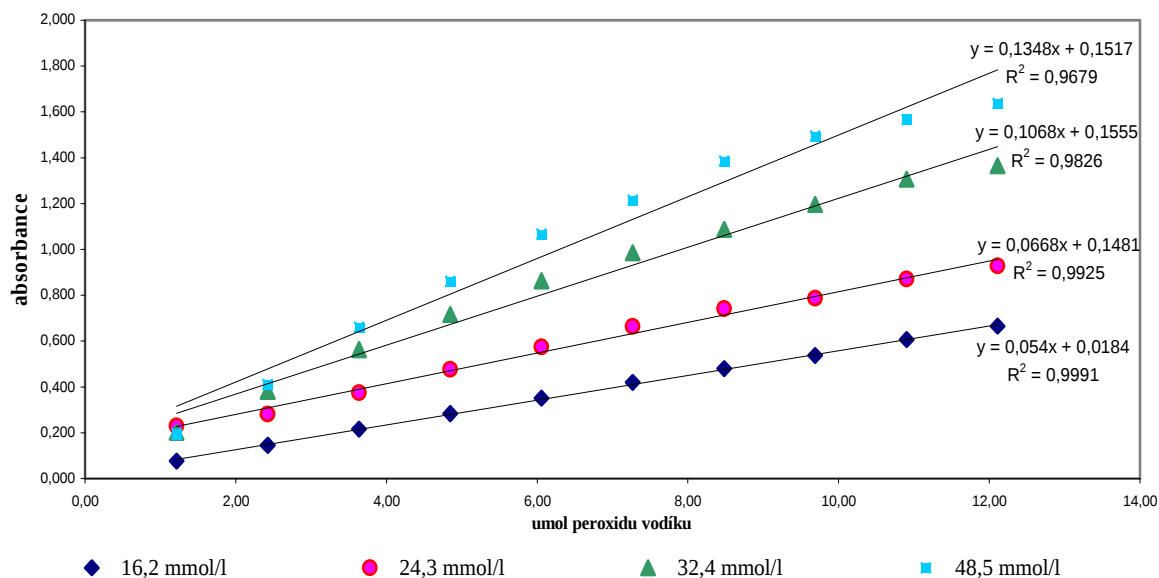
Při optimalizaci kolorimetrické metody byly upraveny počáteční koncentrace substrátu i molybdenanu. Koncentrace peroxidu vodíku byla snížena z původních 64 mmol.l⁻¹ na 12 mmol.l⁻¹. Důvodem byla vysoká hodnota absorbance překračující při zvolené vlnové délce 375 nm hodnotu 1,0.

Také koncentrace molybdenanu vstupujícího do reakce se ukázala být problematickou. Góth uvádí použitou koncentraci molybdenanu 32,4 mmol.l⁻¹ [100]. Koncentrace molybdenanu nad 24,3 mmol.l⁻¹ má podle zdroje předcházet zakalení vzorku a tvorbě bublinek kyslíku, který by mohl rušit stanovení. Nicméně při sestavování kalibrační křivky bylo zjištěno, že závislost absorbance na koncentraci vzniklého komplexu není lineární. Po několika pokusech byla počáteční koncentrace molybdenanu snížena na 16,4 mmol.l⁻¹, což zajistilo linearitu v celém rozsahu kalibrace. Zakalení vzorku a tvorba bublinek nebyly při této koncentraci pozorovány.

Graf 1. Vliv koncentrace molybdenanového činidla na linearitu kalibrace



Graf 2. Vliv koncentrace molybdenanového činidla na linearitu kalibrace



5.1.1.3. Srovnání spektrofotometrické a kolorimetrické metody

Pro srovnání obou použitých metod bylo využito proměření aktivity komerčně vyrobené katalasy. Lyofilizovaný enzymový preparát (Sigma) byl naředěn $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ fosfátovým pufrům o $\text{pH} = 7,0$ na pracovní roztoky o aktivitách 25, 50 a 80 U.ml^{-1} . Tyto vzorky byly proměřeny s využitím spektrofotometrické i kolorimetrické metody. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tab. 6.

Tab. 6. Naměřené aktivity standardního roztoku katalasy o známé aktivitě

	Spektrofotometrická metoda			Kolorimetrická metoda		
	25 U.ml^{-1}	50 U.ml^{-1}	80 U.ml^{-1}	25 U.ml^{-1}	50 U.ml^{-1}	80 U.ml^{-1}
n	7	24	9	7	24	9
stř. hodnota	25,7	47,4	78,4	25,0	48,3	77,6
SD	1,0	1,5	1,4	1,9	1,5	1,8
CV (%)	3,8	3,1	1,8	7,6	3,2	2,3

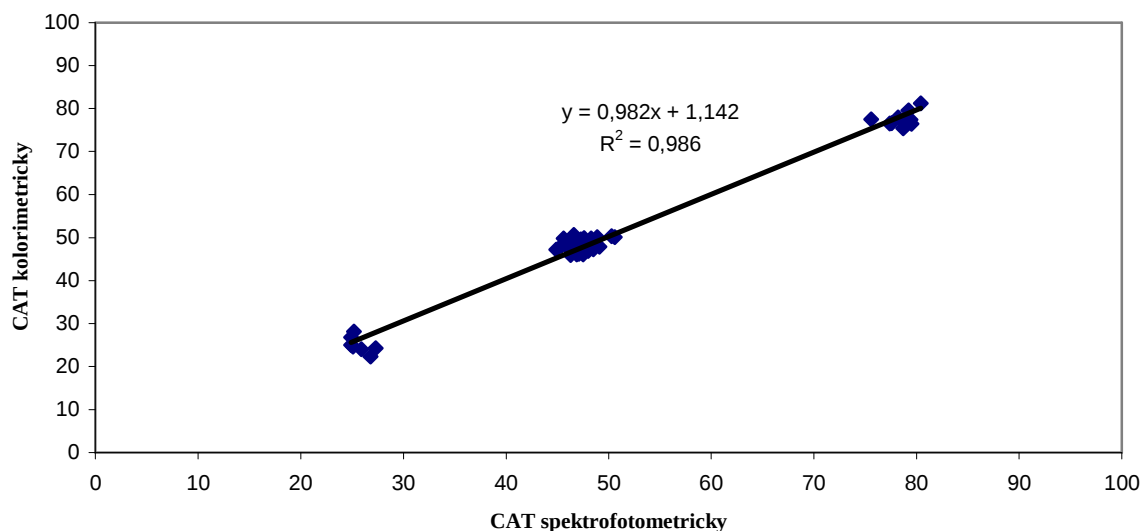
Pozn.: n = počet vzorků, SD = směrodatná odchylka, CV = variační koeficient

Naměřená data byla zanesena do grafu a získaná lineární regrese má tvar:

$$y = 0,982x + 1,142$$

Korelační koeficient má hodnotu $r = 0,9929$, z čehož vyplývá, že obě metody spolu silně korelují.

Graf 3. Korelace spektrofotometrické a kolorimetrické metody



5.1.1.4. Automatizace metody

Pro stanovení aktivity katalasy byla do automatického analyzátoru naprogramována metoda o dvou reagentech; v čase $t = 0$ byl přidán ke vzorku substrát obsahující 12 mmol.l^{-1} peroxid vodíku v $0,050 \text{ mol.l}^{-1}$ fosfátovém pufru o $\text{pH} = 7,0$ a změřena absorbance A_0 . V čase $t = 90$ sekund byl ke směsi napipetován roztok $16,2 \text{ mmol.l}^{-1}$ molybdenanu amonného a v čase $t = 120$ sekund byla odečtena absorbance A_1 . Z rozdílu absorbancí byla vypočtena ΔA . Pomocí kalibrační křivky bylo z ΔA spočítáno množství spotřebovaného peroxidu vodíku za časovou jednotku a tím i aktivita katalasy v jednotkách U.ml^{-1} .

5.1.2. Superoxiddismutasa – výběr metody stanovení

Ke stanovení aktivity enzymu superoxiddismutasy lze použít přímé i nepřímé metody. Přímé stanovení aktivity je založeno na spektrofotometrickém sledování úbytku superoxidového radikálu. Nepřímé metody jsou v praxi rozšířenější, jejich principem je generování superoxidového radikálu, který reaguje s činidlem za vzniku barevné sloučeniny. SOD zhasí superoxidový radikál a aktivita SOD je pak hodnocena jako schopnost inhibovat tvorbu barevné sloučeniny. Často používanými metodami ke stanovení aktivity jsou reakce s tetrazoliovými solemi; tyto reagují s vygenerovaným superoxidovým radikálem za tvorby barevného formazanu [144].

5.1.2.1. Porovnání metod pro stanovení SOD

Aktivita SOD byla analyzována ve vybraných biologických vzorcích nepřímou metodou využívající tetrazoliové soli - NBT i INT. Tato metoda je využívána i v komerční soupravě RANSOD (Randox Laboratories, UK). Pro srovnání obou použitých metod bylo využito proměření aktivity standardních roztoků o známé aktivitě SOD, dostupných jako standardní preparát v soupravě RANSOD. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tab. 7.

Tab. 7. Naměřené aktivity standardního roztoku SOD o známé aktivitě

[U.ml ⁻¹]	NBT metoda					INT metoda				
	0,16	0,50	1,00	2,00	4,00	0,16	0,50	1,00	2,00	4,00
n	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
stř. hodnota	0,11	0,44	1,01	1,80	3,77	0,15	0,51	1,03	2,04	3,98
SD	0,02	0,03	0,14	0,10	0,11	0,02	0,02	0,03	0,02	0,03
CV (%)	13,83	6,86	14,06	5,34	2,85	13,80	4,92	2,57	1,10	0,81

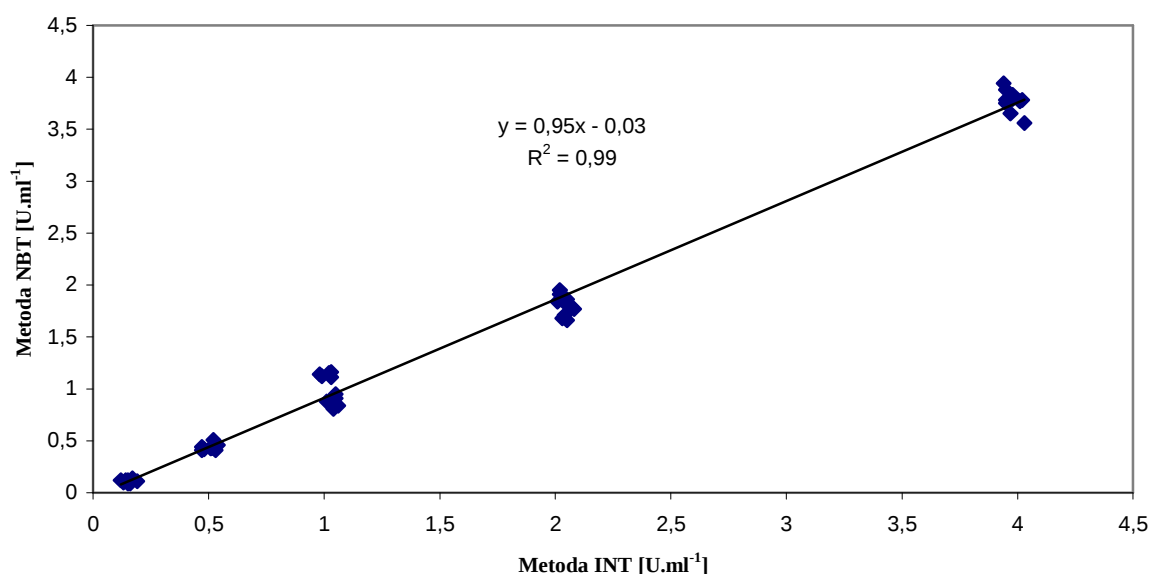
Při použití metody NBT byl zaznamenán výraznější rozptyl výsledků nežli u metody INT. Z tohoto důvodu a také díky snadné dostupnosti komerčního diagnostického setu byla pro měření zvolena metoda INT.

Výsledky z měření obou metod byly zaneseny do grafu a ze závislosti byla získána rovnice ve tvaru:

$$y = 0,95x - 0,03$$

Korelační koeficient $r = 0,9962$, z čehož vyplývá, že obě metody spolu pozitivně korelují.

Graf 4. Korelace INT a NBT metody



5.1.2.2. Automatizace metody

Pro rychlejší stanovení velkého počtu vzorků a z důvodů minimalizace chyb při manuálním měření byla metoda naprogramována pro analyzátor Hitachi 902. Metoda byla nakalibrována s použitím standardu SOD dostupného v setu. Pomocí kalibrační křivky byla z ΔA spočítána procenta inhibice tvorby formazanu a tím i aktivita SOD v jednotkách U.ml⁻¹.

5.1.2.3. *Validace metody stanovení aktivity SOD metodou RANSOD*

Ve shodě s údaji uvedenými v kap. 2.9.4. byly získány parametry validace metody RANSOD pomocí software EffiValidation 3.0. Získané hodnoty jsou uvedeny v následujícím přehledu:

Opakovatelnost:

- $n = 16$
- průměrná hodnota aktivity SOD = 126 U.g^{-1} sušiny
- opakovatelnost = $7,70 \text{ U.g}^{-1}$ sušiny
- relativní opakovatelnost = 6,16 %

Nejistoty :

- standardní nejistota = $7,6 \text{ U.g}^{-1}$ sušiny
- relativní standardní nejistota = 6,0 %
- faktor pokrytí = 2,0
- rozšířená standardní nejistota = $14,8 \text{ U.g}^{-1}$ suš.
- relativní rozšířená standardní nejistota = 11,8 %

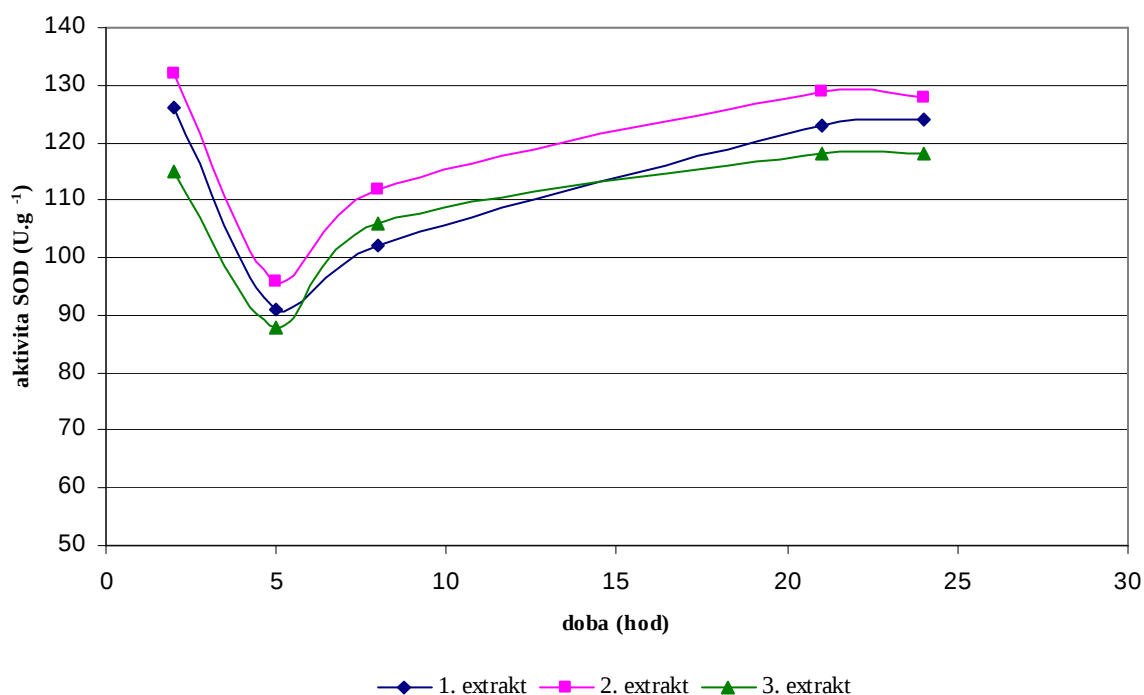
Stanovení validačních parametrů metody RANSOD bylo zopakováno v odstupu 3 měsíců (březen 2006) a byly získány prakticky identické hodnoty všech stanovovaných parametrů. Nejistota měření ani opakovatelnost se nezměnila, což potvrzuje použitelnost metody pro stanovení aktivity superoxiddismutázy ve vzorcích ječmenů a sladů.

5.1.2.4. *Stabilita SOD v extraktech z ječmene*

Po optimalizaci základních parametrů metody bylo nutné ověřit podmínky stanovení v konkrétních biologických vzorcích – ječmeni a sladu. Z rostlinného materiálu je obvykle třeba extrahovat nativní enzymy do vodného prostředí, přičemž extrakci je nutné provádět často i několik hodin. Je proto vhodné ověřit, jak se mění aktivita příslušného enzymu po dobu extrakce. V grafu 5 je zobrazen průběh aktivity superoxiddismutasy v extraktech ječmene v časovém období 2 – 24 hodin. Z grafického zobrazení vyplývá, že aktivita SOD v extraktu po 5 hodinách úchovy v chladničce při +2 až +8 °C klesá přibližně o čtvrtinu a po 24 hodinách se vrací na původní hodnotu. Vzhledem k velkému počtu vzorků, náročnosti extrakce a stabilitě SOD ve vzorku byla rozvržena analýza do dvou dnů – v prvním dnu proběhla extrakce, vzorky byly uloženy přes noc v chladničce a analyzovány na druhý den.

Obecně lze shrnout, že spektrofotometrická metoda využívající tetrazoliové soli (kap. 2.9.4.) je poměrně citlivá, ale má i své nevýhody – je poměrně náročná na čas, velmi záleží na přípravě extraktu (běžný problém u práce s komplexními biologickými matricemi) a dále dochází k postupnému poklesu aktivity XOD v roztoku. Rovněž nelze vyloučit interferenční vlivy dalších látek přítomných ve vzorku nebo extraktu. Uvedené faktory včetně možné přechodné aktivace inhibitorů SOD nebo interference složek antioxidačního komplexu mají zřejmě za následek přechodný pokles hodnot SOD (graf 5).

Graf 5. Stabilita SOD ve vzorku ječmene v závislosti na čase (3 vzorky, každý měřen 2x)



5.1.3. Peroxidasa – vývoj metody

Stanovení aktivity peroxidasy je založeno na oxidoredukční reakci, ve které peroxidasa katalyzuje redukci peroxidu vodíku na vodu. Jako donor elektronů pro vodík slouží specifické molekuly, které se při reakci mění a lze je stanovovat spektrofotometricky nebo luminometricky. Množství vytvořeného produktu je mírou katalytické aktivity enzymu.

V předložené práci byl jako donor elektronů použit guaiacol [105]. Pro správné provedení metody byly ověřeny následující faktory, které mají vliv na stanovení aktivity enzymu: optimální pH, teplota, koncentrace enzymu a substrátu.

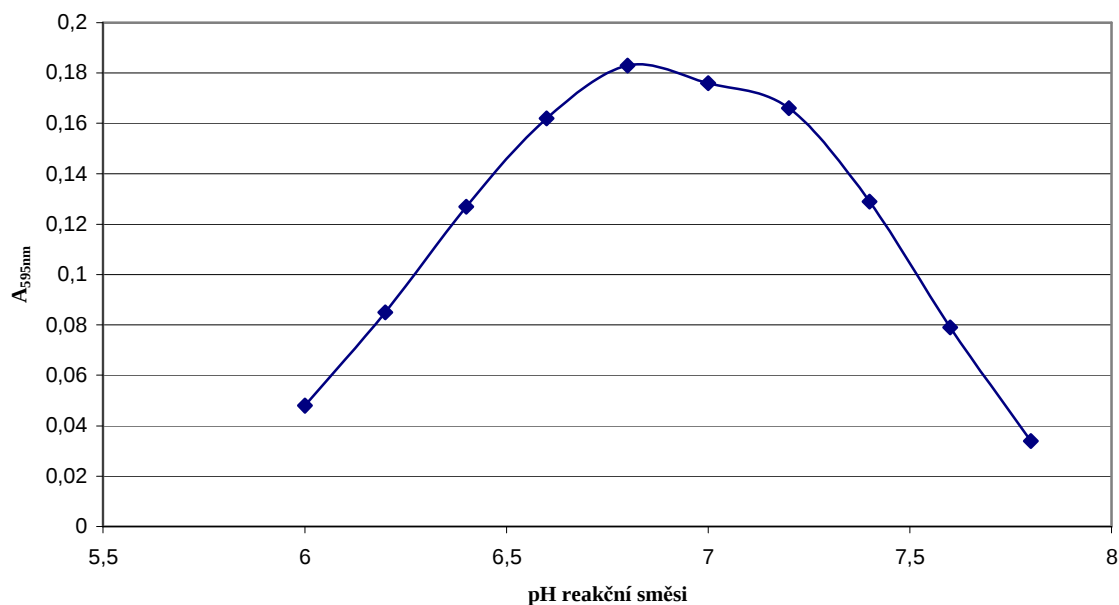
5.1.3.1. Vliv pH prostředí na aktivitu peroxidasy

V grafu 6. je znázorněna výsledná závislost absorbance vznikajícího barevného tetraguaiacolu na pH reakční směsi. Optimální pH leželo v rozmezí 6,8 – 7,2. Pro reakci byl zvolen fosfátový pufr o pH = 7,0. Aktivita byla měřena v každém vzorku dvakrát a v grafu jsou uvedeny průměrné hodnoty ze dvou měření.

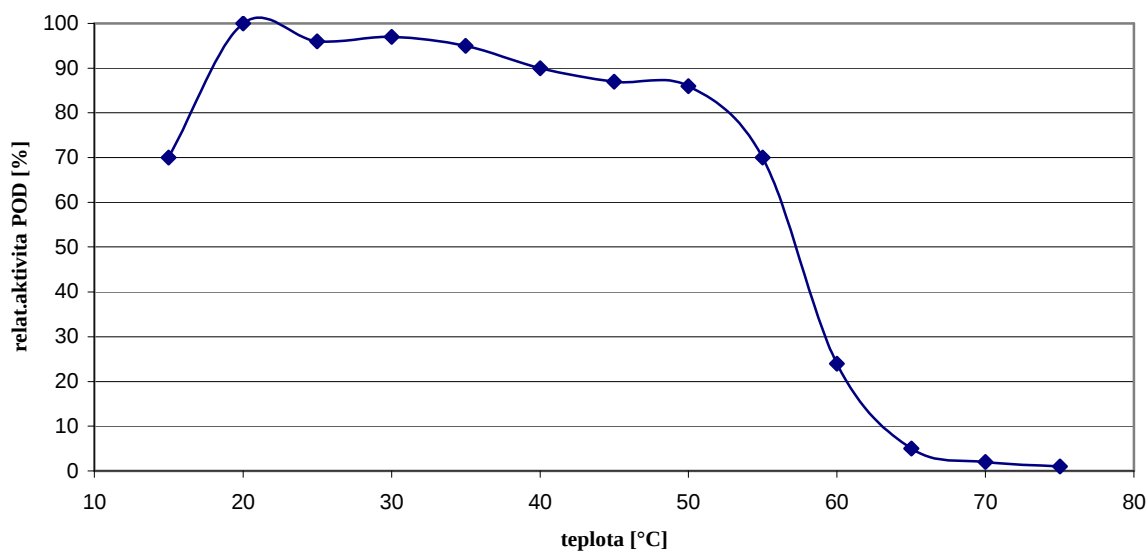
5.1.3.2. Vliv teploty na aktivitu peroxidasy

V grafu 7 je znázorněna aktivita peroxidasy v závislosti na teplotě reakční směsi. Aktivita peroxidasy byla měřena v každém vzorku dvakrát a v grafu 7. jsou uvedeny průměrné hodnoty ze dvou měření. Vypočtená aktivita enzymu byla převedena na %, přičemž jako 100% byla určena nejvyšší aktivita při teplotě 20 °C, která byla určena jako optimální pro naše stanovení. Peroxidasa vykazovala vysokou aktivitu až do 45 °C, poté již klesala a při teplotě 60 °C byla peroxidasa inhibována v důsledku denaturace.

Graf 6. Absorbance barevného produktu při různém pH reakční směsi



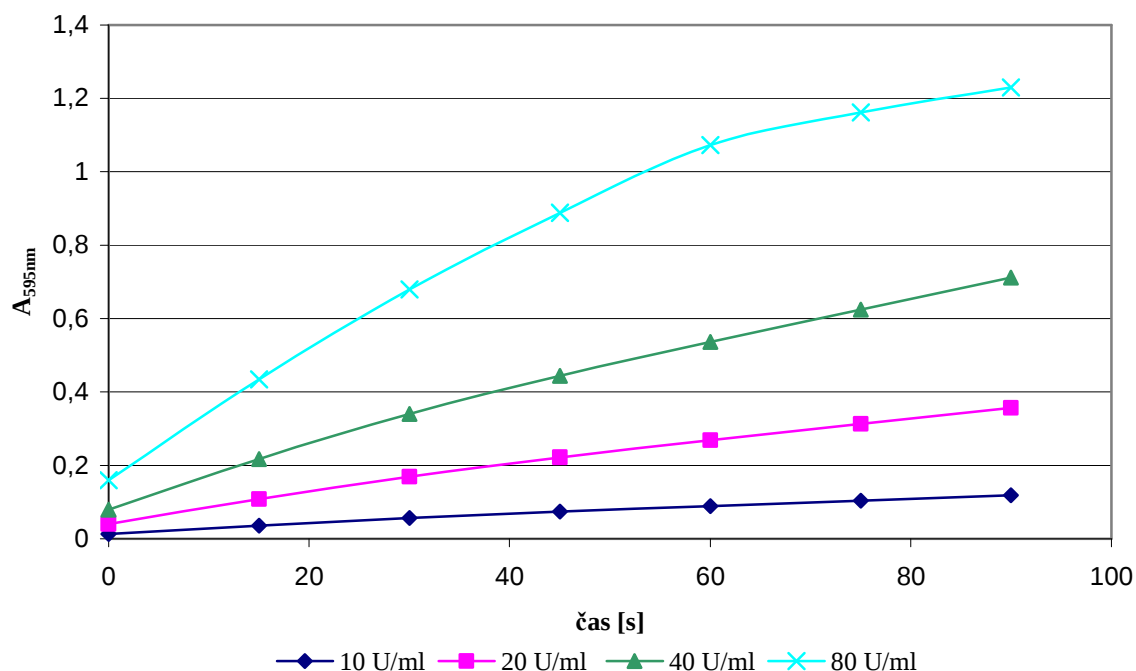
Graf 7. Aktivita peroxidasy při různé teplotě reakční směsi



5.1.3.3. Vliv koncentrace enzymu na průběh reakce

Pro zjištění optimální koncentrace enzymu účastnícího se reakce byla sledována absorbance barevného produktu reakce po přidání různých množství komerčně vyrobené peroxidasy. Měřením bylo zjištěno, že pro optimální měření aktivity je maximální množství enzymu v reakční směsi do aktivity $40 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$. Při vyšším množství bylo nutné vzorky ředit.

Graf 8. Absorbance barevného produktu v závislosti na množství přidané peroxidasy



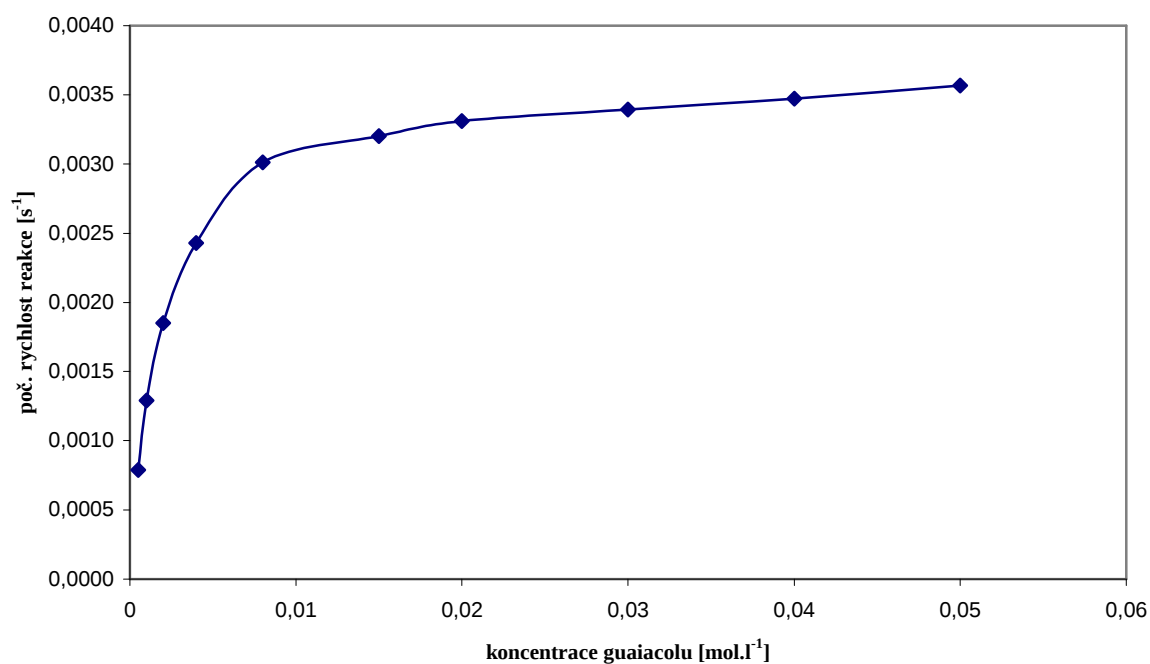
5.1.3.4. Vliv koncentrace guaiacolu na aktivitu peroxidasy

V tab. 8. jsou uvedena data získaná měřením aktivity peroxidasy za účasti různých koncentrací guaiacolu. K linearizaci dle Lineweavera a Burkea byly použity převrácené hodnoty obou veličin. Z časové závislosti na koncentraci guaiacolu byla vypočítána počáteční rychlost reakce a sestrojena saturační křivka. Aktivita byla měřena v každém vzorku dvakrát a v tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty ze dvou měření.

Tab. 8. Počáteční rychlost enzymové reakce v závislosti na koncentraci guaiacolu

koncentrace guaiacolu $c_{\text{guaiacol}} [\text{mol.l}^{-1}]$	počáteční rychlost reakce $v_0 [\text{s}^{-1}]$	c_{guaiacol}^{-1} $[\text{l.mol}^{-1}]$	v_0^{-1} $[\text{s}]$
0,0005	0,00079	2000	1266
0,001	0,00129	1000	775
0,002	0,00185	500	541
0,004	0,00243	250	412
0,008	0,00301	125	332
0,015	0,0032	67	313
0,02	0,003309	50	302
0,03	0,003394	33	295
0,04	0,003472	25	288
0,05	0,003566	20	280

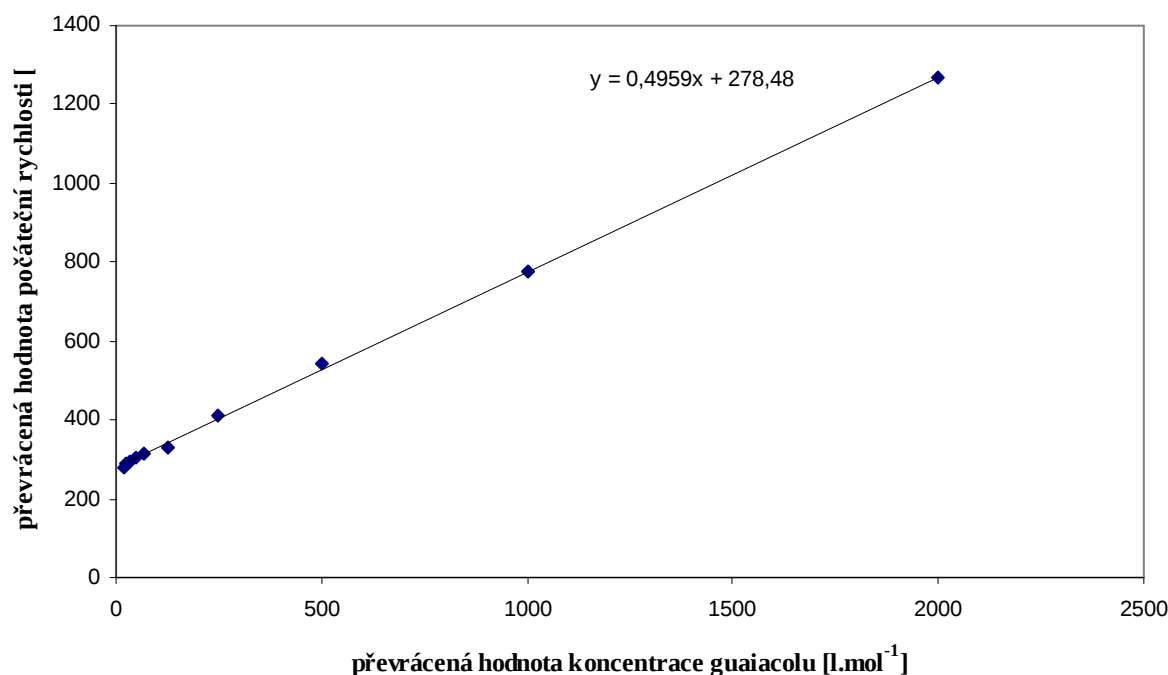
Graf 9. Saturační křivka: závislost počáteční rychlosti reakce v_0 na koncentraci guaiacolu



Linearizací saturační křivky dle Lineweavera a Burkea byla získána rovnice přímky:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{\max} \cdot [guaiacol]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Graf 10. Dvojnásobně reciproký výnos dle Lineweavera a Burkea



Z rovnice byla vypočtena maximální rychlost a Michaelisova konstanta K_M :

$$V_0 = 0,003591 \text{ mol.l}^{-1}.\text{s}^{-1}$$

$$K_M = 0,001781 \text{ mol.l}^{-1}$$

Na základě naměřených a vypočtených dat byla zvolena saturační koncentrace substrátu guaiacolu $0,03 \text{ mol.l}^{-1}$.

5.1.4. Stanovení aktivity lipoxygenasy

Pro stanovení aktivity lipoxygenasy je nejrozšířenější metodou spektrofotometrické měření. Principem metody je přímé stanovení vznikajících hydroperoxidů, které obsahují konjugované dvojné vazby s výraznou absorpcí při 234 nm [120]. Nevýhodou tohoto stanovení je nutnost pracovat v UV oblasti, což znemožňuje automatizaci metody. Na základě spektrofotometrického měření byla proto vyvinuta kolorimetrická stanovení, která využívají oxidaci látek vzniklými hydroperoxidy za vzniku barevné sloučeniny [123, 124].

5.1.4.1. Porovnání spektrofotometrické a kolorimetrické metody

Stanovení aktivity lipoxygenázy bylo optimalizováno pro vzorky ječmene (kap. 4.3.5.). V tab. 9 jsou uvedeny výsledky aktivity LOX, naměřené ve 20 vybraných vzorcích ječmene spektrofotometricky a kolorimetricky. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ze tří měření každého vzorku. Aktivita byla přepočtena na U.mg^{-1} sušiny za použití známé navážky a změřeného obsahu vody ve vzorku.

Tab. 9. Výsledky měření aktivity LOX spektrofotometrickou a kolorimetrickou metodou

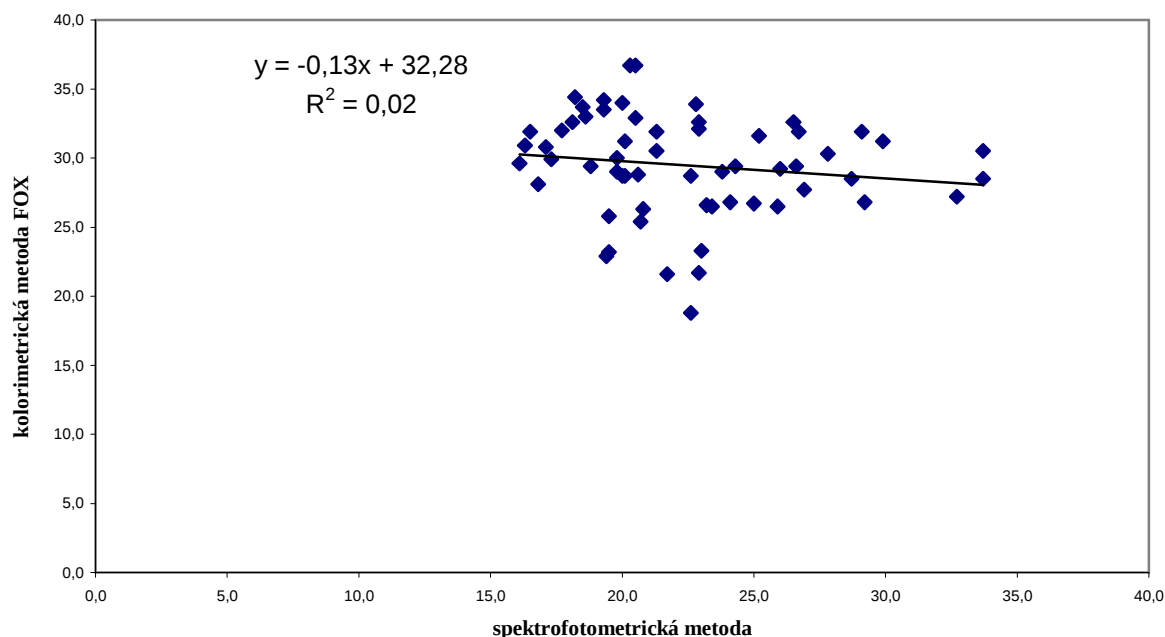
č. vzorku	spektrofotometrická metoda [U.mg ⁻¹ suš.]	kolorimetrická metoda FOX [U.mg ⁻¹ suš.]
1	24,5 ± 1,7	28,2 ± 1,3
2	25,6 ± 1,2	29,3 ± 2,7
3	27,8 ± 1,3	31,6 ± 1,2
4	23,2 ± 0,2	25,4 ± 1,9
5	33,3 ± 0,6	28,7 ± 1,7
6	26,2 ± 0,9	29,6 ± 2,0
7	29,3 ± 0,6	28,8 ± 2,2
8	21,6 ± 2,3	27,7 ± 2,0
9	20,3 ± 0,3	29,6 ± 1,4
10	21,8 ± 0,9	32,1 ± 1,7
11	17,4 ± 0,7	30,2 ± 2,3
12	16,7 ± 0,9	30,8 ± 1,2
13	19,4 ± 0,8	32,3 ± 2,8
14	19,6 ± 1,3	29,5 ± 4,6
15	17,5 ± 1,2	30,7 ± 1,3
16	19,1 ± 0,4	33,5 ± 0,6
17	20,4 ± 0,1	35,4 ± 2,2
18	23,2 ± 0,5	31,2 ± 2,0
19	19,5 ± 0,1	24,0 ± 1,6
20	22,4 ± 0,6	20,7 ± 1,6

Výsledky z měření obou metod byly zaneseny do grafu a ze závislosti byla získána rovnice ve tvaru:

$$y = -0,13x + 32,28$$

Korelační koeficient $r = -0,1513$, z čehož vyplývá, že metody spolu nekorelují.

Graf 11. Korelace spektrofotometrické a kolorimetrické metody



Z porovnání výsledků je zřejmé, že část hodnot aktivit je srovnatelných, ale některé hodnoty jsou u kolorimetrické metody výrazně vyšší než u metody spektrofotometrické. Z dosavadních výsledků nelze však jednoznačně říci, že kolorimetrická metoda je citlivější, z důvodu analýzy malého počtu vzorků. Pro budoucí použití této metody by bylo vhodné proměřit podstatně vyšší počet vzorků a optimalizovat podmínky metody.

V práci byla proto s ohledem na dosažené výsledky nadále pro analýzu biologických vzorků používána přímá metoda v UV oblasti.

5.1.5. Celková antioxidační kapacita

Metody stanovení antioxidační aktivity TRAP a ABTS byly využity při analýze vzorků séra v klinické studii II v roce 2008 (kap. 4.3.6.).

5.1.5.1. Porovnání metod TRAP a ABTS

V tab. 10 jsou uvedeny hodnoty antioxidační kapacity sér získané oběma metodami na počátku a na konci klinického experimentu.

Veškerá data získaná z měření byla zanesena do grafu a získaná rovnice lineární regrese má tvar:

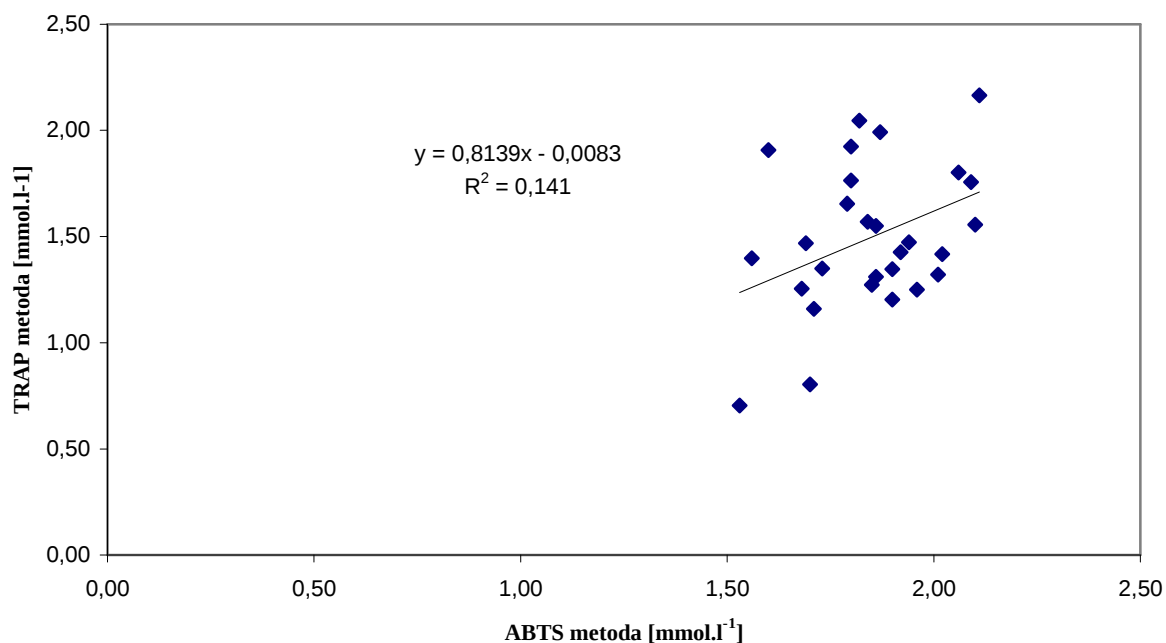
$$y = 0,814 - 0,008x$$

Korelační koeficient má hodnotu $r = 0,376$, což ukazuje pouze na slabou korelaci obou metod. Důvodem může být mimo jiné nestabilita a rozklad antioxidantů během skladování a transportu vzorků k luminometrickému stanovení.

Tab. 10. Analýza antioxidační aktivity v séru metodami ABTS a TRAP

číslo vzorku	Začátek pokusu		Konec pokusu	
	ABTS [mmol.l ⁻¹]	TRAP [mmol.l ⁻¹]	ABTS [mmol.l ⁻¹]	TRAP [mmol.l ⁻¹]
1.	1,71 ± 0,07	1,16 ± 0,06	1,82 ± 0,06	2,05 ± 0,11
2.	1,86 ± 0,05	1,31 ± 0,09	1,73 ± 0,04	1,35 ± 0,08
3.	1,92 ± 0,05	1,43 ± 0,04	1,80 ± 0,07	1,76 ± 0,05
4.	1,96 ± 0,09	1,25 ± 0,11	1,68 ± 0,03	1,25 ± 0,04
5.	1,85 ± 0,04	1,27 ± 0,09	1,56 ± 0,03	1,40 ± 0,04
6.	2,06 ± 0,09	1,80 ± 0,12	1,84 ± 0,05	1,57 ± 0,06
7.	2,01 ± 0,03	1,32 ± 0,08	1,90 ± 0,12	1,20 ± 0,03
8.	2,11 ± 0,11	2,17 ± 0,10	1,87 ± 0,08	1,99 ± 0,10
9.	2,10 ± 0,07	1,56 ± 0,05	1,79 ± 0,08	1,65 ± 0,06
10.	1,90 ± 0,06	1,35 ± 0,02	1,69 ± 0,07	1,47 ± 0,07
11.	1,94 ± 0,04	1,47 ± 0,03	1,60 ± 0,04	1,91 ± 0,11
12.	1,70 ± 0,02	0,80 ± 0,01	1,53 ± 0,03	0,70 ± 0,08
13.	1,86 ± 0,05	1,55 ± 0,05	1,80 ± 0,08	1,92 ± 0,09
14.	2,02 ± 0,09	1,42 ± 0,07	2,09 ± 0,10	1,76 ± 0,06

Graf 12. Porovnání metod TRAP a ABTS



5.2. Stanovení nízkomolekulárních a enzymových antioxidantů v ječmeni a ve sladu

5.2.1. Vzorky ječmene a sladu

Analýza antioxidantů v ječmeni a ve sladu probíhala v rámci spolupráce s Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským v Brně, kde byla doktorandka zaměstnána v období 2006 – 2008. Řešená problematika je součástí Výzkumného záměru MŠMT a dalších projektů řešených na VÚPS v daném období. Experimentální záměr a zejména výběr a typ biologického materiálu v této části práce byl proto modifikován tak, aby řešení bylo v souladu s potřebami zaměstnavatele.

V rámci této části práce byly na VÚPS vyvinuty a optimalizovány metody pro stanovení vybraných nízkomolekulárních a enzymových antioxidantů (kap. 5.1.). Hladiny antioxidantů v ječmeni jsou sledovány z důvodu posouzení kvality vstupní suroviny pro výrobu piva a také z důvodu sledování změn obsahu antioxidantů v ječmeni v závislosti na odrůdě, lokalitě, ošetření a předplodině.

Pro analýzu antioxidačních enzymů a vitamínů bylo použito 48 vzorků ječmene. Bylo vybráno 6 odrůd sladovnického ječmene – Bojos, Jersey, Malz, Radegast, Sebastian a Tolar. Odrůdy byly vypěstovány na čtyřech různých lokalitách v okresech Brno-venkov, Prostějov, Karlovy Vary a Břeclav. Ze získaných vzorků byl připraven slad a analyzován za stejných podmínek jako ječmen.

Pro zhodnocení vlivu povětrnostních podmínek na obsah vybraných parametrů byly prováděny analýzy totožných odrůd ze stejných lokalit po dobu dvou let.

Obsahy všech měřených parametrů byly přepočteny na sušinu za použití známé navážky a známého obsahu vody ve vzorku.

5.2.2. Stanovení aktivity SOD v ječmeni a ve sladu

Aktivita SOD byla analyzována v extraktech z ječmene nebo sladu optimalizovanou metodou (kap. 4.3.2., 5.1.2.). V tab. 11. jsou uvedeny průměrné hodnoty aktivity SOD naměřené v jednotlivých odrůdách ječmene a sladu a v jednotlivých lokalitách v období dvou let.

Tab. 11. Průměrné hodnoty SOD aktivity $\pm$ směrodatné odchylky u jednotlivých odrůd ječmene a sladu

odrůda	1. rok sledování		2. rok sledování	
	aktivita SOD [U.g ⁻¹ sušiny] ječmen	slad	aktivita SOD [U.g ⁻¹ sušiny] ječmen	slad
Bojos	135 $\pm$ 22	155 $\pm$ 15	128 $\pm$ 20	133 $\pm$ 15
Jersey	135 $\pm$ 17	158 $\pm$ 24	114 $\pm$ 16	127 $\pm$ 13
Malz	114 $\pm$ 15	148 $\pm$ 23	93 $\pm$ 16	126 $\pm$ 22
Radegast	104 $\pm$ 14	135 $\pm$ 26	92 $\pm$ 13	113 $\pm$ 12
Sebastian	111 $\pm$ 13	148 $\pm$ 26	110 $\pm$ 15	127 $\pm$ 19
Tolar	121 $\pm$ 15	145 $\pm$ 21	106 $\pm$ 14	116 $\pm$ 11

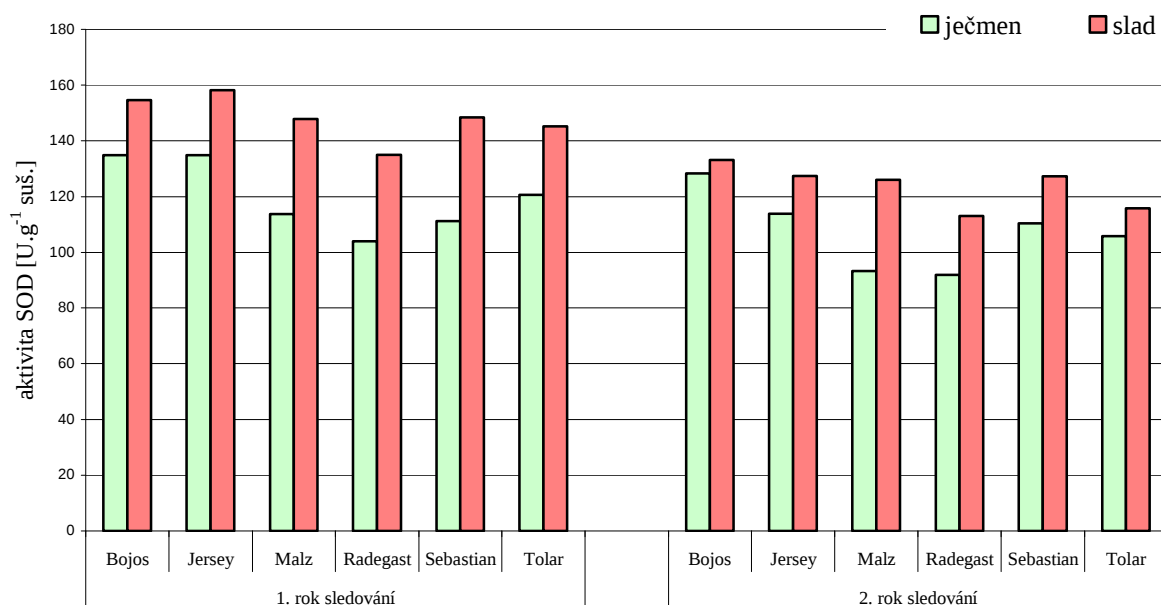
Z výsledků je zřejmé, že aktivita SOD je výrazně vyšší ve sladu nežli v ječmeni. Proces sladování tedy zřejmě způsobuje aktivaci antioxidantů v obilce ječmene. V prvním roce sledování byly nalezeny ve všech odrůdách vyšší hodnoty aktivity SOD nežli v následujícím roce. Nejvyšší hodnoty u ječmene byly nalezeny v odrůdách Bojos a Jersey, nejnižší u odrůdy Radegast.

Tab. 12. Průměrné hodnoty SOD aktivity $\pm$ směrodatné odchylky v ječmeni a ve sladu v závislosti na lokalitě

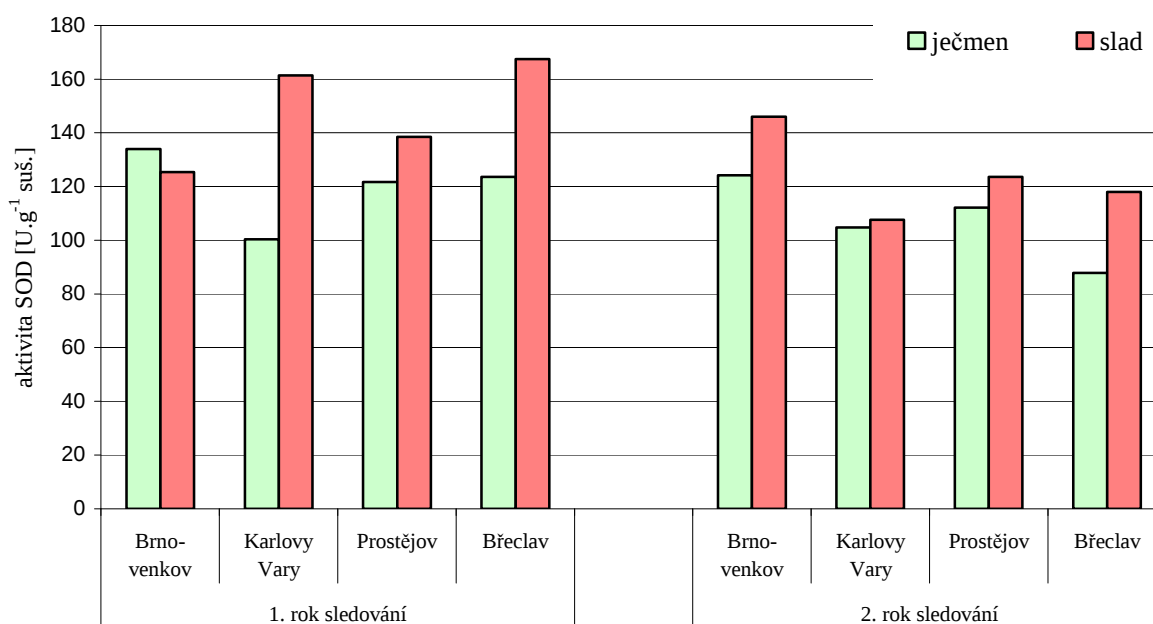
lokalita	1. rok sledování		2. rok sledování	
	aktivita SOD [U.g ⁻¹ sušiny] ječmen	slad	aktivita SOD [U.g ⁻¹ sušiny] ječmen	slad
Brno-venkov	134 $\pm$ 19	125 $\pm$ 15	124 $\pm$ 18	146 $\pm$ 14
Karlovy Vary	100 $\pm$ 14	161 $\pm$ 20	105 $\pm$ 19	108 $\pm$ 7
Prostějov	122 $\pm$ 14	138 $\pm$ 14	112 $\pm$ 11	124 $\pm$ 10
Břeclav	124 $\pm$ 16	168 $\pm$ 18	88 $\pm$ 12	118 $\pm$ 7

Nejvyšší hodnoty v ječmeni byly nalezeny v lokalitě okresu Brno-venkov, zatímco nejvyšší aktivitu ve sladu vykazovala lokalita v okrese Břeclav. Opět hodnoty v prvním roce sledování jsou výrazně vyšší nežli v roce druhém – zde byly nalezeny nejvyšší hodnoty aktivity v ječmeni i ve sladu v lokalitě Brno-venkov.

Graf 13. Aktivity SOD v ječmeni a ve sladu v závislosti na odrůdě



Graf 14. Aktivita SOD v ječmeni a ve sladu v závislosti na pěstební lokalitě



5.2.3. Stanovení aktivity katalasy v ječmeni a ve sladu

Aktivita katalasy byla analyzována v extraktech z ječmene nebo sladu optimalizovanou metodou uvedenou v kap. 4.3.1. a 5.1.1. V tab. 13. jsou uvedeny průměrné hodnoty aktivity katalasy naměřené v jednotlivých odrůdách ječmene a sladu a v jednotlivých lokalitách v období dvou let.

Tab. 13. Průměrné hodnoty katalasové aktivity $\pm$ směrodatné odchylky u jednotlivých odrůd ječmene a sladu

odrůda	1. rok sledování		2. rok sledování	
	aktivita CAT [U.g ⁻¹ sušiny] ječmen	slad	aktivita CAT [U.g ⁻¹ sušiny] ječmen	slad
Bojos	90 $\pm$ 31	160 $\pm$ 51	109 $\pm$ 33	135 $\pm$ 33
Jersey	101 $\pm$ 36	187 $\pm$ 89	114 $\pm$ 30	135 $\pm$ 25
Malz	86 $\pm$ 33	158 $\pm$ 67	97 $\pm$ 33	110 $\pm$ 24
Radegast	63 $\pm$ 33	152 $\pm$ 46	107 $\pm$ 29	126 $\pm$ 28
Sebastian	74 $\pm$ 24	151 $\pm$ 53	110 $\pm$ 30	116 $\pm$ 34
Tolar	100 $\pm$ 33	162 $\pm$ 58	110 $\pm$ 36	113 $\pm$ 26

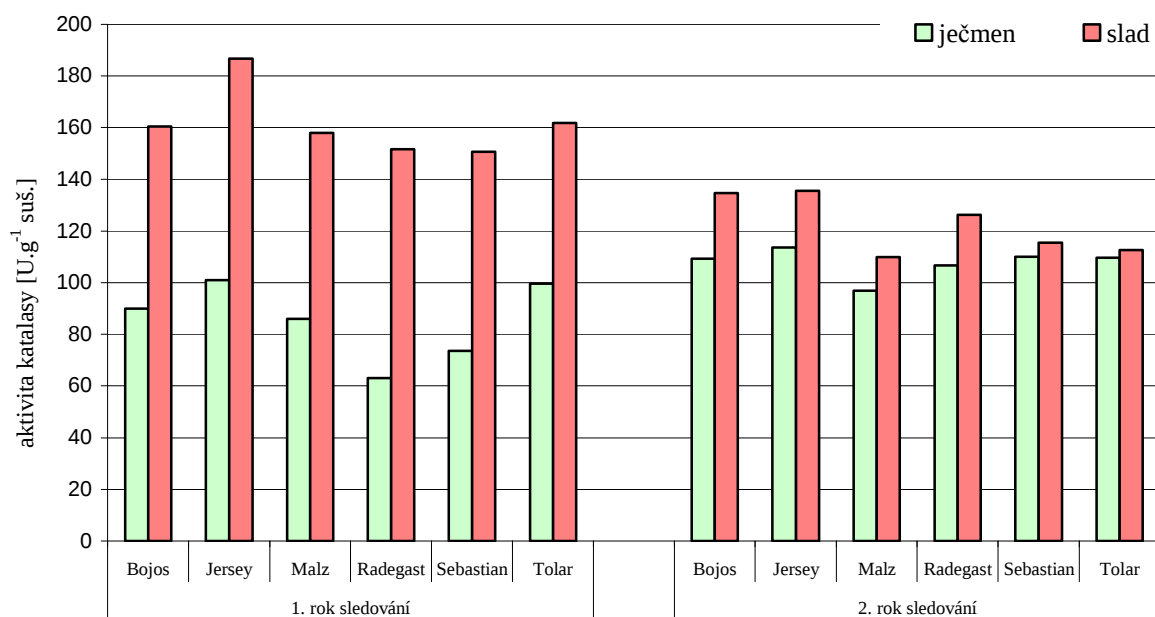
Výsledky ukazují nárůst aktivity enzymu katalasy během sladování; v prvním roce sledování byly hodnoty ve sladu v některých případech i dvakrát vyšší. Ve druhém roce sledování rozdíly v aktivitě v ječmeni a ve sladu nejsou již tak výrazné. Z výsledků nelze prokázat závislost aktivity na odrůdě.

Tab. 14. Průměrné hodnoty katalasové aktivity $\pm$ směrodatné odchylky v ječmeni a ve sladu v závislosti na lokalitě

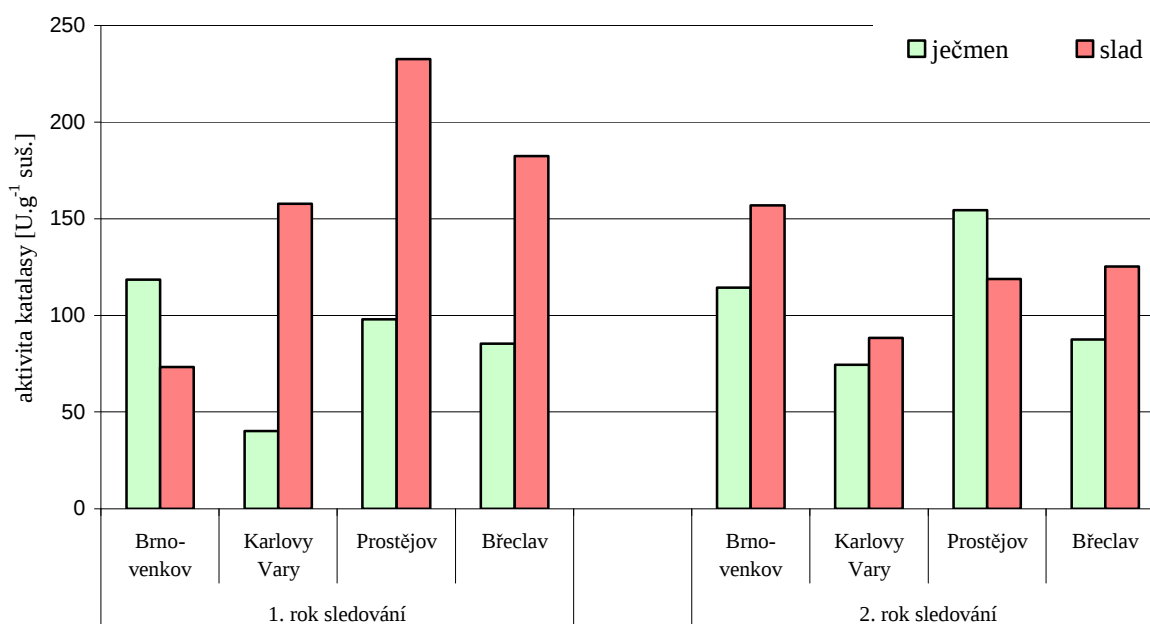
lokalita	1. rok sledování		2. rok sledování	
	aktivita CAT [U.g ⁻¹ sušiny] ječmen	slad	aktivita CAT [U.g ⁻¹ sušiny] ječmen	slad
Brno-venkov	119 $\pm$ 16	73 $\pm$ 14	114 $\pm$ 10	157 $\pm$ 21
Karlovy Vary	40 $\pm$ 9	158 $\pm$ 17	74 $\pm$ 11	88 $\pm$ 14
Prostějov	98 $\pm$ 27	233 $\pm$ 37	154 $\pm$ 13	119 $\pm$ 10
Břeclav	85 $\pm$ 21	182 $\pm$ 31	88 $\pm$ 7	125 $\pm$ 25

Z výsledků aktivit katalasy v jednotlivých pěstebních lokalitách jsou patrné výrazné rozdíly. V lokalitě Brno-venkov byly nalezeny v prvním roce sledování nižší aktivity ve sladu nežli v ječmeni. Ke stejnému jevu došlo v následujícím roce v lokalitě Prostějov. Závislost aktivity na pěstební lokalitě nebylo možno prokázat, aktivitu pravděpodobně ovlivňují klimatické podmínky v daném roce.

Graf 15. Aktivity katalasy v ječmeni a ve sladu v závislosti na odrůdě



Graf 16. Aktivita katalasy v ječmeni a ve sladu v závislosti na pěstební lokalitě



5.2.4. Stanovení aktivity peroxidasy v ječmeni a ve sladu

Aktivita peroxidasy byla analyzována v extraktech z ječmene nebo sladu optimalizovanou metodou uvedenou v kap. 4.3.3. a 5.1.3. V tab. 15. jsou uvedeny průměrné hodnoty aktivity peroxidasy naměřené v jednotlivých odrůdách ječmene a sladu a v jednotlivých lokalitách v období dvou let.

Tab. 15. Průměrné hodnoty aktivity peroxidasy $\pm$ směrodatné odchylky u jednotlivých odrůd ječmene a sladu

odrůda	1. rok sledování		2. rok sledování	
	aktivita POD [U.g ⁻¹ sušiny] ječmen	aktivita POD [U.g ⁻¹ sušiny] slad	aktivita POD [U.g ⁻¹ sušiny] ječmen	aktivita POD [U.g ⁻¹ sušiny] slad
Bojos	1,34 $\pm$ 0,74	4,57 $\pm$ 0,73	1,01 $\pm$ 0,20	4,39 $\pm$ 1,00
Jersey	1,16 $\pm$ 0,46	4,34 $\pm$ 0,68	1,00 $\pm$ 0,14	4,26 $\pm$ 0,61
Malz	1,39 $\pm$ 0,61	4,89 $\pm$ 0,71	1,03 $\pm$ 0,22	4,10 $\pm$ 1,19
Radegast	1,12 $\pm$ 0,61	4,55 $\pm$ 0,76	0,71 $\pm$ 0,14	3,63 $\pm$ 0,87
Sebastian	0,90 $\pm$ 0,34	3,82 $\pm$ 0,87	0,76 $\pm$ 0,11	3,14 $\pm$ 1,05
Tolar	1,00 $\pm$ 0,48	4,41 $\pm$ 0,80	0,59 $\pm$ 0,09	3,20 $\pm$ 0,59

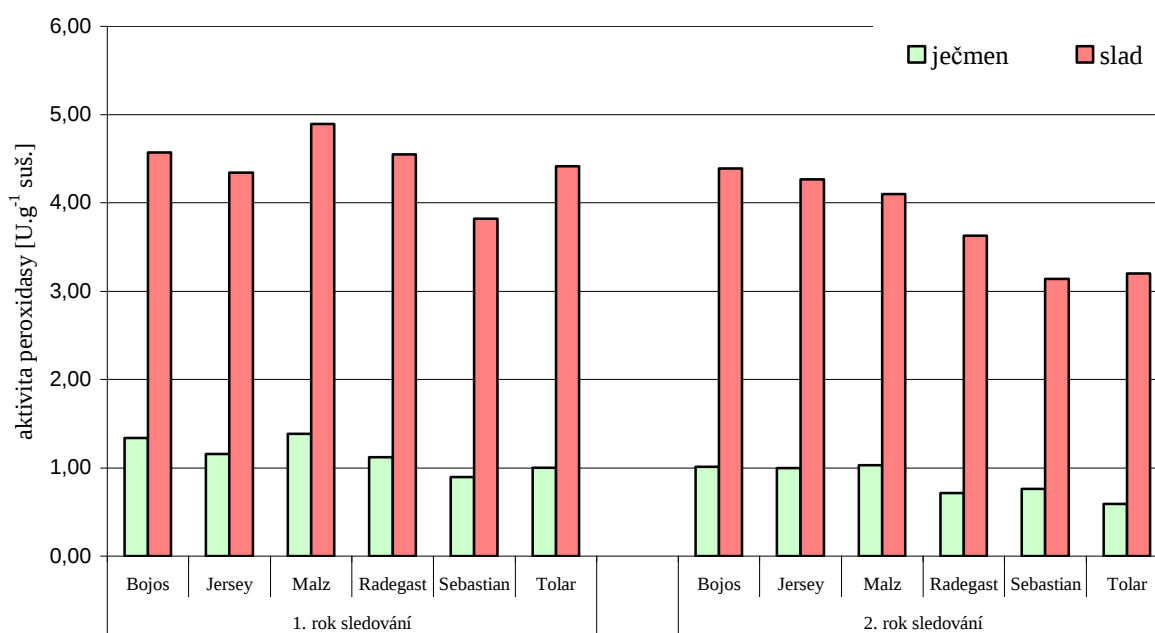
Z výsledků je patrný několikanásobný nárůst aktivity peroxidasy během sladování ječmene. Nejvyšší aktivity byly nalezeny v odrůdě Malz, nejnižší v odrůdě Sebastian. Tyto hodnoty však nebyly vzhledem k ostatním odrůdám výrazně odlišné.

Tab. 16. Průměrné hodnoty aktivity peroxidasy $\pm$ směrodatné odchylky v ječmeni a ve sladu v závislosti na lokalitě

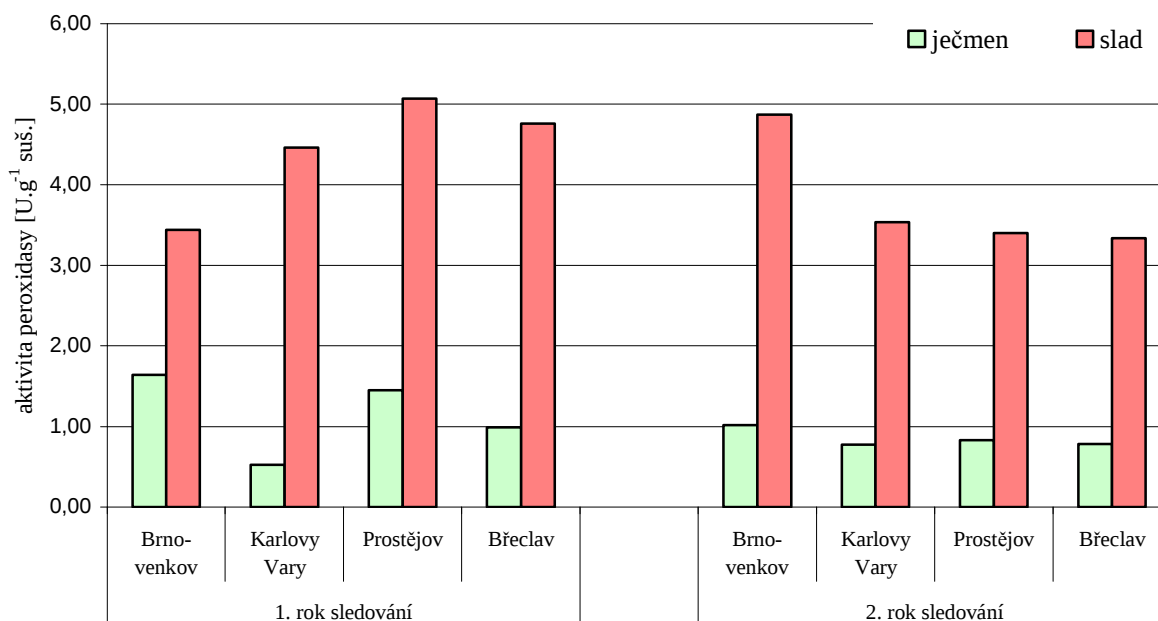
lokalita	1. rok sledování		2. rok sledování	
	aktivita POD [U.g ⁻¹ sušiny] ječmen	slad	aktivita POD [U.g ⁻¹ sušiny] ječmen	slad
Brno-venkov	1,64 $\pm$ 0,52	3,44 $\pm$ 0,54	1,02 $\pm$ 0,25	4,87 $\pm$ 0,95
Karlovy Vary	0,53 $\pm$ 0,20	4,46 $\pm$ 0,41	0,77 $\pm$ 0,17	3,54 $\pm$ 0,73
Prostějov	1,45 $\pm$ 0,19	5,07 $\pm$ 0,46	0,83 $\pm$ 0,16	3,40 $\pm$ 0,93
Břeclav	0,99 $\pm$ 0,50	4,76 $\pm$ 0,75	0,78 $\pm$ 0,25	3,34 $\pm$ 0,64

Z naměřených aktivit nelze jednoznačně prokázat vliv lokality na aktivitu peroxidasy. V prvním roce sledování byly naměřeny významné rozdíly mezi jednotlivými pěstebními lokalitami, ve druhém roce byly aktivity bez významného rozdílu; výjimku tvořila aktivita POD ve sladu u lokality Brno-venkov, která byla výrazně vyšší oproti ostatním.

Graf 17. Aktivity peroxidasy v ječmeni a ve sladu v závislosti na odrůdě



Graf 18. Aktivity peroxidasy v ječmeni a ve sladu v závislosti na pěstební lokalitě



5.2.5. Stanovení vitamínu E v ječmeni a ve sladu

Obsah vitamínu E byl analyzován v extraktech z ječmene nebo sladu (kap. 4.3.8.2). V tab. 17. jsou uvedeny průměrné hodnoty vitamínu E naměřené v jednotlivých odrůdách ječmene a sladu a v jednotlivých lokalitách v období dvou let.

Tab. 17. Průměrné hodnoty obsahu vitamínu E $\pm$ směrodatné odchylky u jednotlivých odrůd ječmene a sladu

odrůda	1. rok sledování		2. rok sledování	
	obsah vitamínu E [mg.kg ⁻¹] ječmen	obsah vitamínu E [mg.kg ⁻¹] slad	obsah vitamínu E [mg.kg ⁻¹] ječmen	obsah vitamínu E [mg.kg ⁻¹] slad
Bojos	16,2 $\pm$ 3,0	18,7 $\pm$ 2,5	7,9 $\pm$ 2,8	18,4 $\pm$ 2,4
Jersey	15,5 $\pm$ 1,9	21,4 $\pm$ 3,4	9,6 $\pm$ 3,1	20,5 $\pm$ 2,2
Malz	15,1 $\pm$ 1,7	19,8 $\pm$ 2,0	9,7 $\pm$ 2,7	20,2 $\pm$ 1,9
Radegast	14,9 $\pm$ 2,2	18,0 $\pm$ 2,8	7,7 $\pm$ 3,5	19,4 $\pm$ 1,8
Sebastian	13,9 $\pm$ 1,7	20,3 $\pm$ 2,1	8,5 $\pm$ 3,0	21,1 $\pm$ 2,5
Tolar	14,8 $\pm$ 2,2	18,3 $\pm$ 3,1	9,1 $\pm$ 2,7	17,1 $\pm$ 3,1

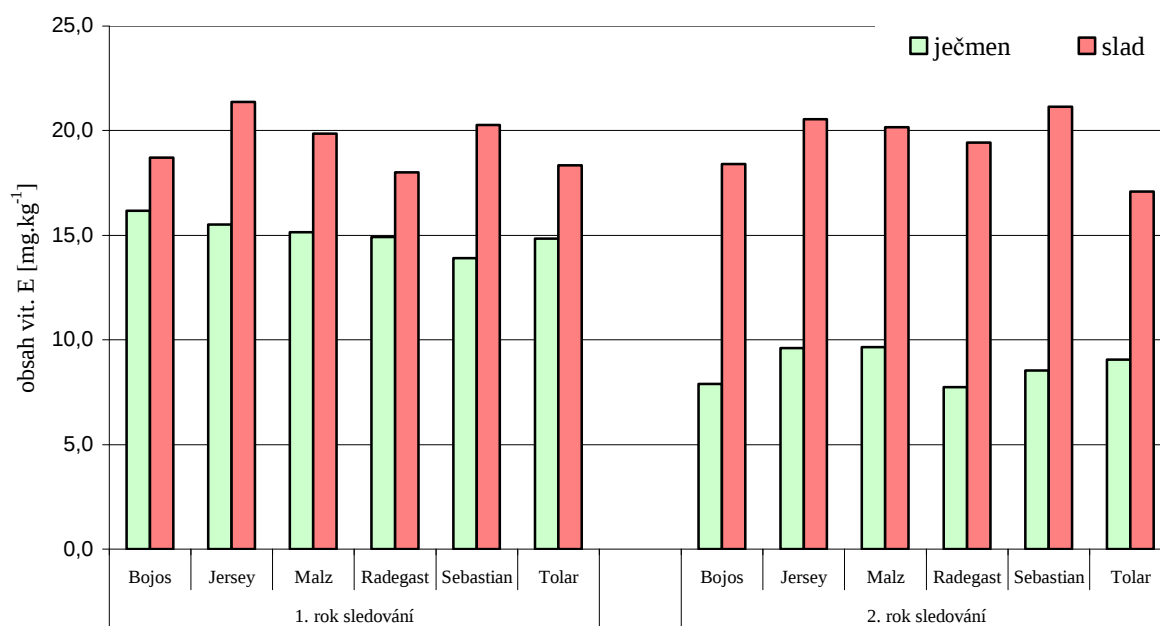
Z výsledků je patrný výrazný nárůst hladin vitamínu E při sladování ječmene. Nebyl nalezen signifikantní rozdíl v hladinách u jednotlivých odrůd. V druhém roce sledování však nastal výrazný pokles hladin v ječmeni; naměřené hladiny vitamínu E ve sladu se v obou sledovaných ročnících nezměnily.

Tab. 18. Průměrné hodnoty obsahu vitaminu E $\pm$ směrodatné odchylky v ječmeni a ve sladu v závislosti na lokalitě

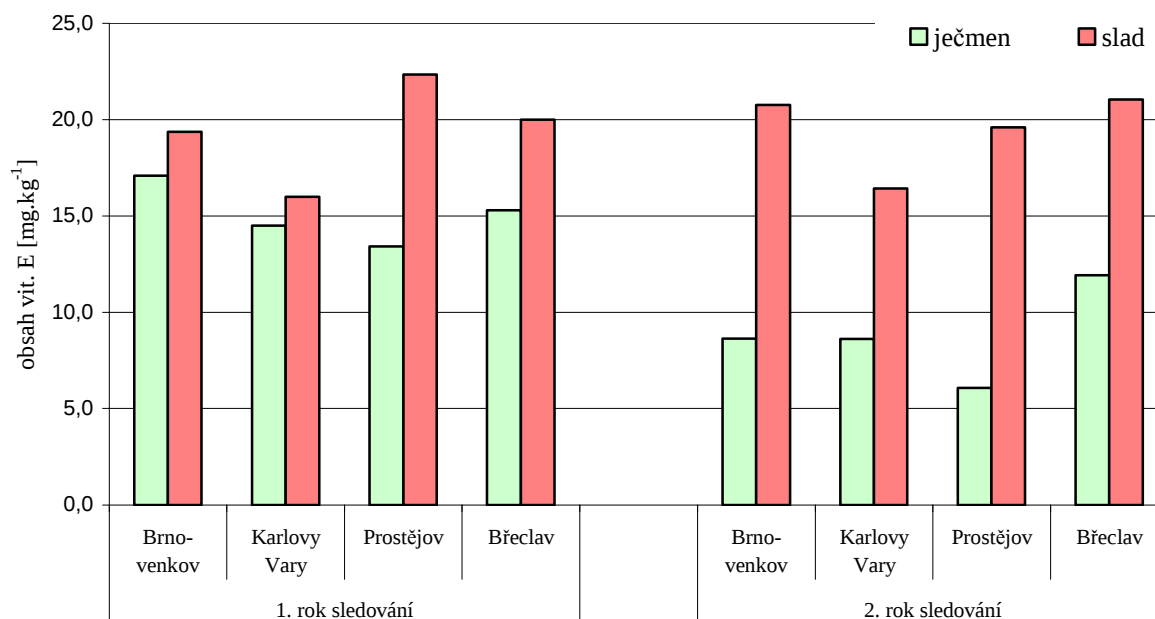
lokalita	1. rok sledování		2. rok sledování	
	obsah vitaminu E [mg.kg ⁻¹] ječmen	slad	obsah vitaminu E [mg.kg ⁻¹] ječmen	slad
Brno-venkov	17,1 $\pm$ 2,5	19,4 $\pm$ 1,7	8,6 $\pm$ 3,6	20,8 $\pm$ 1,6
Karlovy Vary	14,5 $\pm$ 0,9	16,0 $\pm$ 1,6	8,6 $\pm$ 2,0	16,4 $\pm$ 2,6
Prostějov	13,4 $\pm$ 1,9	22,3 $\pm$ 2,2	6,1 $\pm$ 1,5	19,6 $\pm$ 2,2
Břeclav	15,3 $\pm$ 1,7	20,0 $\pm$ 2,0	11,9 $\pm$ 1,6	21,0 $\pm$ 1,5

Z výsledků nelze prokázat jednoznačnou závislost obsahu vitaminu E na pěstební lokalitě. Nejnížší hladiny v ječmeni byly naměřeny u vzorků z lokality Prostějov, ovšem ve sladech z téže lokality došlo k výraznému nárůstu obsahu. Nejnížší hladiny ve sladu byly naměřeny v lokalitě Karlovy Vary.

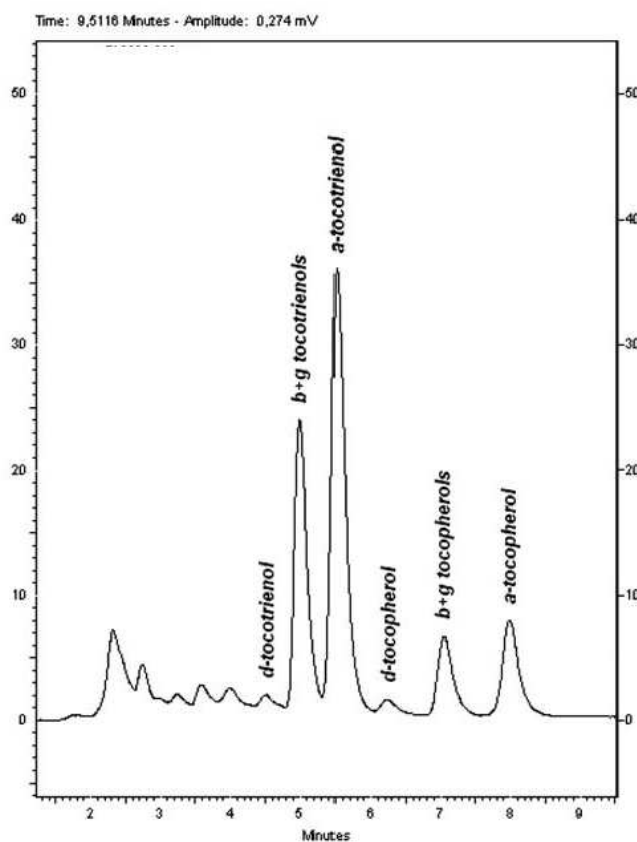
Graf 19. Hladiny vitaminu E v ječmeni a ve sladu v závislosti na odrůdě



Graf 20. Hladiny vitaminu E v ječmeni a ve sladu v závislosti na lokalitě



Na obr. 33. je znázorněn chromatogram analýzy vitaminu E v ječmeni; obsah vitaminu E byl stanoven jako suma obsažených tokoferolů a tokotrienolů ve vzorku.



Obr. 33. Chromatogram analýzy tokoferolů a tokotrienolů v ječmeni

5.2.6. Stanovení karotenoidů v ječmeni a ve sladu

5.2.6.1. Stanovení luteinu v ječmeni a ve sladu

Obsah luteinu byl analyzován v extraktech z ječmene nebo sladu metodou uvedenou v kap. 4.3.8.2. V tab. 19. jsou uvedeny průměrné hodnoty luteinu naměřené v jednotlivých odrůdách ječmene a sladu a v jednotlivých lokalitách v období dvou let.

Tab. 19. Průměrné hodnoty obsahu luteinu $\pm$ směrodatné odchylky u jednotlivých odrůd ječmene a sladu

odrůda	1. rok sledování		2. rok sledování	
	obsah luteinu [mg.kg ⁻¹] ječmen	slad	obsah luteinu [mg.kg ⁻¹] ječmen	slad
Bojos	4,13 $\pm$ 1,03	6,84 $\pm$ 0,99	3,00 $\pm$ 0,41	5,56 $\pm$ 0,69
Jersey	4,94 $\pm$ 0,87	7,83 $\pm$ 1,03	3,26 $\pm$ 0,50	5,80 $\pm$ 0,82
Malz	4,29 $\pm$ 0,61	6,52 $\pm$ 0,64	2,46 $\pm$ 0,37	5,34 $\pm$ 1,04
Radegast	3,97 $\pm$ 0,70	6,25 $\pm$ 0,84	2,75 $\pm$ 0,33	4,78 $\pm$ 0,58
Sebastian	4,68 $\pm$ 0,73	6,94 $\pm$ 0,54	3,22 $\pm$ 0,68	5,16 $\pm$ 1,07
Tolar	4,97 $\pm$ 0,68	7,16 $\pm$ 0,49	3,66 $\pm$ 0,65	5,13 $\pm$ 0,43

Hladiny luteinu v ječmenu se pohybovaly v prvním roce sledování mezi 4-5 mg.kg⁻¹. Ve sladu vzrostla jeho hladina o polovinu. Nejvyšší hodnoty byly zaznamenány v odrůdě Jersey, nejnižší v odrůdě Radegast.

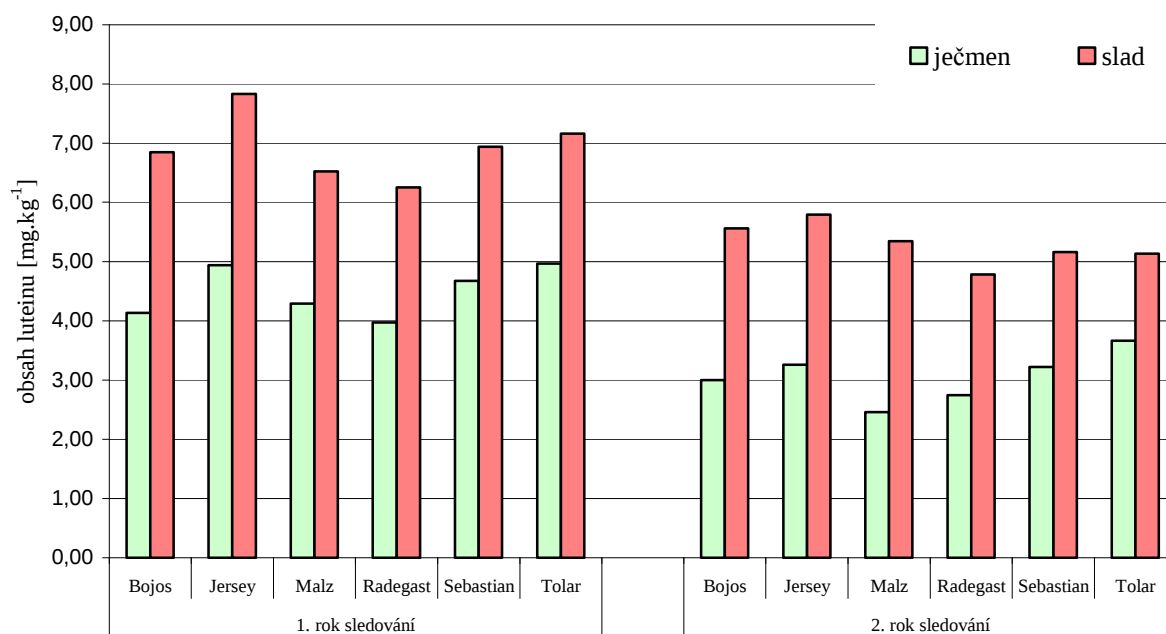
Ve druhém roce sledování byly naměřeny nižší hodnoty v ječmeni i ve sladu. Závislost na odrůdě nebyla prokázána.

Tab. 20. Průměrné hodnoty obsahu luteinu $\pm$ směrodatné odchylky v ječmeni a ve sladu v závislosti na lokalitě

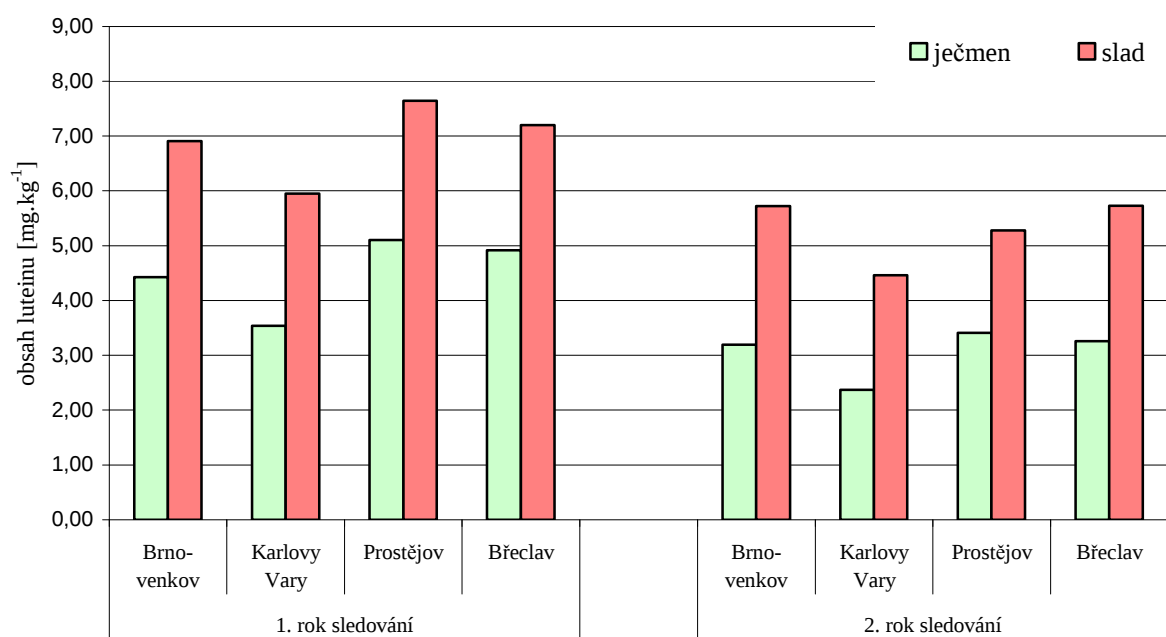
lokalita	1. rok sledování		2. rok sledování	
	obsah luteinu [mg.kg ⁻¹] ječmen	slad	obsah luteinu [mg.kg ⁻¹] ječmen	slad
Brno-venkov	4,43 $\pm$ 0,65	6,91 $\pm$ 0,72	3,19 $\pm$ 0,38	5,72 $\pm$ 0,63
Karlovy Vary	3,54 $\pm$ 0,75	5,95 $\pm$ 0,64	2,37 $\pm$ 0,41	4,46 $\pm$ 1,03
Prostějov	5,10 $\pm$ 0,70	7,64 $\pm$ 0,83	3,41 $\pm$ 0,72	5,28 $\pm$ 0,53
Břeclav	4,92 $\pm$ 0,35	7,20 $\pm$ 0,56	3,26 $\pm$ 0,38	5,73 $\pm$ 0,47

Zhodnocením výsledků hladin luteinu v závislosti na lokalitě ukázalo, že nejnižší hladiny luteinu se vyskytovaly po oba roky v lokalitě Karlovy Vary. Nevyšší hladiny byly naměřeny první rok v lokalitě Prostějov; v druhém roce měly všechny lokality výrazně nižší hladiny nežli první, avšak žádná se významně nelišila od ostatních.

Graf 21. Hladiny luteinu v ječmeni a ve sladu v závislosti na odrůdě



Graf 22. Hladiny luteinu v ječmeni a ve sladu v závislosti na lokalitě



5.2.6.2. Stanovení β -karotenu v ječmeni a ve sladu

Obsah β -karotenu byl analyzován v extraktech z ječmene nebo sladu (kap. 4.3.8.2.). V tab. 21. jsou uvedeny průměrné hodnoty β -karotenu naměřené v jednotlivých odrůdách ječmene a sladu a v jednotlivých lokalitách v období dvou let.

Tab. 21. Průměrné hodnoty obsahu β -karotenu $\pm$ směrodatné odchylky u jednotlivých odrůd ječmene a sladu

odrůda	1. rok sledování		2. rok sledování	
	obsah β -karotenu [mg.kg ⁻¹] ječmen	slad	obsah β -karotenu [mg.kg ⁻¹] ječmen	slad
Bojos	0,11 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,07	0,14 $\pm$ 0,03	0,54 $\pm$ 0,08
Jersey	0,12 $\pm$ 0,02	0,46 $\pm$ 0,06	0,13 $\pm$ 0,02	0,57 $\pm$ 0,12
Malz	0,12 $\pm$ 0,01	0,38 $\pm$ 0,05	0,13 $\pm$ 0,02	0,55 $\pm$ 0,07
Radegast	0,11 $\pm$ 0,09	0,34 $\pm$ 0,04	0,12 $\pm$ 0,02	0,47 $\pm$ 0,07
Sebastian	0,14 $\pm$ 0,10	0,36 $\pm$ 0,05	0,14 $\pm$ 0,02	0,48 $\pm$ 0,06
Tolar	0,13 $\pm$ 0,10	0,32 $\pm$ 0,04	0,14 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,04

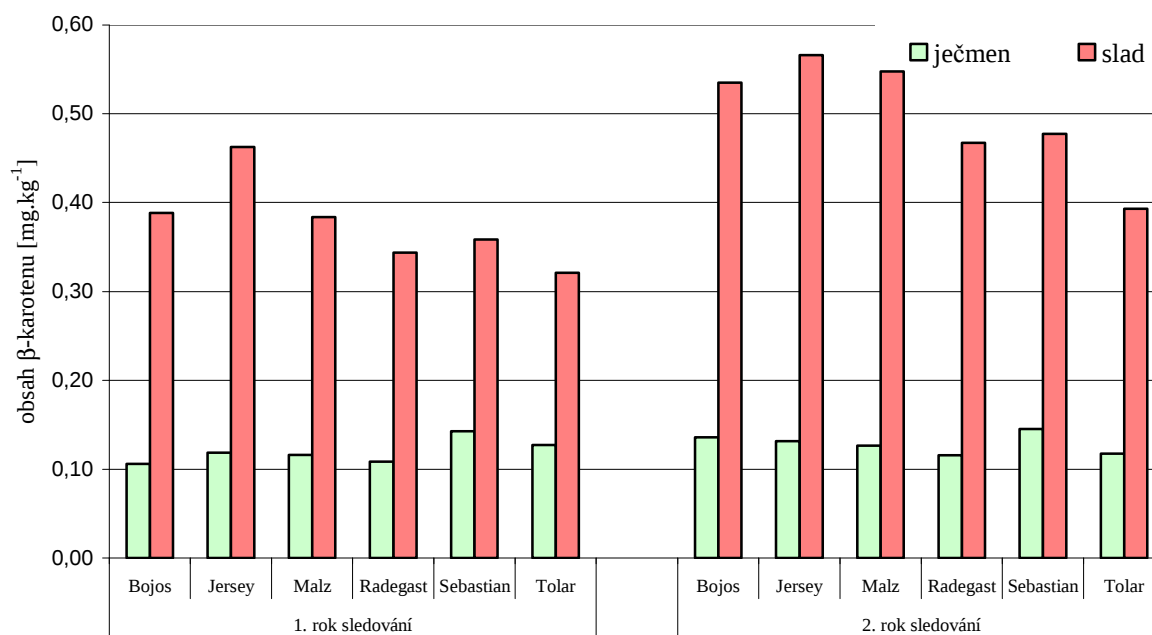
Hladiny β -karotenu v ječmeni se pohybovaly po oba roky sledování mezi 0,11 - 0,14 mg.kg⁻¹ bez výraznějších rozdílů. Hodnoty ve sladu však byly první rok sledování výrazně nižší než druhý rok. Nejvyšší hladiny ve sladu byly naměřeny v odrůdě Jersey po oba roky, nejnižší v odrůdě Tolar.

Tab. 22. Průměrné hodnoty obsahu β -karotenu $\pm$ směrodatné odchylky v ječmeni a ve sladu v závislosti na lokalitě

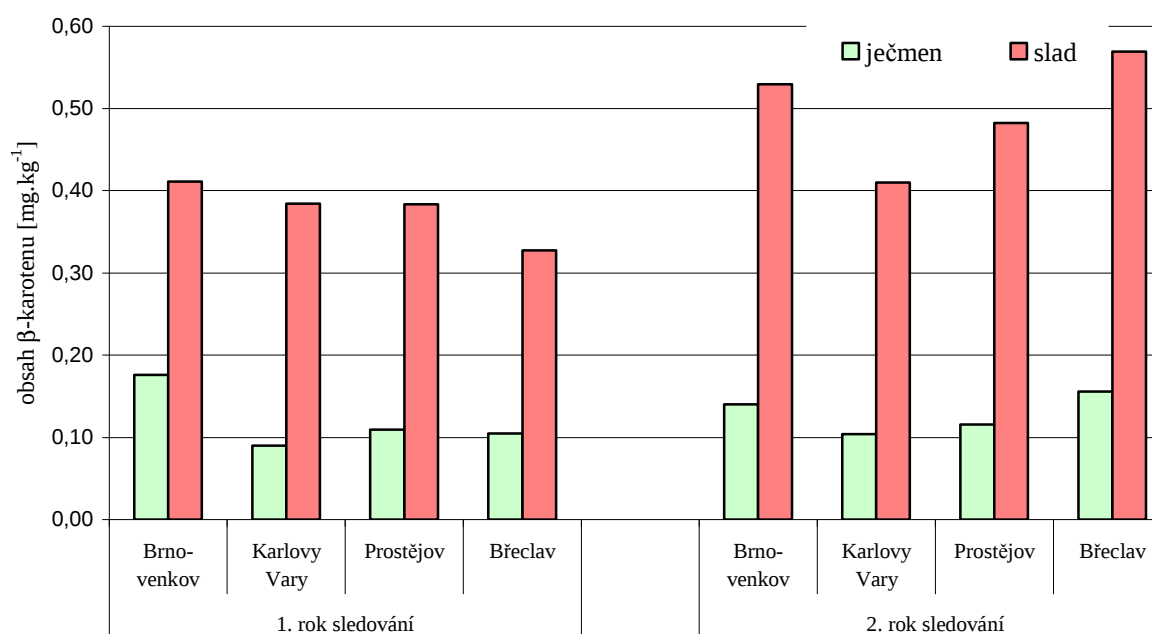
lokalita	1. rok sledování		2. rok sledování	
	obsah β -karotenu [mg.kg ⁻¹] ječmen	slad	obsah β -karotenu [mg.kg ⁻¹] ječmen	slad
Brno-venkov	0,18 $\pm$ 0,11	0,41 $\pm$ 0,07	0,14 $\pm$ 0,02	0,53 $\pm$ 0,08
Karlovy Vary	0,09 $\pm$ 0,02	0,38 $\pm$ 0,06	0,10 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,07
Prostějov	0,11 $\pm$ 0,02	0,38 $\pm$ 0,06	0,12 $\pm$ 0,01	0,48 $\pm$ 0,05
Břeclav	0,11 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,06	0,16 $\pm$ 0,01	0,57 $\pm$ 0,09

Sledováním hladin β -karotenu v jednotlivých pěstebních lokalitách bylo zjištěno, že nejnižší hladiny v ječmeni byly stejně jako u luteinu nalezeny v lokalitě Karlovy Vary. Jestliže byly u luteinu naměřeny druhý rok sledování nižší hodnoty, u β -karotenu tomu bylo právě naopak, hladiny ve sladu druhým rokem významně vzrostly.

Graf 23. Hladiny β -karotenu v ječmeni a ve sladu v závislosti na odrůdě



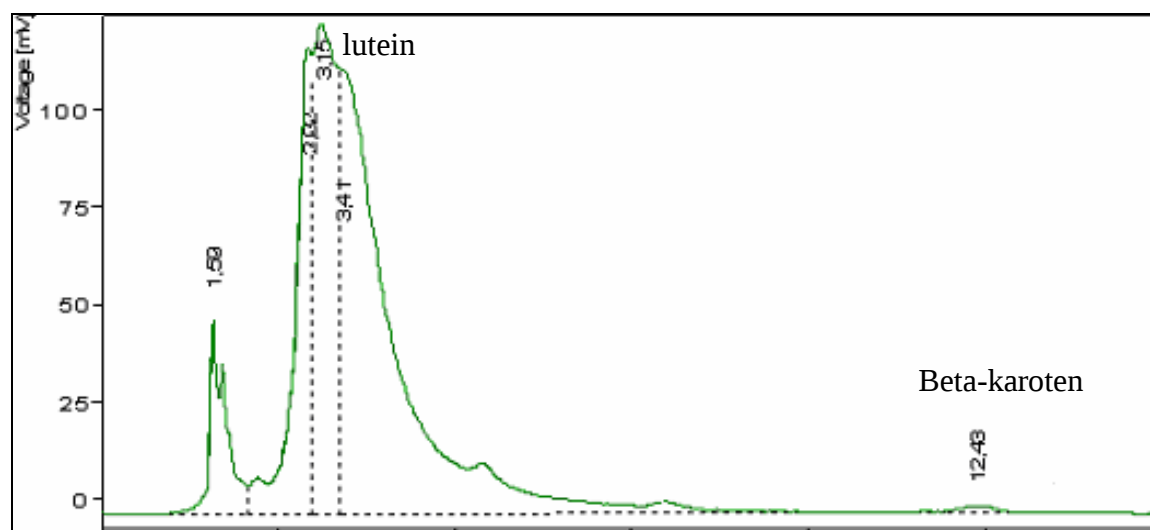
Graf 24. Hladiny β -karotenu v ječmeni a ve sladu v závislosti na lokalitě



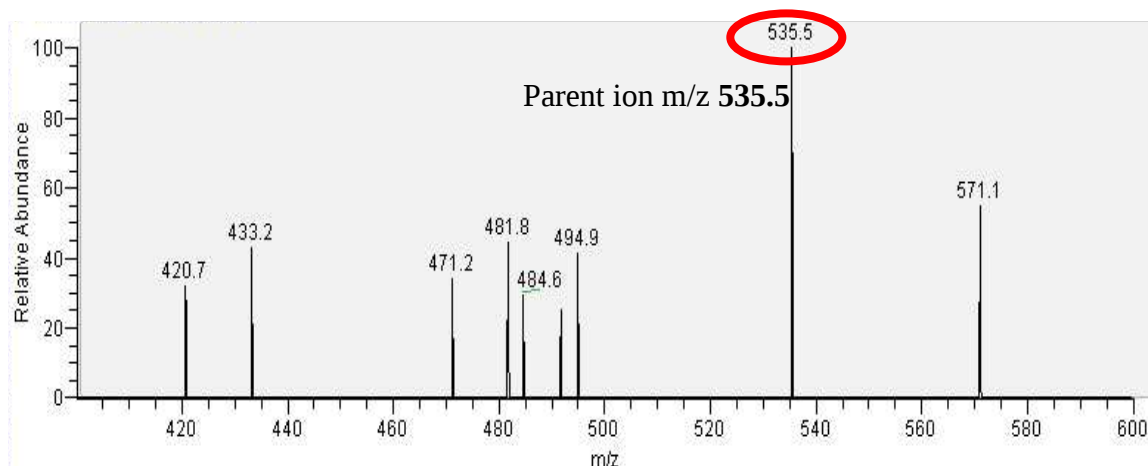
Analýza karotenoidů ve vybraných vzorcích sladu pomocí RP-HPLC/ESI-MS

MS analýza byla provedena off-line v záporném módu (obr. 35, 36). Nastavení parametrů hmotnostního spektrometru je shrnuto v kap. 4.3.8.2. Karotenoidy byly separovány pomocí RP-HPLC, frakce vzorků byly podle retenčních časů zachytávány a posléze aplikovány

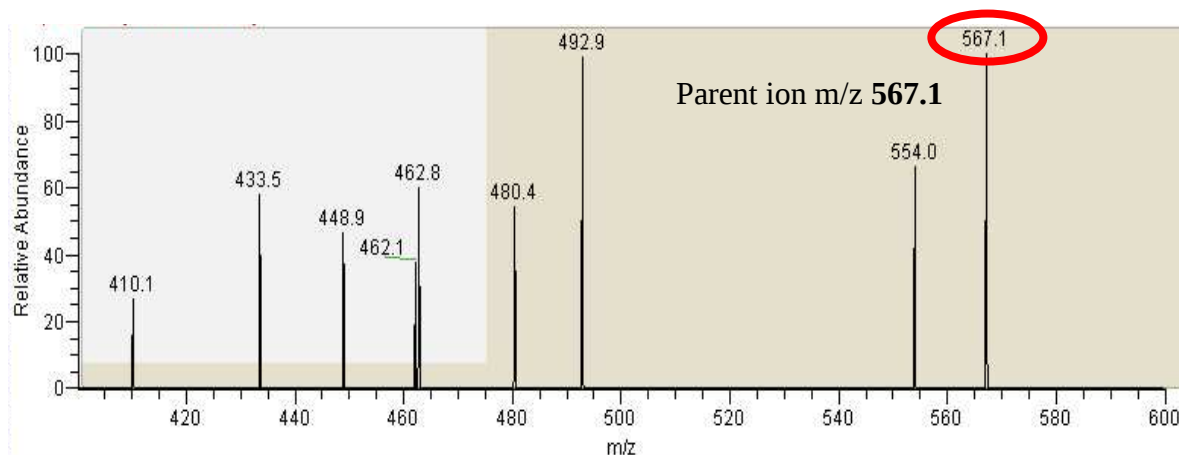
do detektoru jednorázově dávkovacím ventilem. Pro určení retenčních časů pro odebrání frakcí byla použita detekce UV-VIS (obr. 34).



Obr. 34. Chromatogram analýzy karotenoidů ve sladu RP-HPLC s UV-VIS detekcí



Obr. 35. MS spektrum β -karotenu



Obr. 36. MS spektrum luteinu

Ve vybraných a analyzovaných vzorcích sladu byly nalezeny nízké koncentrace luteinu i β -karotenu. Metoda RP-HPLC/MS-ESI se proto jeví jako vhodná k rozlišení a detekci jednotlivých karotenoidů v případě, že se ve vzorcích vyskytuje více analytů ve velmi nízkých koncentracích a nelze je pomocí HPLC rozlišit.

5.2.7. Stanovení lipoxygenasy v ječmeni a ve sladu

Analýza lipoxygenasy v ječmeni a ve sladu probíhala v rámci spolupráce s Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským v Brně. Řešená problematika je součástí Výzkumného záměru MŠMT a projektu NAZV MZE. Pro analýzu aktivity LOX bylo použito 20 vyšlechtěných odrůd ječmene odvozených od výše sledovaných 6 odrůd. Ze všech vzorků vyšlechtěných odrůd byl ve VÚPS vyroben slad za standardních podmínek (kap. 4.2.3.2.).

V dodaných vzorcích vyšlechtěných odrůd ječmene i v následně připraveném sladu byla stanovena aktivita enzymu LOX spektrofotometrickou metodou v UV oblasti optimalizovanou v předchozím roce řešení projektu (kap. 4.3.5.2.). Analýzy byly provedeny v čerstvě homogenizovaných vzorcích uchovávaných při 8°C. Veškeré analýzy byly provedeny v laboratořích FCH VUT v Brně.

Obsahy všech měřených parametrů byly přepočteny na sušinu za použití známé navážky a známého obsahu vody ve vzorku. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tab. 23.

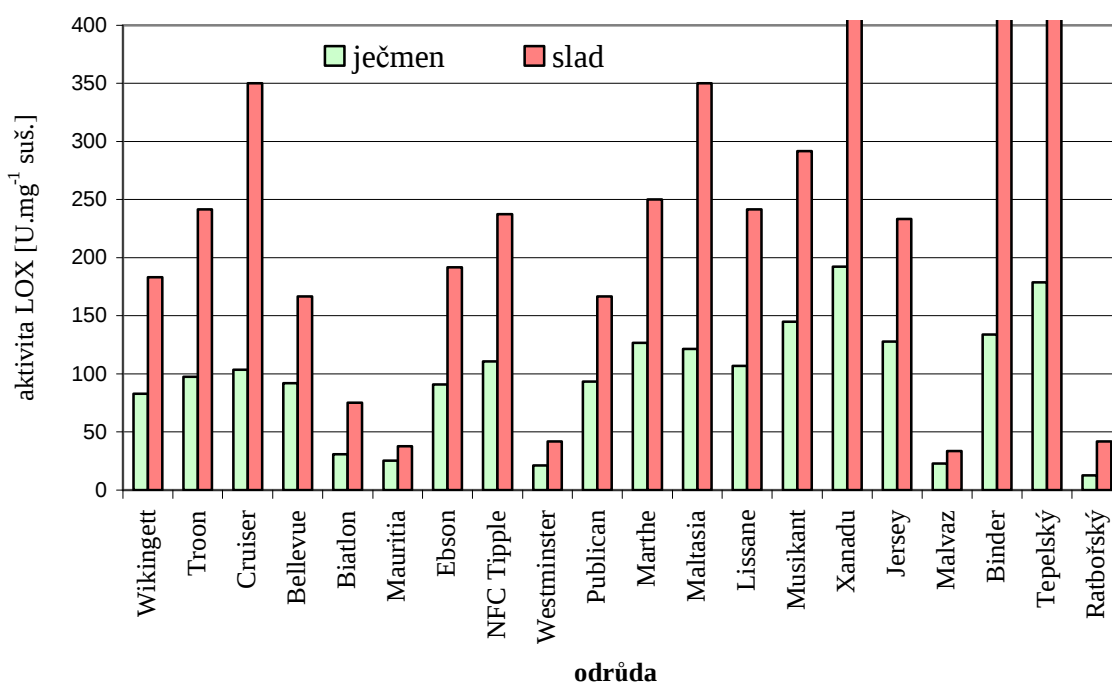
Tab. 23. Naměřené průměrné hodnoty aktivity LOX $\pm$ směrodatné odchylky aktivity v ječmeni a ve sladu

vzorek	odrůda	LOX v ječmeni [U.mg ⁻¹]	LOX ve sladu [U.mg ⁻¹]
1	Wikingett	82,7 $\pm$ 3,7	183,3 $\pm$ 6,7
2	Troon	97,3 $\pm$ 2,5	241,7 $\pm$ 15,3
3	Cruiser	103,5 $\pm$ 6,2	350,0 $\pm$ 14,8
4	Bellevue	92,0 $\pm$ 4,6	166,7 $\pm$ 9,9
5	Biatlon	30,7 $\pm$ 3,3	75,0 $\pm$ 4,5
6	Mauritia	25,3 $\pm$ 3,0	37,5 $\pm$ 1,7
7	Ebson	90,7 $\pm$ 4,3	191,7 $\pm$ 12,4
8	NFC Tipple	110,6 $\pm$ 7,5	237,5 $\pm$ 11,6
9	Westminster	21,3 $\pm$ 1,6	41,7 $\pm$ 3,2
10	Publican	93,3 $\pm$ 3,4	166,7 $\pm$ 13,0
11	Marthe	126,7 $\pm$ 6,4	250,0 $\pm$ 14,6
12	Maltasia	121,3 $\pm$ 7,6	350,0 $\pm$ 9,4
13	Lissane	106,7 $\pm$ 9,1	241,7 $\pm$ 8,9
14	Musikant	144,8 $\pm$ 12,3	291,7 $\pm$ 11,3
15	Xanadu	192,3 $\pm$ 13,8	550,0 $\pm$ 18,2
16	Jersey	127,7 $\pm$ 10,2	233,3 $\pm$ 7,4
17	Malvaz	22,9 $\pm$ 1,8	33,3 $\pm$ 2,6
18	Binder	133,9 $\pm$ 9,6	450,0 $\pm$ 16,6
19	Tepelský	178,7 $\pm$ 10,1	591,7 $\pm$ 17,9
20	Ratbořský	12,8 $\pm$ 1,3	41,7 $\pm$ 3,9

Jednotlivé vzorky ječmenů se lišily v hodnotě aktivity LOX poměrně značně, hodnoty kolísaly až v rozmezí 1 řádu. Nejvyšší aktivity enzymu byly nalezeny zejména ve vzorcích odrůd Xanadu, Binder, Musikant a dále Jersey a Marthe.

Slady z dodaných vzorků ječmene byly zpracovány standardní procedurou v laboratořích VÚPS. Aktivita lipoxygenázy ve sladu byla asi 2-3x vyšší než v ječmeni. Nejvyšší aktivita byla nalezena ve vzorcích odrůd Xanadu, Binder a Tepelský; relativně vysoká aktivita byla pozorována rovněž ve vzorcích Troon, Cruiser, Maltasia a Musikant. Porovnání hladin LOX pro jednotlivé odrůdy je znázorněno v grafu 25.

Graf 25. Hladiny LOX v ječmeni a ve sladu v závislosti na odrůdě



Slady připravené z ječmenů o vyšší aktivitě LOX obvykle obsahovaly rovněž vyšší aktivitu enzymu LOX, což je třeba zohlednit zejména při výběru odrůd pro další technologické zpracování.

5.3. Sledování složek antioxidačního komplexu v lidském organismu - klinická studie I

Ve druhé části práce byly ve spolupráci s oddělením klinické biochemie v Kyjově, privátní laboratoří Vetlab v Brně a s laboratoří speciálních analýz VÚPS v Brně provedeny dvě klinické studie zaměřené na změny hladin enzymových a neenzymových antioxidantů v lidském organismu v závislosti na příjmu vybraných esenciálních antioxidantů v potravě. Součástí práce bylo zavedení a optimalizace metod pro monitoring antioxidačního stavu organismu.

5.3.1. Popis klinického experimentu

Prvního klinického experimentu realizovaného v období říjen 2005 - červen 2006 se zúčastnilo celkem 38 osob. Popis souboru a skupiny jsou uvedeny v tab. 24.

Tab. 24. Soubor jedinců účastnících se experimentu

skupina	n	muži	ženy	věkový průměr	zdravotní stav
I	10	3	7	47 ± 10	hyperlipidemie
II	12	6	6	55 ± 6	mírná hypercholesterolemie
III	8	2	6	42 ± 11	bez vážnějších chorob
kontrolní	8	4	4	40 ± 9	bez vážnějších chorob

Klinický experiment byl realizován v období 8 měsíců. Jednotlivé fáze jsou znázorněny v tab. 25. V průběhu studie byla všem jedincům odebírána krev a sledován celkový metabolický stav prostřednictvím stanovení hladiny řady parametrů v separovaném krevním séru.

Tab. 25. Schéma klinické studie

Fáze	Odběry	Skupina I	Skupina II	Skupina III	Kontrolní skupina
1. fáze říjen – prosinec	01/2006	normální strava			
2. fáze leden – březen	04/2006	normální strava + vitamínový preparát			normální strava
3. fáze duben – červen	06/2006	normální strava			

V tab. 26 je uvedeno deklarované složení potravinového doplňku, který užívaly skupiny tři skupiny ve druhé fázi experimentu, vždy 3 kapsle denně. Účelem využití uvedeného potravinového doplňku bylo ověřit předpokládaný účinek polynenasycených mastných kyselin na regulaci metabolismu cholesterolu a triacylglycerolů. Tokoferol obsažený v kapslích má za úkol podporovat tuto regulaci úpravou oxidačního stavu a rovněž stabilizací samotných složek preparátu.

Tab. 26. Deklarované složení potravinového doplňku

Nature Bounty EPA (obsah 1 kapsle)	
Vitamin E	1,12 mg
Rybí olej	1000 mg
- z toho aktivní látky:	180 mg eikosapentaneové kyseliny
	120 mg dokosahexaneové kyseliny

Základní biochemické parametry byly analyzovány v laboratořích klinické biochemie v Kyjově pomocí akreditovaných metod. Stanovení celkové antioxidační aktivity bylo optimalizováno v rámci této práce a analyzováno pomocí automatizované metody Total Antioxidant Status (Randox Laboratories, UK). Nízkomolekulární antioxidanty byly analyzovány v laboratořích FCH VUT v Brně pomocí optimalizovaných metod založených na HPLC stanovení [145, 146]. V rámci této práce byly zavedeny a optimalizovány parametry oxidačního poškození proteinů (AGE, AOPP). V analyzovaných vzorcích byly stanoveny rovněž hladiny mastných kyselin optimalizovanými metodami realizovanými v laboratořích VÚPS v Brně.

5.3.2. Vyhodnocení biochemických parametrů

Základní biochemické parametry byly u všech skupin analyzovány v krevním séru v laboratoři klinické biochemie v nemocnici Kyjov za použití akreditovaných postupů. Přehled vyšetřovaných parametrů, fyziologických rozmezí a použitých metod je uveden v tab. 5 v kapitole 4.4.4.

V tab. 27 – 30 jsou u jednotlivých skupin uvedeny průměrné hodnoty a směrodatné odchylky průměrů metabolických parametrů, měřené v daném období. Hodnoty přesahující fyziologické rozmezí jsou znázorněny červeně, modrá barva označuje hodnoty pod fyziologickým rozmezím.

Tab. 27. Skupina I - hyperlipidemici

Parametr	Jednotky	01/2006	04/2006	06/2006
Glykovaný hemoglobin	%	3,3 ± 0,5	3,5 ± 0,4	3,3 ± 0,5
Močovina	mmol.l ⁻¹	5,20 ± 0,73	4,80 ± 0,99	5,07 ± 0,71
Kreatinin	μmol.l ⁻¹	71 ± 16	72 ± 11	74 ± 9
Kyselina močová	μmol.l ⁻¹	253 ± 77	249 ± 84	241 ± 74
Cholesterol celkový	mmol.l ⁻¹	7,54 ± 1,20	6,88 ± 1,25	6,28 ± 0,66
HDL cholesterol	mmol.l ⁻¹	1,64 ± 0,21	1,54 ± 0,33	1,49 ± 0,27
LDL cholesterol	mmol.l ⁻¹	4,78 ± 0,49	4,45 ± 0,99	4,42 ± 0,59
Triacylglyceroly	mmol.l ⁻¹	2,90 ± 1,79	1,85 ± 0,96	1,83 ± 0,93
Aterogenní index	-	3,67 ± 0,98	3,65 ± 1,22	3,37 ± 0,93
Apolipoprotein A	g.l ⁻¹	1,54 ± 0,14	1,65 ± 0,29	1,68 ± 0,20
Apolipoprotein B	g.l ⁻¹	1,41 ± 0,27	1,35 ± 0,26	1,19 ± 0,15
Index ApoA/ApoB	-	1,13 ± 0,25	1,28 ± 0,35	1,45 ± 0,28
Albumin	g.l ⁻¹	38,2 ± 3,5	38,7 ± 3,6	38,1 ± 3,8
Celková antioxidační kapacita	mmol.l ⁻¹	1,57 ± 0,12	1,67 ± 0,12	1,57 ± 0,08

Tab. 28. Skupina II - hypercholesterolemici

Parametr	Jednotky	01/2006	04/2006	06/2006
Glykovaný hemoglobin	%	3,2 ± 0,8	3,5 ± 0,7	3,4 ± 0,8
Močovina	mmol.l ⁻¹	4,46 ± 0,67	4,78 ± 1,02	5,32 ± 1,24
Kreatinin	μmol.l ⁻¹	72 ± 16	73 ± 13	78 ± 16
Kyselina močová	μmol.l ⁻¹	262 ± 59	292 ± 77	289 ± 96
Cholesterol celkový	mmol.l ⁻¹	5,86 ± 0,45	5,57 ± 0,88	5,44 ± 0,83
HDL cholesterol	mmol.l ⁻¹	1,46 ± 0,32	1,46 ± 0,26	1,37 ± 0,22
LDL cholesterol	mmol.l ⁻¹	3,55 ± 0,48	3,33 ± 0,76	3,58 ± 0,68
Triacylglyceroly	mmol.l ⁻¹	2,32 ± 0,84	1,72 ± 1,05	1,59 ± 0,87
Aterogenní index	-	3,22 ± 1,07	2,96 ± 1,01	3,10 ± 0,96
Apolipoprotein A	g.l ⁻¹	1,46 ± 0,20	1,66 ± 0,22	1,62 ± 0,21
Apolipoprotein B	g.l ⁻¹	1,09 ± 0,17	1,05 ± 0,26	1,00 ± 0,20
Index ApoA/ApoB	-	1,40 ± 0,44	1,64 ± 0,69	1,72 ± 0,65
Albumin	g.l ⁻¹	38,6 ± 2,1	40,0 ± 1,8	39,1 ± 1,9
Celková antioxidační kapacita	mmol.l ⁻¹	1,79 ± 0,44	1,72 ± 0,13	1,67 ± 0,09

Tab. 29. Skupina III – zdraví jedinci

Parametr	Jednotky	01/2006	04/2006	06/2006
Glykovaný hemoglobin	%	2,7 ± 0,4	2,9 ± 0,4	2,8 ± 0,3
Močovina	mmol.l ⁻¹	4,46 ± 0,67	4,07 ± 1,26	4,27 ± 0,71
Kreatinin	μmol.l ⁻¹	64 ± 10	70 ± 8	67 ± 10
Kyselina močová	μmol.l ⁻¹	199 ± 51	226 ± 49	212 ± 48
Cholesterol celkový	mmol.l ⁻¹	4,54 ± 0,34	4,70 ± 0,76	4,51 ± 0,77
HDL cholesterol	mmol.l ⁻¹	1,56 ± 0,20	1,48 ± 0,22	1,43 ± 0,15
LDL cholesterol	mmol.l ⁻¹	2,87 ± 0,60	2,78 ± 0,68	2,90 ± 0,75
Triacylglyceroly	mmol.l ⁻¹	1,04 ± 0,39	0,90 ± 0,38	0,92 ± 0,36
Aterogenní index	-	1,96 ± 0,37	2,19 ± 0,50	2,18 ± 0,60
Apolipoprotein A	g.l ⁻¹	1,41 ± 0,13	1,60 ± 0,15	1,58 ± 0,11
Apolipoprotein B	g.l ⁻¹	0,80 ± 0,13	0,83 ± 0,15	0,77 ± 0,15
Index ApoA/ApoB	-	1,83 ± 0,38	2,00 ± 0,45	2,13 ± 0,43
Albumin	g.l ⁻¹	39,2 ± 2,1	39,5 ± 2,4	39,8 ± 3,0
Celková antioxidační kapacita	mmol.l ⁻¹	1,53 ± 0,08	1,63 ± 0,10	1,58 ± 0,10

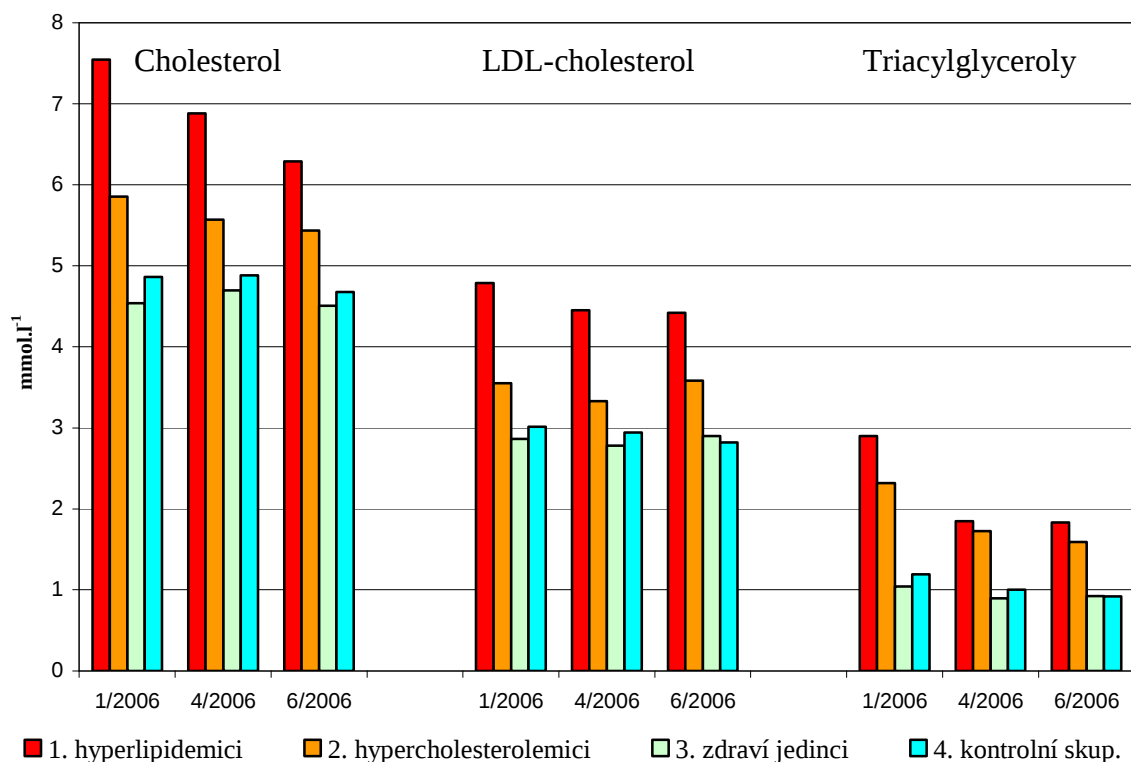
Tab. 30. Skupina IV – kontrolní skupina

Parametr	Jednotky	01/2006	04/2006	06/2006
Glykovaný hemoglobin	%	2,6 ± 0,3	2,8 ± 0,4	2,8 ± 0,2
Močovina	mmol.l ⁻¹	3,83 ± 0,82	4,05 ± 0,81	4,09 ± 0,70
Kreatinin	μmol.l ⁻¹	66 ± 11	66 ± 13	76 ± 9
Kyselina močová	μmol.l ⁻¹	223 ± 57	212 ± 77	202 ± 66
Cholesterol celkový	mmol.l ⁻¹	5,26 ± 0,49	5,08 ± 0,49	4,68 ± 0,55
HDL cholesterol	mmol.l ⁻¹	1,60 ± 0,32	1,50 ± 0,22	1,46 ± 0,13
LDL cholesterol	mmol.l ⁻¹	3,02 ± 0,56	2,94 ± 0,44	2,82 ± 0,52
Triacylglyceroly	mmol.l ⁻¹	1,19 ± 0,30	1,00 ± 0,09	0,92 ± 0,17
Aterogenní index	-	2,42 ± 0,78	2,47 ± 0,63	2,23 ± 0,55
Apolipoprotein A	g.l ⁻¹	1,67 ± 0,21	1,60 ± 0,21	1,58 ± 0,15
Apolipoprotein B	g.l ⁻¹	1,05 ± 0,15	0,89 ± 0,10	0,89 ± 0,12
Index ApoA/ApoB	-	1,63 ± 0,36	1,82 ± 0,33	1,82 ± 0,36
Albumin	g.l ⁻¹	40,0 ± 4,5	40,1 ± 4,3	42,1 ± 2,7
Celková antioxidační kapacita	mmol.l ⁻¹	1,53 ± 0,14	1,50 ± 0,14	1,31 ± 0,09

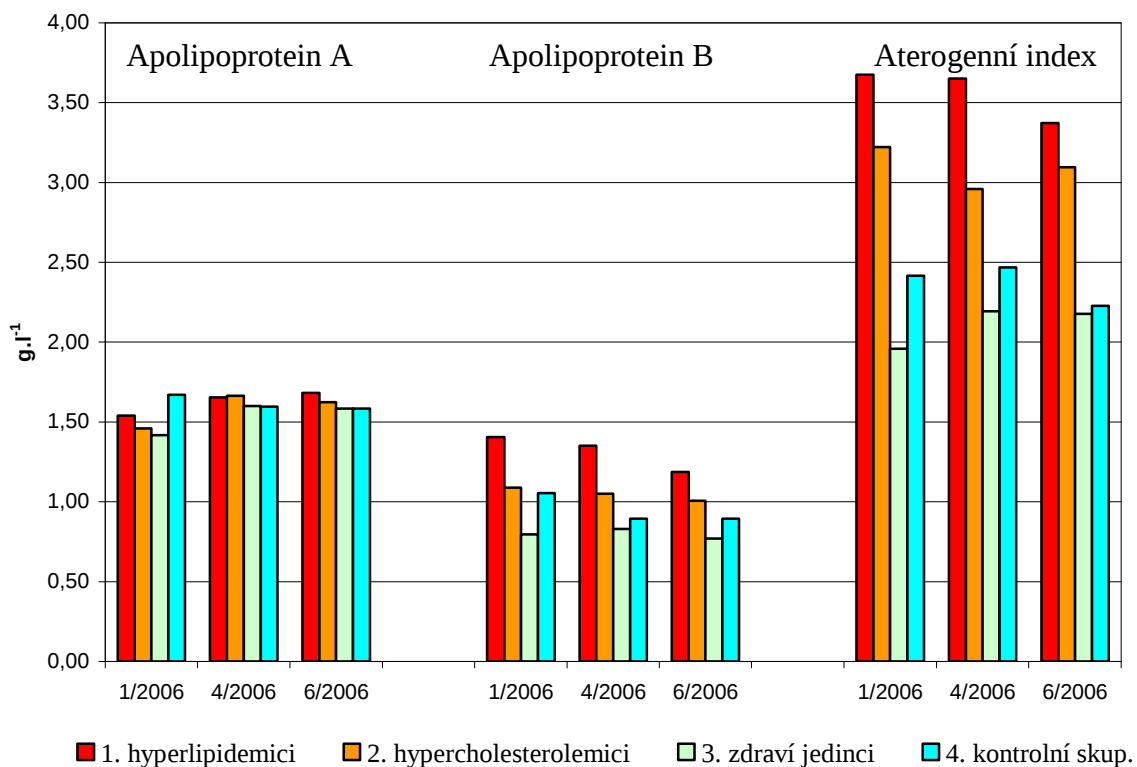
Po tříměsíční suplementaci potravinovým doplňkem došlo k signifikantnímu poklesu hladin cholesterolu, LDL i triacylglycerolů u jedinců s hyperlipidemií. U jedinců s cholesterolemií došlo k výraznému poklesu hladin triacylglycerolů, ostatní parametry vykazovaly pouze mírný pokles. U zdravých jedinců a kontrolní skupiny nedošlo k výrazným změnám. S výsledky základních lipidových parametrů korespondují i vyšetření apolipoproteinů. Došlo k mírnému poklesu hladin apolipoproteinu B, který koreluje s vyšetřením LDL-cholesterolu, a rovněž k poklesu indexu ukazujícímu zvýšené riziko vzniku aterosklerosy.

Podávaný potravinový doplněk obsahuje vysoké množství PUFA a tokoferolu; ze získaných výsledků je patrné, že kombinovaný efekt PUFA přes prostaglandinovou dráhu a antioxidantu prostřednictvím regulace oxidačního stavu je schopen účinně a pozitivně ovlivnit hladinu lipidů v organismu.

Graf 26. Změny hladin lipidových parametrů během daného období



Graf 27. Změny hladin apolipoproteinů a aterogenního indexu během daného období



5.3.3. Vyhodnocení nízkomolekulárních antioxidantů

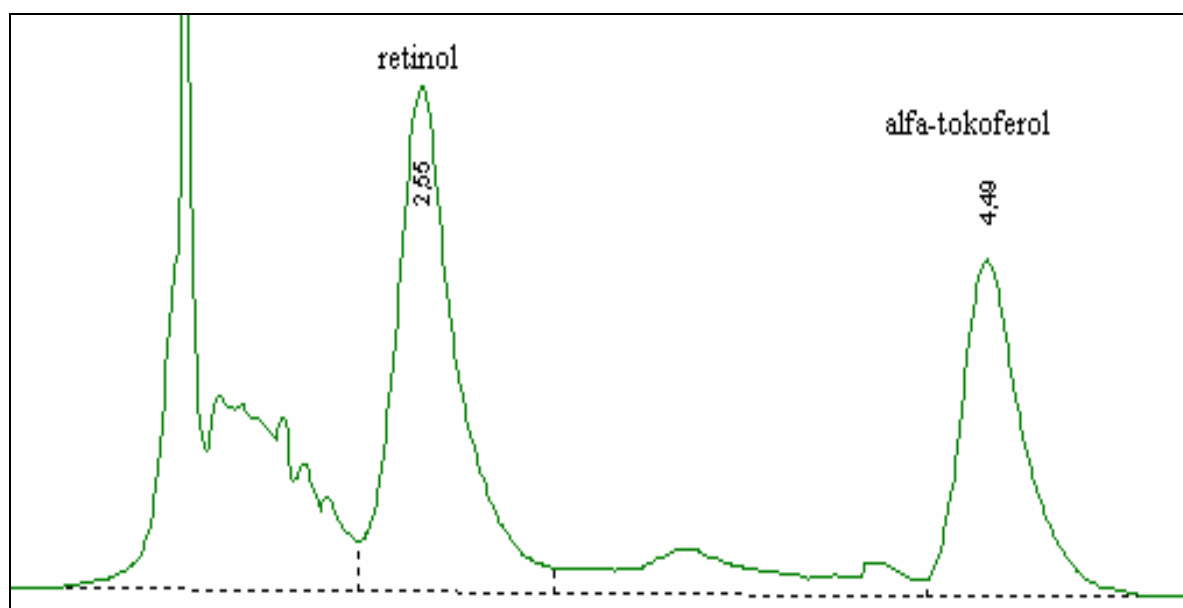
Měření hladin retinolu, α -tokoferolu a karotenoidů probíhalo metodou RP-HPLC s VIS detekcí a programovanou změnou vlnové délky (kap. 4.3.8.1.). Kvantitativní vyhodnocení jednotlivých analytů bylo provedeno pomocí externí kalibrace s použitím vybraných standardů.

V tab. 31 jsou uvedeny hodnoty naměřených nízkomolekulárních antioxidantů během sledovaného období.

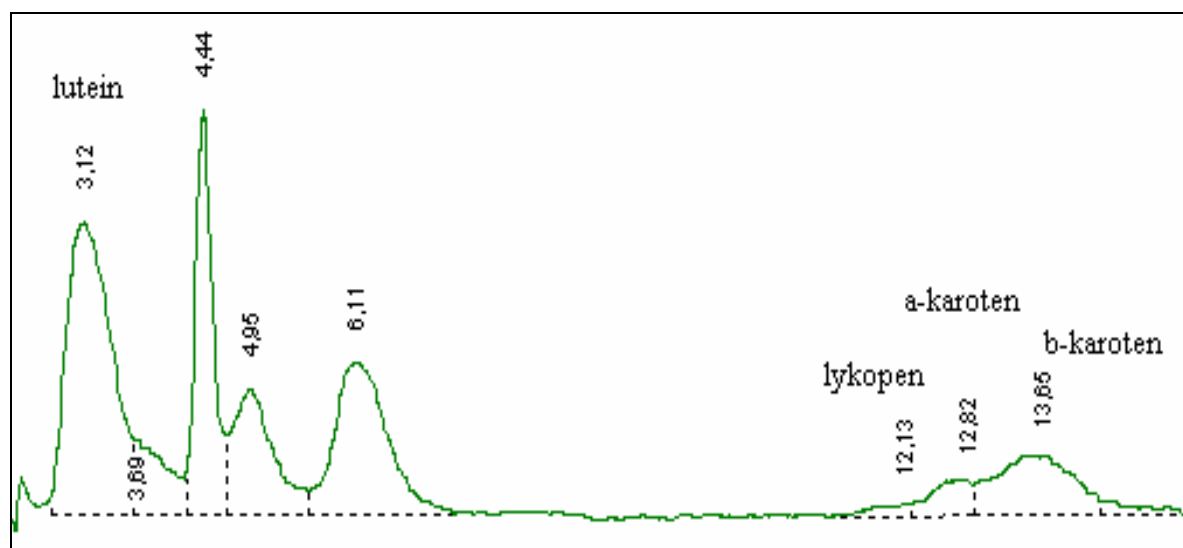
Tab. 31. Naměřené hladiny nízkomolekulárních antioxidantů

Skup.	analyt ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	01/2006	04/2006	06/2006
I	retinol	$4,90 \pm 2,63$	$12,00 \pm 7,46$	$3,23 \pm 0,89$
	α -tokoferol	$40,59 \pm 9,69$	$64,94 \pm 11,65$	$18,51 \pm 5,78$
	lutein	$1,07 \pm 0,38$	$0,92 \pm 0,29$	$1,23 \pm 0,34$
	lykopen	$1,00 \pm 0,52$	$0,62 \pm 0,48$	$0,71 \pm 0,58$
	α -karoten	$0,27 \pm 0,17$	$0,15 \pm 0,12$	$0,25 \pm 0,25$
	β -karoten	$0,69 \pm 0,48$	$0,43 \pm 0,31$	$0,67 \pm 0,71$
II	retinol	$3,97 \pm 1,78$	$6,55 \pm 2,43$	$2,91 \pm 0,62$
	α -tokoferol	$26,83 \pm 7,16$	$46,41 \pm 10,87$	$17,51 \pm 5,53$
	lutein	$0,97 \pm 0,36$	$1,26 \pm 0,66$	$1,01 \pm 0,28$
	lykopen	$0,97 \pm 0,74$	$0,50 \pm 0,62$	$0,69 \pm 0,49$
	α -karoten	$0,25 \pm 0,13$	$0,13 \pm 0,17$	$0,20 \pm 0,16$
	β -karoten	$0,66 \pm 0,38$	$0,52 \pm 0,71$	$0,51 \pm 0,37$
III	retinol	$4,12 \pm 2,73$	$6,28 \pm 2,26$	$2,28 \pm 0,90$
	α -tokoferol	$27,55 \pm 9,52$	$49,89 \pm 11,86$	$11,59 \pm 3,09$
	lutein	$1,10 \pm 0,39$	$0,79 \pm 0,27$	$0,95 \pm 0,28$
	lykopen	$0,78 \pm 0,32$	$0,45 \pm 0,24$	$0,64 \pm 0,43$
	α -karoten	$0,25 \pm 0,11$	$0,11 \pm 0,06$	$0,13 \pm 0,09$
	β -karoten	$0,62 \pm 0,37$	$0,66 \pm 0,31$	$0,57 \pm 0,36$
IV	retinol	$7,02 \pm 3,50$	$3,60 \pm 0,78$	$9,77 \pm 1,99$
	α -tokoferol	$33,34 \pm 8,52$	$16,18 \pm 2,04$	$46,99 \pm 12,26$
	lutein	$0,87 \pm 0,13$	$0,61 \pm 0,09$	$1,13 \pm 0,18$
	lykopen	$0,25 \pm 0,06$	$0,36 \pm 0,41$	$0,69 \pm 0,65$
	α -karoten	$0,11 \pm 0,04$	$0,11 \pm 0,04$	$0,23 \pm 0,14$
	β -karoten	$0,28 \pm 0,03$	$0,23 \pm 0,14$	$0,58 \pm 0,20$

Během několikaměsíčního užívání preparátu došlo k významnému nárůstu hladin retinolu a α -tokoferolu u všech suplementovaných skupin. U kontrolní skupiny je možno pozorovat opačný efekt – k nárůstu došlo až v posledním sledovaném období.

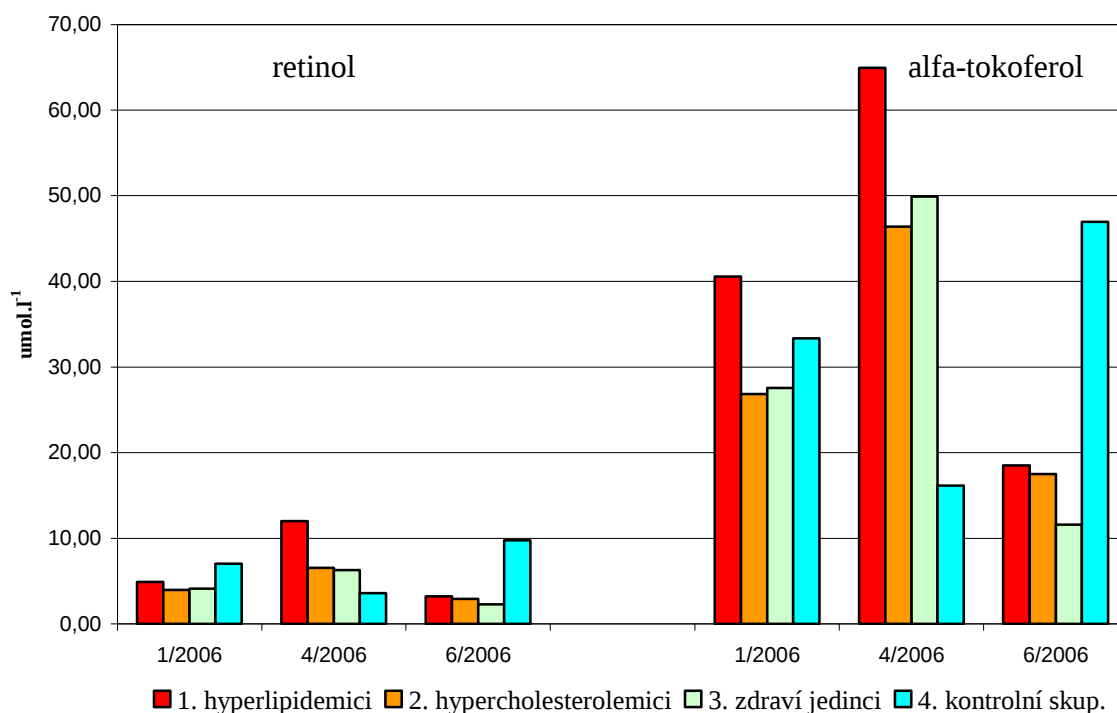


Obr. 37. Chromatogram analýzy retinolu a α -tokoferolu v lidském séru

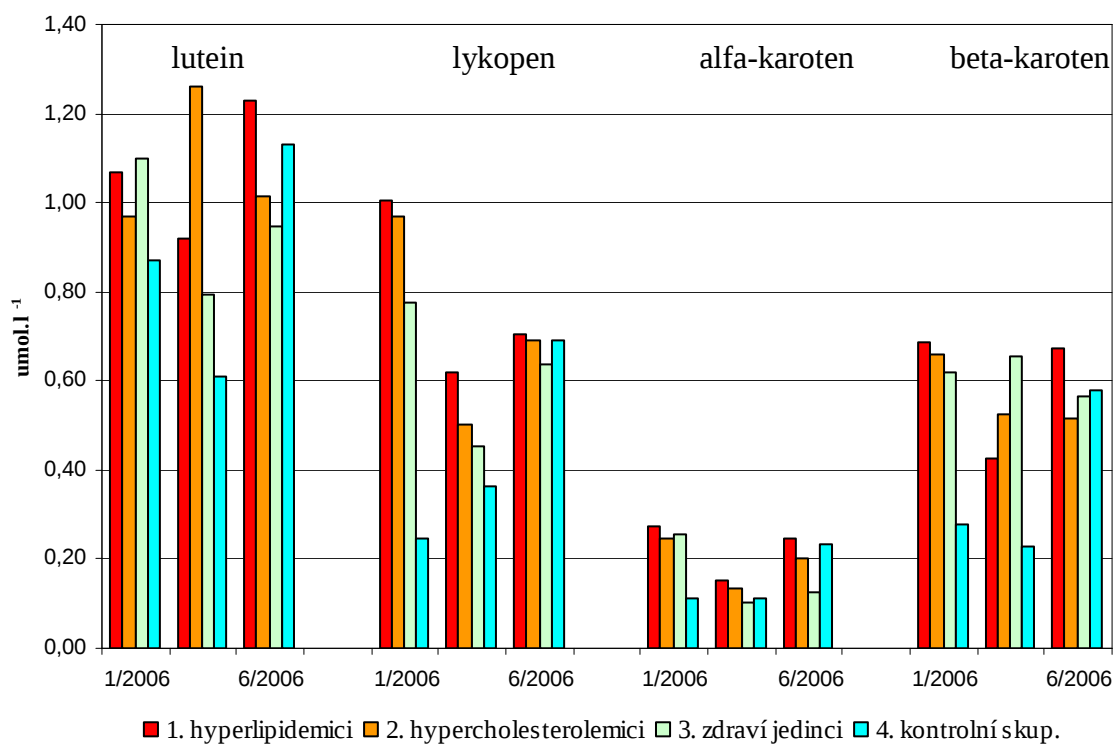


Obr. 38. Chromatogram analýzy karotenoidů v lidském séru

Graf 28. Změny hladin retinolu a alfa-tokoferolu během daného období



Graf 29. Změny hladin karotenoidů během daného období



Hladiny nízkomolekulárních antioxidantů jsou považovány spíše za monitoring jejich příjmu a jen nepřímo vypovídají o aktivitě antioxidačního komplexu. Nicméně, i ty antioxidanty, které nebyly obsaženy v podávaném preparátu, byly postupně zvýšeny – je tedy možné, že při dodání některých složek antioxidačního komplexu se jiné složky s podobným účinkem (př. membránové antioxidanty) vyčerpávají pomaleji, což se projeví jejich vyššími hladinami v extraktu séra. Antioxidační komplex funguje zřejmě jako dobře organizovaná a regulovaná metabolická síť.

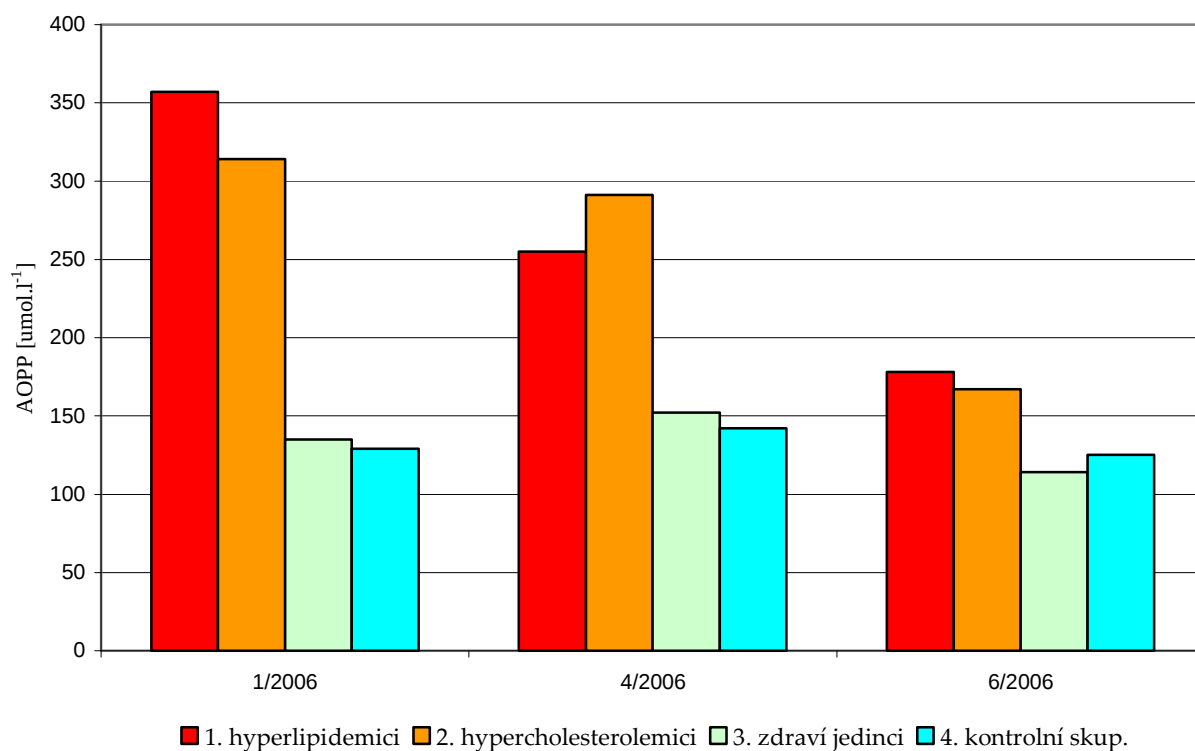
5.3.4. Vyhodnocení produktů glykace a oxidace proteinů

V tab. 32 jsou uvedeny hodnoty získané analýzou produktů pokročilé oxidace proteinů a produktů pokročilé glykace (kap. 4.3.7.). Z výsledků je patrný významný rozdíl hladin mezi jednotlivými skupinami. Skupiny I a II, tedy rizikové skupiny, mají signifikantně vyšší hladiny produktů oxidace proteinů, nežli skupiny zdravých jedinců. Během období suplementace dochází k výraznému poklesu hladin AOPP u prvních dvou skupin. Skupiny zdravých jedinců a kontrolní významné změny nevykazují. Při sledování hladin produktů pokročilé glykace AGE dochází rovněž u prvních dvou skupin k mírnému poklesu během sledovaného období.

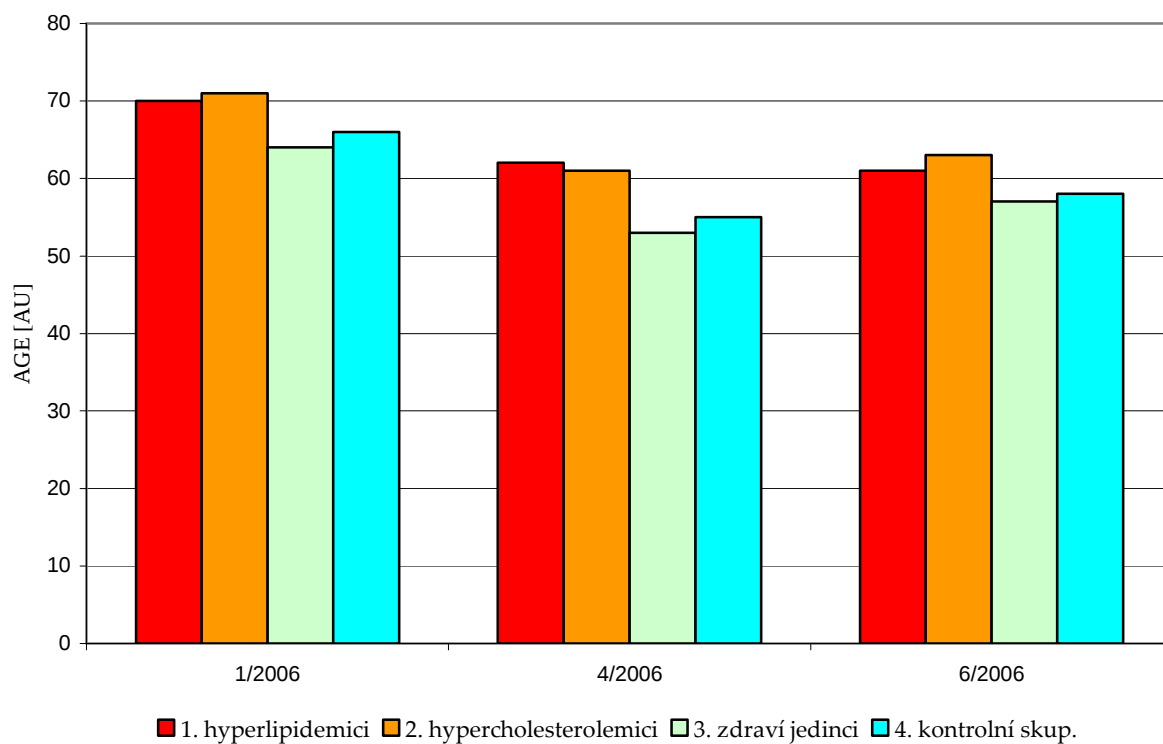
Tab. 32. Naměřené hodnoty AGEs a AOPP

skupina	parametr [jednotky]	01/2006	04/2006	06/2006
I	AOPP [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	357 ± 19	255 ± 11	178 ± 14
	AGE [AU]	70 ± 6	62 ± 7	61 ± 4
II	AOPP [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	314 ± 20	291 ± 23	167 ± 19
	AGE [AU]	71 ± 4	61 ± 7	63 ± 8
III	AOPP [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	135 ± 13	152 ± 17	114 ± 13
	AGE [AU]	64 ± 6	53 ± 6	57 ± 9
IV	AOPP [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	129 ± 10	142 ± 12	125 ± 9
	AGE [AU]	66 ± 4	55 ± 4	58 ± 5

Graf 30. Změny hodnot AOPP během daného období



Graf 31. Změny hodnot AGE během daného období



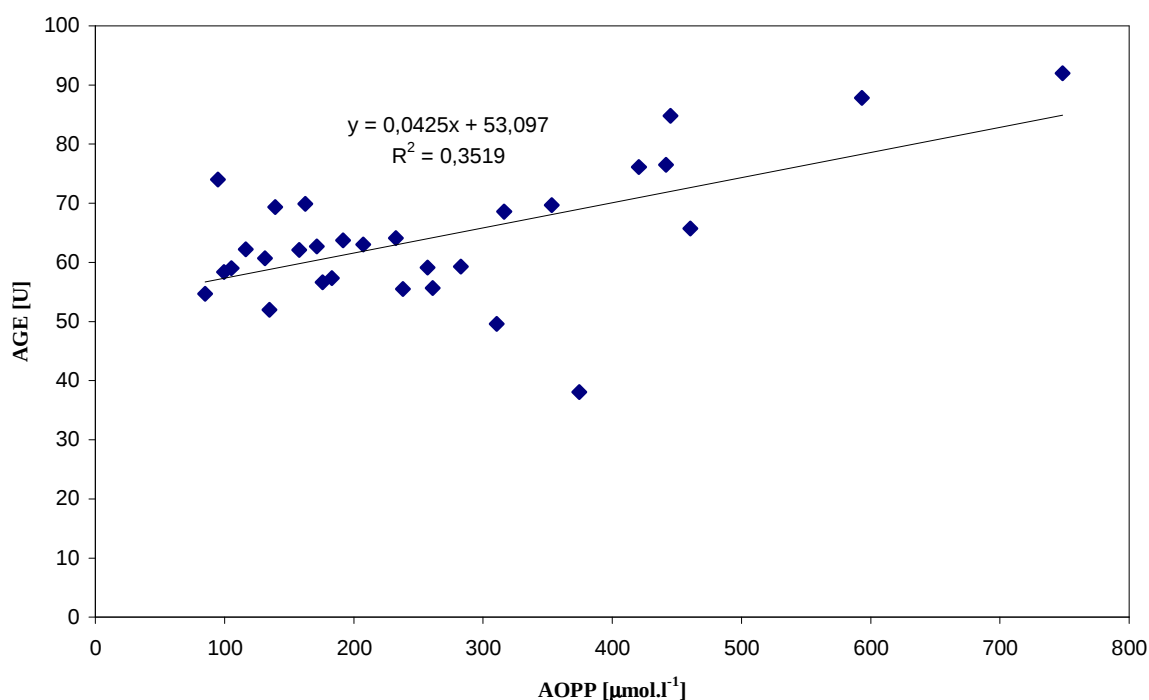
Při porovnávání výsledků byla nalezena slabá kladná korelace ($r = 0,59$) mezi AOPP a AGE u skupiny jedinců s hyperlipidemií; u ostatních skupin jedinců tyto parametry korelaci nevykazovaly.

Výsledky AGE byly u všech skupin testovaných subjektů srovnány s hladinami glykovaného hemoglobinu, avšak v žádné skupině hodnoty nekorelovaly. Rovněž nebyla zaznamenána žádná korelace mezi celkovou antioxidační kapacitou a množstvím glykovaných či oxidovaných produktů.

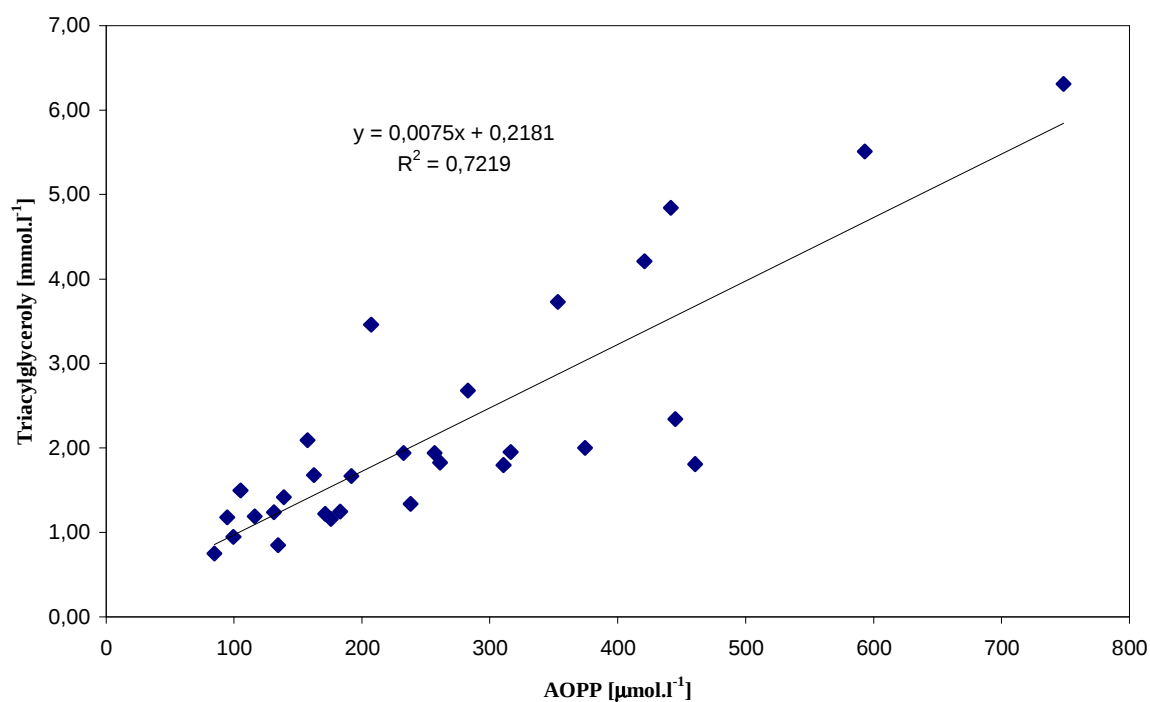
U pozorované skupiny hyperlipidemiků byla zaznamenána slabá kladná korelace celkového cholesterolu a AOPP ($r = 0,56$) i AGE ($r = 0,50$) a signifikantní korelace triacylglycerolů s oběma metodami AOPP ($r = 0,85$) i AGE ($r = 0,69$) na hladině významnosti 0,05.

Výsledky parametrů nepřímo charakterizujících oxidační stav organismu svědčí opět o pozitivní roli podávaného vitaminového preparátu zejména u jedinců s hyperlipidemií a o propojení metabolismu lipidů a mechanismů regulace oxidačních procesů.

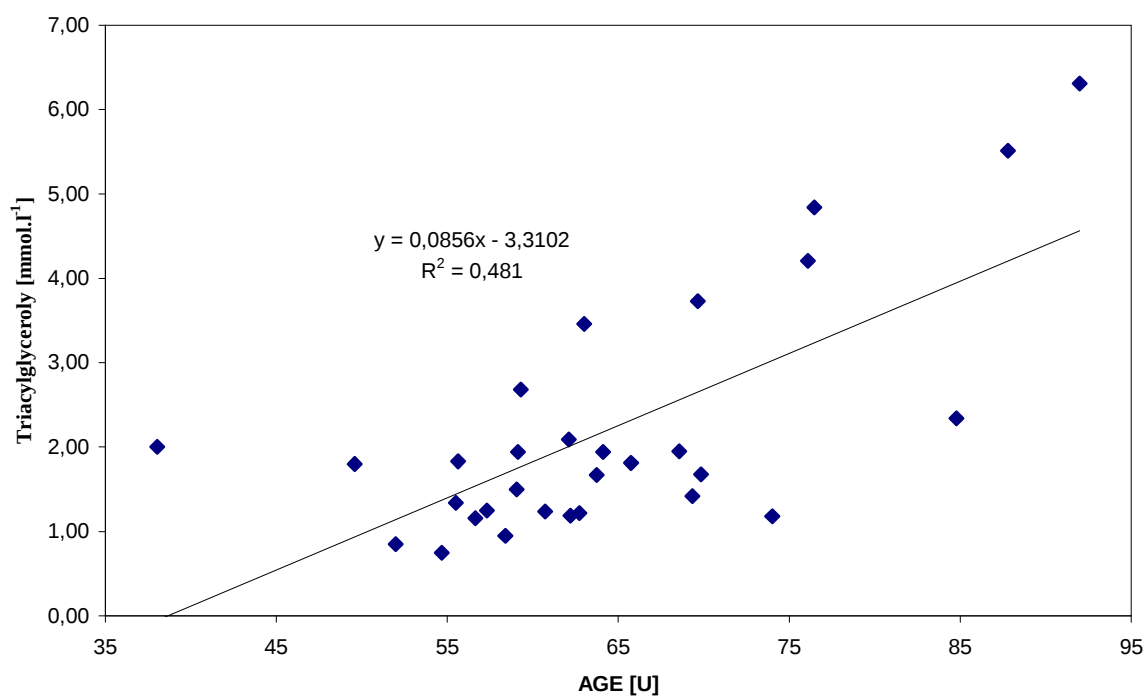
Graf 32. Korelace mezi AOPP a AGE ve skupině hyperlipidemiků



Graf 33. Korelace mezi AOPP a triacylglyceroly ve skupině hyperlipidemiků

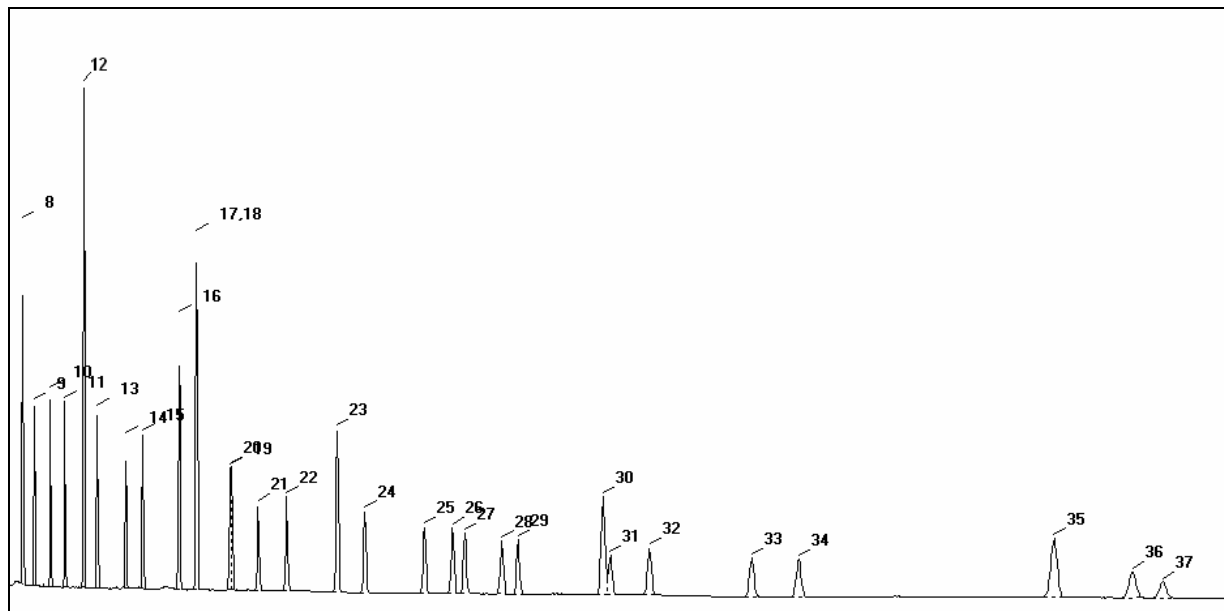


Graf 34. Korelace mezi AGE a triacylglyceroly ve skupině hyperlipidemiků



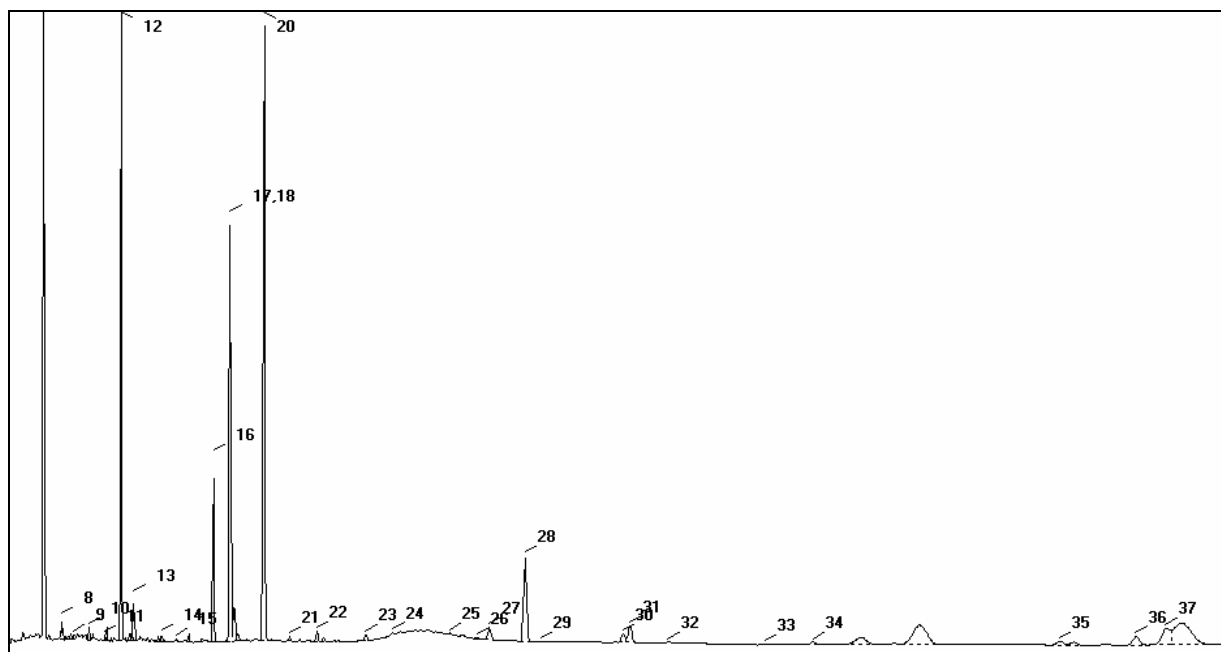
5.3.5. Vyhodnocení analýz mastných kyselin v séru

Analýza mastných kyselin v séru probíhala ve spolupráci s Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským v Brně (kap. 4.3.10.). Ve vzorcích bylo pomocí směšného standardu identifikováno 30 mastných kyselin. Chromatogram analýzy standardu je znázorněn na obr. 39. s identifikací jednotlivých píků. Chromatogram analýzy reálného vzorku séra je znázorněn na obr. 40.



Obr. 39. Chromatogram analýzy směšného standardu mastných kyselin

č. píku	mastná kyselina	č. píku	mastná kyselina
8	Myristic acid	24	cis-11-Eicosenoic acid
9	Myristoleic acid	25	cis-11,14-Eicosadienoic acid
10	Pentadecanoic acid	26	cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid
11	cis-10-Pentadecenoic acid	27	Heneicosanoic acid
12	Palmitic acid	28	cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid
13	Palmitoleic acid	29	Arachidonic acid
14	Heptadecanoic acid	30	cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid
15	cis-10-Heptadecenoic acid	31	Behenic acid
16	Stearic acid	32	Erucic Acid
17,18	Oleic acid, Elaidic acid	33	cis-13,16-Docosadienoic acid
19	Linolelaidic acid	34	Tricosanoic acid
20	Linoleic acid	35	Lignoceric acid
21	γ -Linolenic acid	36	cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid
22	Linolenic acid	37	Nervonic acid
23	Arachidic acid		



Obr. 40. Chromatogram analýzy mastných kyselin v lidském séru

V tab. 33. jsou uvedeny naměřené průměrné hodnoty sumy mastných kyselin, v tab. 34. jsou uvedeny průměrné hodnoty nasycených mastných kyselin.

Tab. 33. Celkový obsah mastných kyselin během uvedeného období

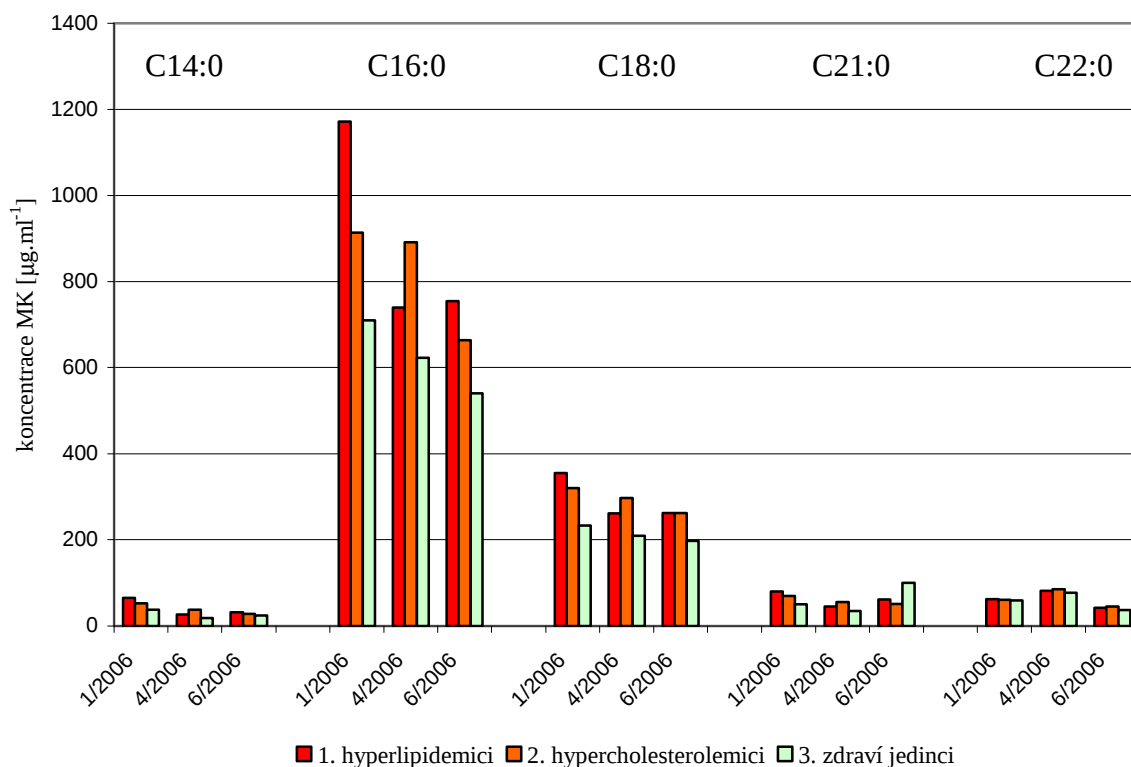
Suma MK [$\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$]	01/2006	04/2006	06/2006
Skupina I	4410,44	3051,01	2925,21
Skupina II	3535,56	3678,09	2686,34
Skupina III	2771,41	2853,51	2238,99

Tab. 34. Přehled průměrných hodnot nasycených mastných kyselin v séru během uvedeného období

Skup.	období	Nasycené mastné kyseliny [$\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$]				
		C14:0	C16:0	C18:0	C21:0	C22:0
I	01/2006	65,39	1171,63	355,02	79,77	62,41
	04/2006	26,74	739,31	261,65	45,35	81,26
	06/2006	32,02	754,48	261,89	61,90	42,74
II	01/2006	52,80	913,38	320,14	70,37	61,24
	04/2006	37,97	891,05	296,94	55,63	84,86
	06/2006	28,57	663,37	262,42	51,67	45,60
III	01/2006	37,75	709,66	233,19	50,99	59,93
	04/2006	18,65	622,80	208,89	34,88	76,71
	06/2006	24,68	540,64	196,98	99,77	37,50

Podle vyhodnocených výsledků měla největší zastoupení v lidském séru nasycená kyselina palmitová (C16:0) spolu s kyselinou stearovou (C18:0). Během sledovaného období došlo u všech skupin k výraznému poklesu hladin kyseliny palmitové. U kyseliny stearové byl rovněž zaznamenán mírný pokles hladin.

Graf 35. Průměrné hodnoty hlavních nasycených kyselin během uvedeného období



Tab. 35. Přehled průměrných hodnot nenasycených mastných kyselin v séru během uvedeného období

Skup.	období	Nenasycené mastné kyseliny [µg.ml ⁻¹]					
		C16:1	C18:1	C18:2	C20:x	C22:6	C24:1
I	01/2006	86,39	921,44	1079,63	298,43	50,71	82,89
	04/2006	42,16	521,56	782,46	250,74	55,43	135,90
	06/2006	49,53	515,17	697,16	260,70	56,69	89,16
II	01/2006	70,70	684,82	831,54	266,60	44,29	93,14
	04/2006	71,03	714,80	896,51	300,04	47,31	145,62
	06/2006	45,83	486,67	643,57	241,85	45,38	77,45
III	01/2006	48,51	482,22	688,21	192,15	35,06	68,55
	04/2006	37,88	498,65	827,87	229,37	41,82	143,28
	06/2006	31,02	363,70	563,90	194,11	35,83	61,41

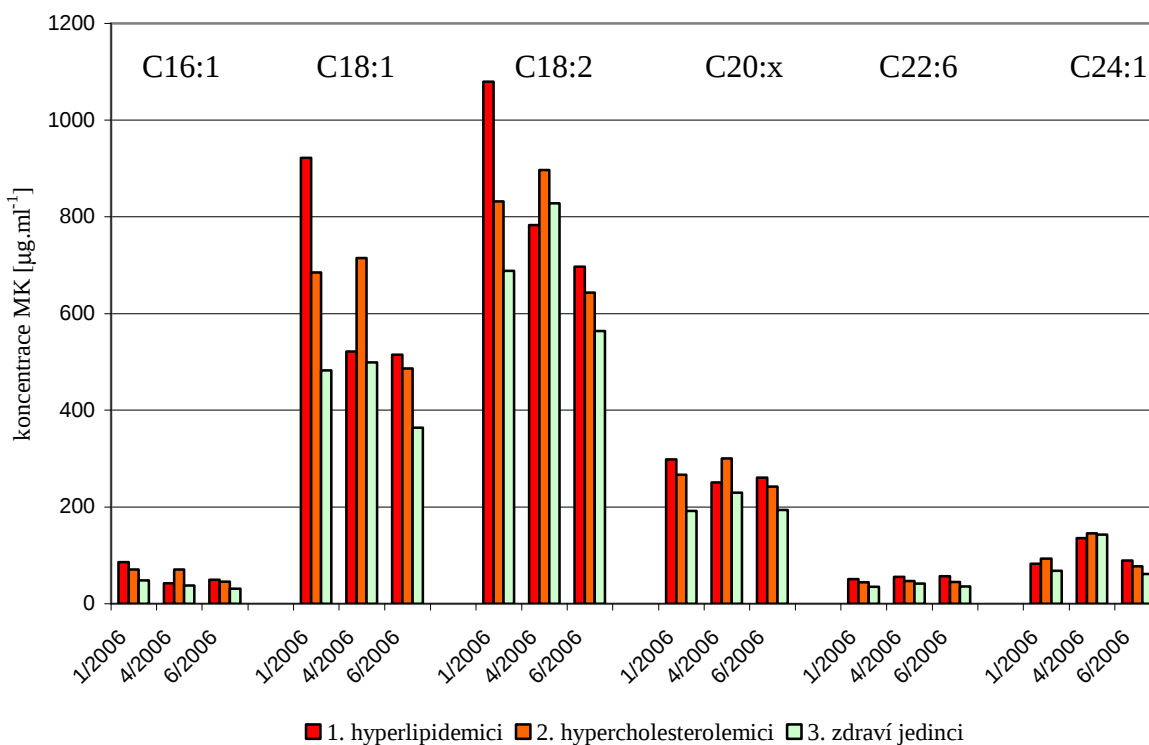
Pozn.: Hodnoty s označením C20:x tvoří sumu C₂₀ polyenových mastných kyselin, souhrnně označovaných jako eikosanoidy.

Mezi nenasycenými mastnými kyselinami v lidském séru měla největší zastoupení kyselina linolová (C18:2 ω6) a kyselina olejová (C18:1 ω9). Během sledovaného období došlo u skupiny jedinců s hyperlipidemií k poklesu hladiny kyseliny linolové, U skupiny zdravých jedinců a jedinců s hypercholesterolemií došlo po tříměsíční suplementaci potravinovým doplňkem EPA k nárůstu hladin a posléze po vysazení preparátu k jejich opětovnému poklesu. Podobné změny je možno nalézt i u kyseliny olejové, stejně jako u eikosanoidů.

Mírné zvýšení hladin kyseliny dokosahexaneové (C22:6 ω3) lze po tříměsíčním podávání nalézt ve všech analyzovaných skupinách; tato kyselina se vyskytuje v rybím tuku, který byl hlavní složkou suplementovaného preparátu, po skončení užívání se hladina ustálila na původní hodnotě.

Po podávání preparátu byl zaznamenán výrazný nárůst kyseliny nervonové (C24:1 ω9) ve všech suplementovaných skupinách. Tato kyselina se nachází v cerebrosidech a její nízká hladina bývá indikována u pacientů s roztroušenou sklerosou [147].

Graf 36. Průměrné hodnoty hlavních nenasycených kyselin během uvedeného období



Výsledky analýz ukazují, že suplementace potravinovým doplňkem EPA obsahujícím polynenasycené mastné kyseliny ovlivnila profily většiny významných analyzovaných mastných kyselin; ve všech suplementovaných skupinách nastal pokles nasycených mastných kyselin (myristová, palmitová i stearová), což bylo pravděpodobně zapříčiněno účinkem doplňovaných PUFA [148]. Významný pokles hladin lipidů, zvláště triacylglycerolů, byl způsoben kombinací PUFA s tokoferolem díky regulaci oxidačního stavu organismu.

5.4. Sledování změn antioxidačních parametrů v lidském organismu - klinická studie II

5.4.1. Popis klinické studie

Druhá studie byla realizována v průběhu období prosinec 2007 – březen 2008 a byla zaměřena na sledování změn antioxidantů v souvislosti s příjmem přirozených zdrojů v čerstvé formě. Jako zdroj antioxidantů byla vzhledem k charakteru regionu a stravovacím návykům zvolena jablka v množství 500 g denně. Experimentu se zúčastnilo celkem 16 osob. Popis souboru je uveden v tab. 36.

Tab. 36. Soubor jedinců účastnících se experimentu

skupina	n	muži	ženy	věkový průměr	zdravotní stav
I	8	4	4	39 ± 13	dobrý
II - kontrolní	8	4	4	38 ± 12	dobrý

Klinický experiment byl realizován v období 4 měsíců. Jednotlivé fáze jsou znázorněny v tab. 37. V průběhu studie byla všem jedincům odebírána krev.

Tab. 37. Schéma klinické studie

Fáze	Odběry	Skupina I	Skupina II - kontrolní
1. prosinec 2007	01/2008	normální strava	
2. leden – únor 2008		normální strava + jablka (500 g denně)	normální strava
3. březen 2008	03/2008	normální strava	

Celkový metabolický stav a hladiny nízkomolekulárních antioxidantů byly sledovány v separovaném krevním séru; enzymové antioxidanty byly analyzovány v erytrocytech v plné nesražené krvi.

Analýza biochemických parametrů byla provedena na oddělení klinické biochemie nemocnice v Kyjově. Zde byla rovněž analyzována celková antioxidační kapacita séra metodou ABTS.

Analýza antioxidační kapacity séra metodou TRAP byla prováděna ve spolupráci s Biofyzikálním ústavem v Brně, na oddělení patofyziologie volných radikálů.

Nízkomolekulární antioxidanty byly analyzovány v laboratořích ÚPCHBT VUT v Brně (kap. 4.3.8.1.).

Aktivity antioxidačních enzymů byly stanovovány v privátní laboratoři Vetlab v Brně za použití optimalizovaných metod (kap. 4.3.1., 4.3.2., 4.3.4.).

5.4.2. Vyhodnocení biochemických parametrů

Biochemické parametry byly u všech skupin analyzovány v krevním séru v laboratoři OKB v nemocnici v Kyjově. Přehled použitých metod a rozmezí je uveden v tab. 5 – kap. 4.4.4.

V tabulkách 38 a 39 jsou u jednotlivých skupin uvedeny průměrné hodnoty a směrodatné odchylky průměrů metabolických parametrů, měřené v daném období. Červeně jsou znázorněny hodnoty přesahující fyziologické rozmezí.

Tab. 38. Výsledky biochemických parametrů – skupina I

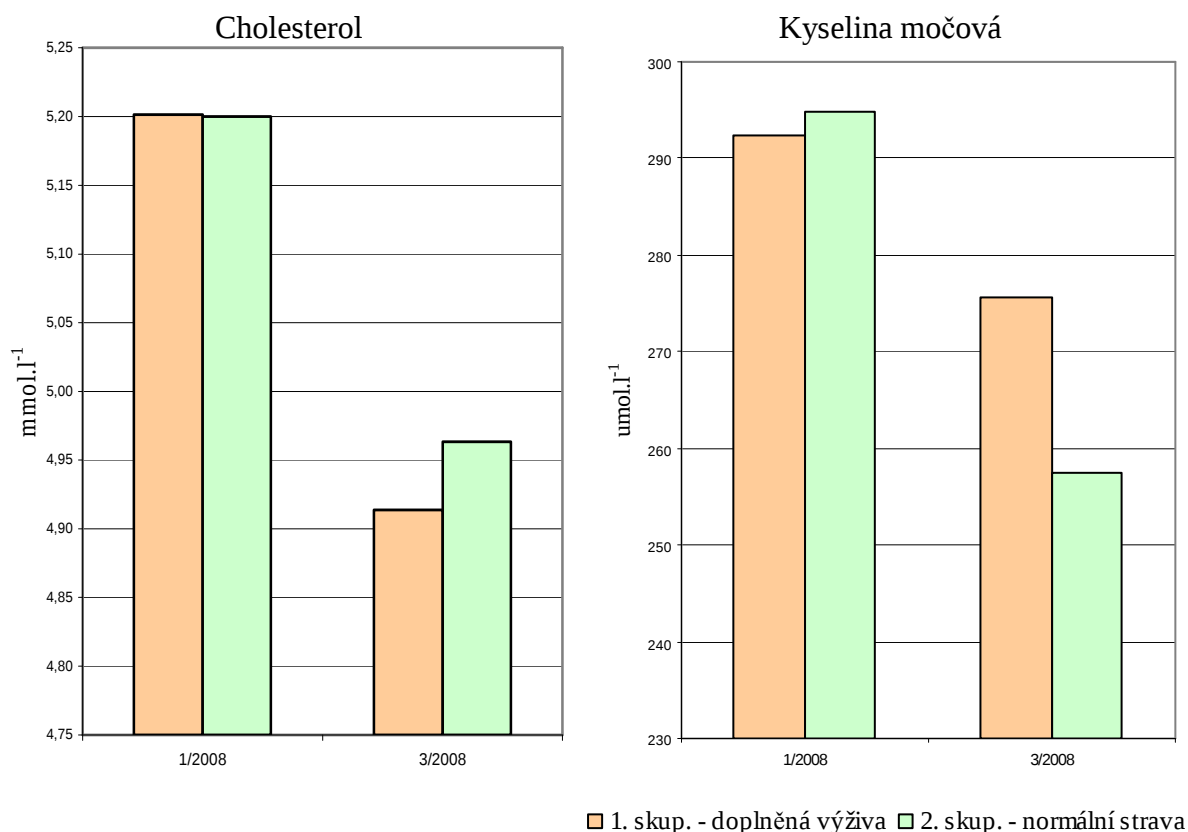
Parametr	Jednotky	01/2008	03/2008
Glukosa	mmol.l ⁻¹	4,89 ± 0,42	4,63 ± 0,27
Močovina	mmol.l ⁻¹	4,86 ± 1,47	4,77 ± 1,43
Kreatinin	μmol.l ⁻¹	89 ± 20	83 ± 17
Kyselina močová	μmol.l ⁻¹	292 ± 97	276 ± 64
Bilirubin	μmol.l ⁻¹	15,5 ± 8,8	12,8 ± 5,6
Alaninaminotransferasa	μkat.l ⁻¹	0,54 ± 0,28	0,44 ± 0,13
Aspartátaminotransferasa	μkat.l ⁻¹	0,47 ± 0,15	0,38 ± 0,07
Cholesterol celkový	mmol.l ⁻¹	5,20 ± 0,92	4,91 ± 0,86
Albumin	g.l ⁻¹	50,1 ± 2,0	45,4 ± 1,9
Celková bílkovina	g.l ⁻¹	82,3 ± 3,4	76,2 ± 3,8

Tab. 39. Výsledky biochemických parametrů – skupina II

Parametr	Jednotky	01/2008	03/2008
Glukosa	mmol.l ⁻¹	5,04 ± 0,82	4,91 ± 0,90
Močovina	mmol.l ⁻¹	4,44 ± 0,90	4,33 ± 0,73
Kreatinin	μmol.l ⁻¹	82 ± 10	79 ± 10
Kyselina močová	μmol.l ⁻¹	295 ± 59	258 ± 65
Bilirubin	μmol.l ⁻¹	14,7 ± 7,3	16,9 ± 9,9
Alaninaminotransferasa	μkat.l ⁻¹	0,59 ± 0,22	0,50 ± 0,14
Aspartátaminotransferasa	μkat.l ⁻¹	0,47 ± 0,14	0,36 ± 0,05
Cholesterol celkový	mmol.l ⁻¹	5,20 ± 0,65	4,96 ± 0,61
Albumin	g.l ⁻¹	48,6 ± 2,6	44,6 ± 2,6
Celková bílkovina	g.l ⁻¹	79,1 ± 3,4	74,4 ± 3,3

Z výsledků vyplývá, že obě skupiny měly srovnatelné výchozí hladiny základních biochemických parametrů. Dvouměsíční doplňování stravy jablky neovlivnilo základní biochemické parametry u sledované skupiny. U obou skupin došlo v průběhu experimentu k významnému poklesu hladin cholesterolu na fyziologické hodnoty; došlo rovněž k výraznému poklesu hladin kyseliny močové. Ostatní parametry zůstaly nezměněny.

Graf 37. Změny hladin cholesterolu a kyseliny močové během sledovaného období



5.4.3. Vyhodnocení antioxidační kapacity

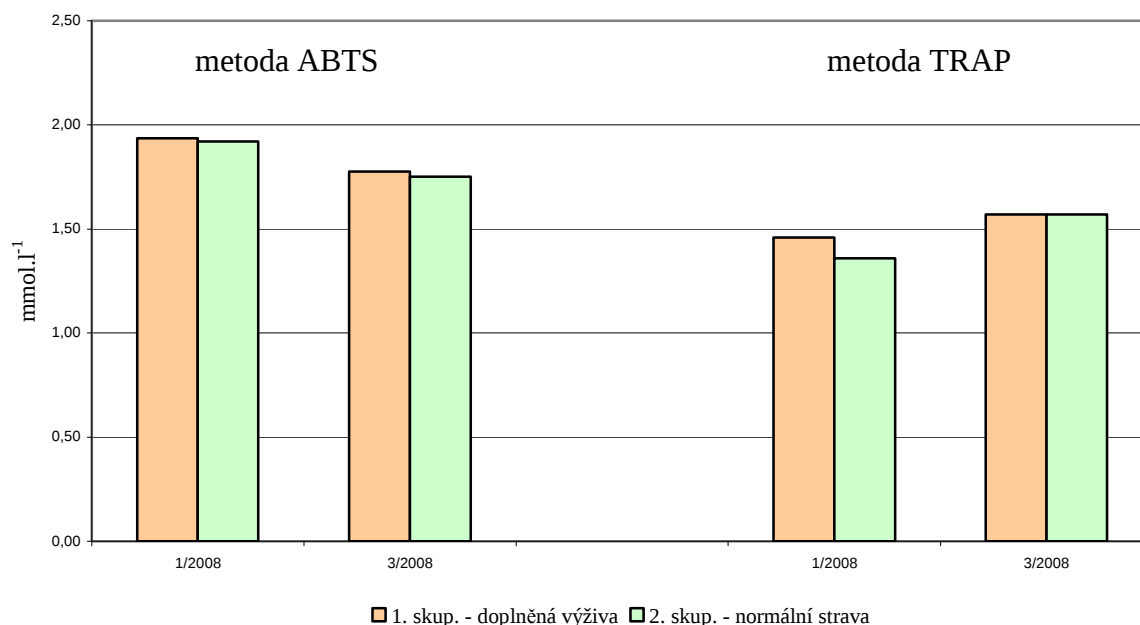
Antioxidační kapacita byla stanovována v séru metodami ABTS a TRAP (kap. 4.3.6.). Porovnání těchto metod je uvedeno v kapitole 5.1.5. V tab. 40 jsou znázorněny průměrné hodnoty a směrodatné odchylky u obou sledovaných skupin.

Tab. 40. Antioxidační kapacita séra u obou sledovaných skupin v průběhu daného období

Skupina	Metoda [mmol.l ⁻¹]	01/2008	03/2008
I - suplementovaná	ABTS	1,94 ± 0,12	1,78 ± 0,11
	TRAP	1,46 ± 0,32	1,57 ± 0,31
II - kontrolní	ABTS	1,92 ± 0,13	1,75 ± 0,18
	TRAP	1,36 ± 0,26	1,57 ± 0,42

U obou skupin nebyly po dobu experimentu zaznamenány významné rozdíly v antioxidační kapacitě. Metodou ABTS byly naměřeny vyšší hodnoty nežli metodou TRAP. Důvodem může být rozdílný princip těchto metod a rozklad aktivních látek během skladování a transportu vzorků.

Graf 38. Změny antioxidační kapacity během sledovaného období



5.4.4. Vyhodnocení nízkomolekulárních antioxidantů

5.4.4.1. Analýza retinolu, α -tokoferolu a karotenoidů

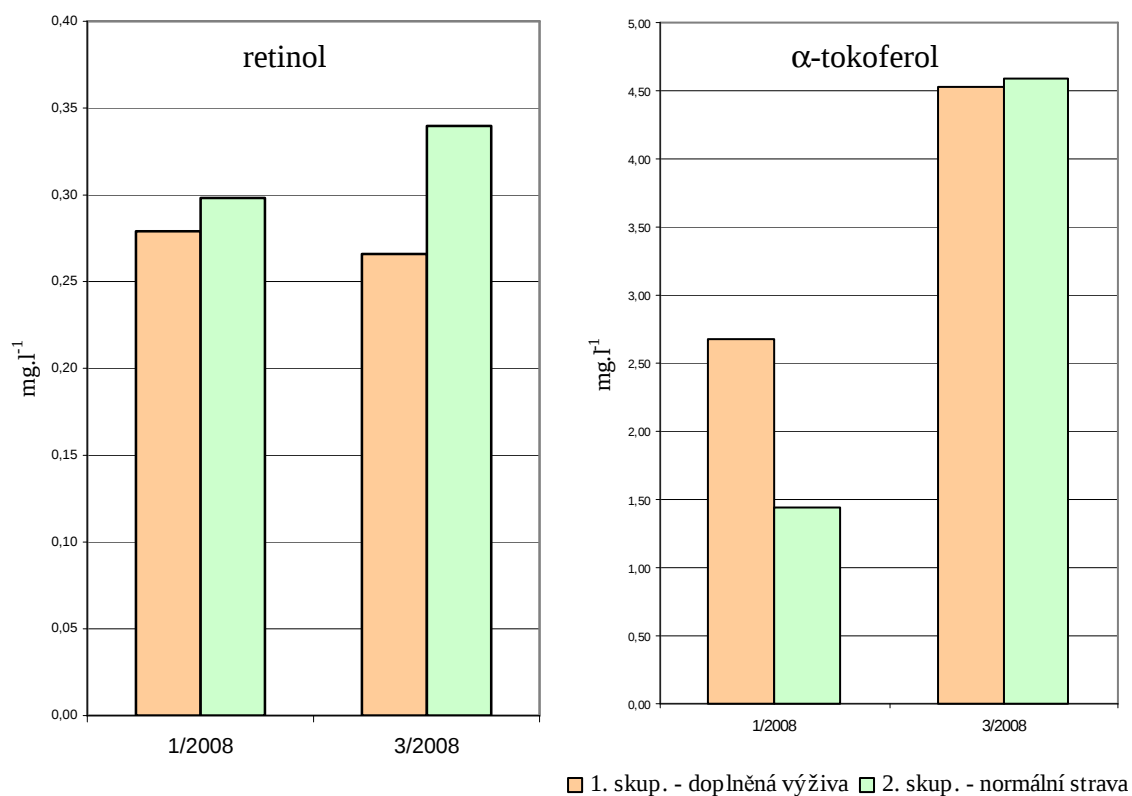
Vitaminy a provitaminy byly analyzovány ve vzorcích séra metodou RP-HPLC s reverzní fází (kap. 4.3.8.1.). Analýza proběhla v laboratořích ÚCHPBT FCH VUT v Brně. V tab. 41 jsou uvedeny hodnoty měřených parametrů u obou sledovaných skupin.

Tab. 41. Naměřené hladiny nízkomolekulárních antioxidantů

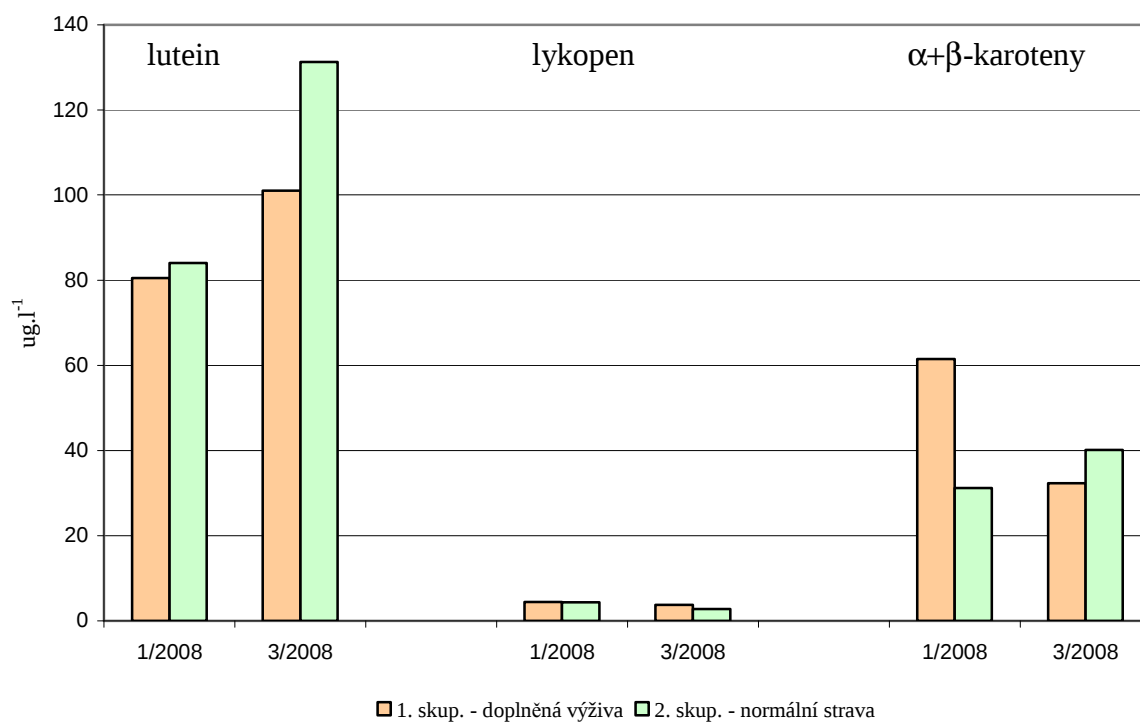
Skupina	analyt	01/2008	03/2008
I	retinol [mg.l ⁻¹]	0,28 ± 0,14	0,27 ± 0,17
	α -tokoferol [mg.l ⁻¹]	2,68 ± 2,06	4,53 ± 3,41
	lutein [μg.l ⁻¹]	80,56 ± 39,39	10,98 ± 65,66
	lykopen [μg.l ⁻¹]	4,42 ± 3,24	3,76 ± 3,57
	α + β -karoten [μg.l ⁻¹]	61,51 ± 50,47	32,31 ± 19,51
II	retinol [mg.l ⁻¹]	0,30 ± 0,14	0,34 ± 0,06
	α -tokoferol [mg.l ⁻¹]	1,44 ± 1,13	4,59 ± 0,91
	lutein [μg.l ⁻¹]	84,07 ± 59,12	131,28 ± 28,49
	lykopen [μg.l ⁻¹]	4,33 ± 4,41	2,75 ± 1,45
	α + β -karoten [μg.l ⁻¹]	31,18 ± 20,81	40,15 ± 16,72

Během experimentu došlo u suplementované skupiny k mírnému poklesu retinolu, což koresponduje s poklesy jeho prekursorů α + β -karotenů. U kontrolní skupiny byl naopak pozorován nárůst těchto hladin. U obou skupin došlo k signifikantnímu nárůstu α -tokoferolu.

Graf 39. Změny hladin retinolu a α -tokoferolu během sledovaného období



Graf 40. Změny hladin karotenoidů během sledovaného období



Zvýšení hladiny luteinu u obou skupin je pravděpodobně spojeno spíše s celkovými stravovacími návyky, než se zvýšeným přísunem jablek, které obsahují poměrně nízkou koncentraci karotenoidů.

5.4.4.2. Analýza celkových polyfenolů a flavonoidů

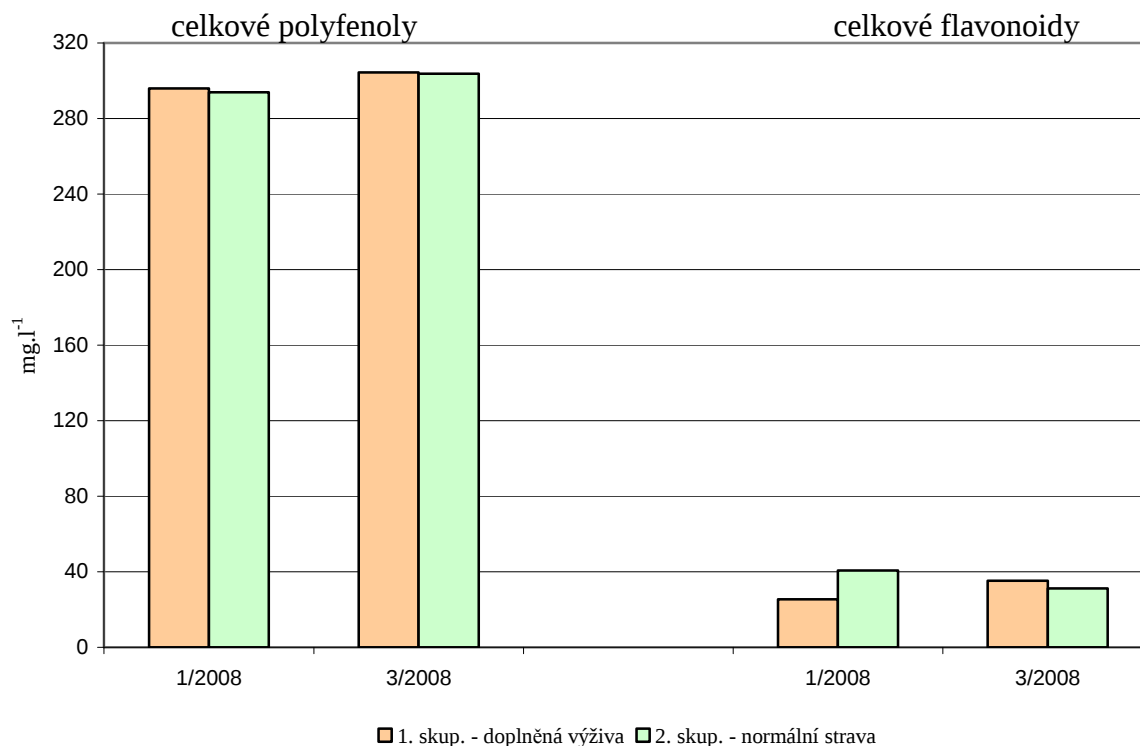
V tab. 42 jsou uvedeny průměrné hodnoty měřených parametrů u obou sledovaných skupin. Parametry byly analyzovány spektrofotometricky v laboratořích ÚPCHBT FCH VUT v Brně (kap. 4.3.9.).

Tab. 42. Hladiny celkových polyfenolů a flavonoidů v průběhu daného období

Skupina	Parametr [mg.l ⁻¹]	01/2008	03/2008
I - suplementovaná	celkové polyfenoly	295,9 ± 7,9	304,4 ± 6,7
	celkové flavonoidy	25,5 ± 5,3	35,3 ± 4,9
II - kontrolní	celkové polyfenoly	293,9 ± 7,9	303,7 ± 8,4
	celkové flavonoidy	40,7 ± 4,0	31,1 ± 5,1

Během sledovaného období došlo k mírnému nárůstu hladin celkových polyfenolů u obou skupin; u flavonoidů pozorujeme zvýšení hladiny u suplementované skupiny a pokles u skupiny jedinců s běžnou stravou.

Graf 41. Změny hladin celkových polyfenolů a flavonoidů během sledovaného období



U hladin celkových flavonoidů lze pozorovat specifický efekt zvýšeného příjmu jablek. Toto ovoce je poměrně bohaté na flavonoidy a zvýšená hladina v suplementované skupině monitoruje jejich zvýšený příjem.

5.4.5. Vyhodnocení aktivit enzymových antioxidantů

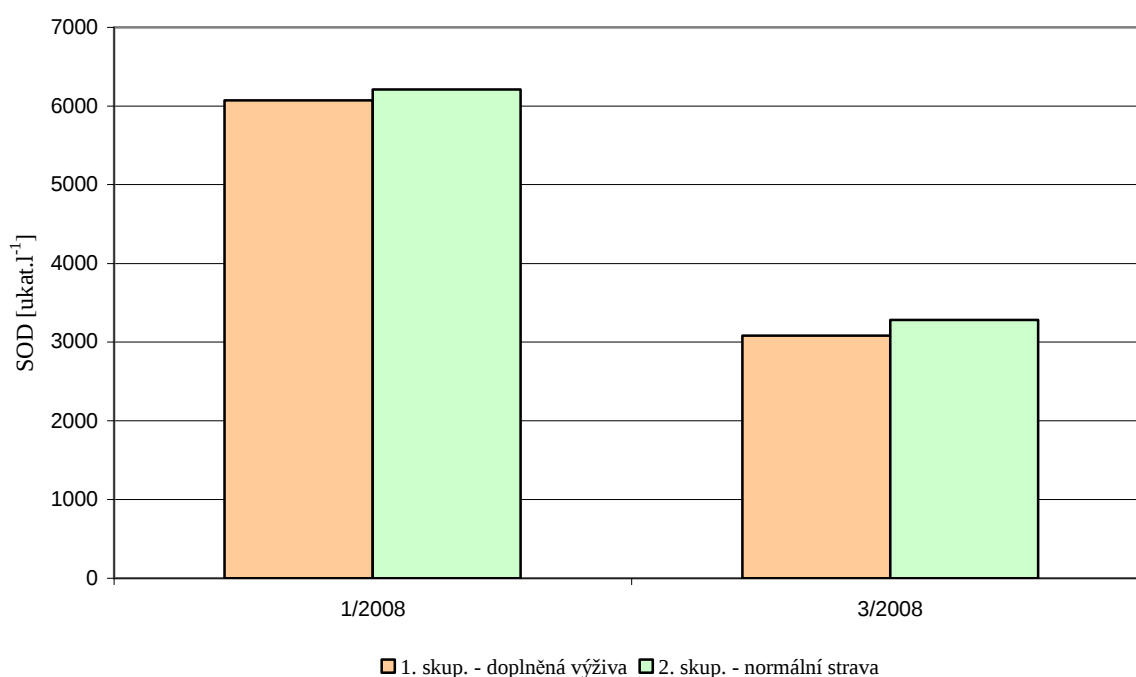
Aktivity enzymů superoxiddismutasy, katalasy a glutathionperoxidasy byly stanovovány v privátní laboratoři Vetlab v Brně s využitím optimalizovaných metod (kap. 5.1.1. – 5.1.2.). V tab. 43 jsou uvedeny průměrné hodnoty naměřených aktivit u obou sledovaných skupin.

Tab. 43. Naměřené hladiny nízkomolekulárních antioxidantů

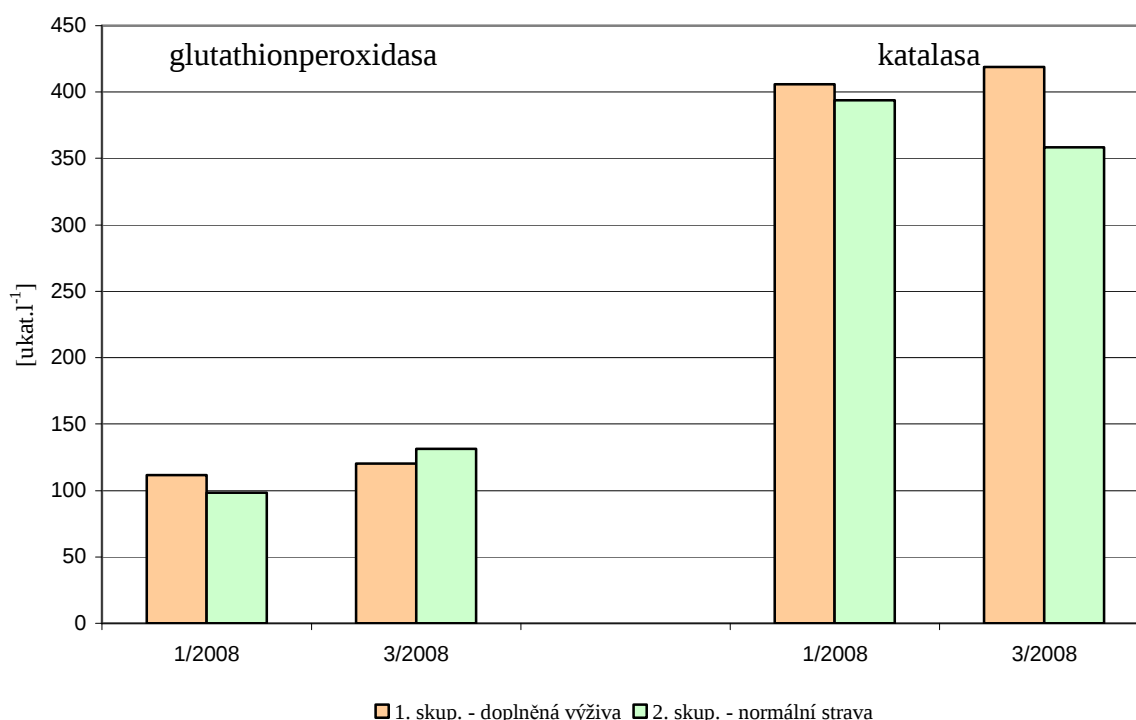
Skup.	analyt [$\mu\text{kat.l}^{-1}$]	01/2008	03/2008
I	superoxiddismutasa SOD	6073 ± 706	3081 ± 384
	glutathionperoxidasa GPX	112 ± 20	120 ± 29
	katalasa CAT	406 ± 30	419 ± 29
II	superoxiddismutasa SOD	6211 ± 317	3283 ± 296
	glutathionperoxidasa GPX	99 ± 15	131 ± 13
	katalasa CAT	394 ± 15	358 ± 39

Během sledovaného období došlo k výraznému poklesu aktivity SOD u obou skupin. U suplementované skupiny nastal mírný nárůst aktivity katalasy oproti kontrolní skupině, kde došlo naopak k výraznému poklesu. Aktivita GPX byla v závěru experimentu u obou skupin zvýšená, u kontrolní skupiny výrazně.

Graf 42. Změny aktivit superoxiddismutasy během sledovaného období



Graf 43. Změny aktivit glutathionperoxidasy a katalasy během sledovaného období



Výsledky měření vybraných enzymů naznačují, že exogenní suplementace jablek výrazně neovlivnila sledované enzymové aktivity. Během sledovaného období došlo k výraznému poklesu aktivity SOD, avšak u obou skupin, suplementované i kontrolní. Podobně u GPx došlo u obou skupin k mírnému nárůstu hladin. Největší rozdíl v aktivitách byl nalezen u katalasy – zatímco u suplementované skupiny došlo v uvedeném období k mírnému nárůstu aktivity, kontrolní skupina naopak vykázala poměrně výrazný pokles. Je tedy možné, že podávané množství jablek přispělo právě u katalasy k udržení její aktivity.

Celkově lze z dosažených výsledků obou klinických studií konstatovat, že antioxidační systém lidského organismu skutečně tvoří vzájemně propojenou síť nízkomolekulárních a enzymových antioxidantů, které zasahují do řady buněčných procesů. Poněvadž určité antioxidanty je nezbytné dodávat exogenně, projeví se suplementace většinou zvýšením nebo úpravou hladin samotných podávaných látek a bezprostředně navázaných složek antioxidačního systému, ale současně suplementace antioxidanty ovlivňuje komplexně regulovanými drahami i řadu dalších metabolických parametrů a drah, jako je metabolismus sacharidů, lipidů a transportní děje.

6. DISKUSE

Oxidační procesy, probíhající v každé buňce organismu, jsou regulovány celou škálou vzájemně spolupracujících antioxidačních systémů. Pro jejich správnou funkci je v organismu nezbytný dostatečný obsah látek s antioxidačními účinky. Řada z nich je syntetizována přímo v organismu, některé je však nutno doplňovat exogenně v potravě [149].

Studiu antioxidačních účinků potravin a jejich složek se v současné době věnuje zvýšená pozornost; předmětem zájmu bývá výzkum biologického účinku antioxidantů a také jejich lokalizace a koncentrace v různých druzích organismů a tkání.

Antioxidanty jsou všeobecně považovány za látky, které svým účinkem pomáhají zvyšovat odolnost všech typů aerobních organismů před negativním vlivem reaktivních derivátů kyslíku a dusíku. U lidského organismu mohou antioxidanty působit preventivně před vznikem tzv. civilizačních chorob, jež patří k nejčastějším příčinám úmrtí ve vyvinutých zemích. Mezi tato onemocnění patří především kardiovaskulární choroby, diabetes, nádorová onemocnění a jiné [150].

Role antioxidantů v prevenci výskytu těchto civilizačních onemocnění je poměrně komplikovaná a její mechanismus není doposud plně objasněný. Výsledky řady klinických experimentů však ukazují, že cílený exogenní přísun antioxidantů přímo souvisí s vyšší odolností organismu před onemocněními, případně se zpomalením jejich průběhu. [150, 151]. Cílem řady nutričních studií je tedy snaha vypracovat doporučení pro takovou úpravu stravovacích návyků, která by vedla k nižšímu výskytu alespoň některých tzv. civilizačních onemocnění. Dodávání potřebných účinných látek v potravě by mohlo být přitom jedním z nejjednodušších a na úrovni populací i všeobecně dostupným způsobem, jak chránit organismus před progresí zmíněných degenerativních onemocnění i před negativními důsledky fyziologického stárnutí.

Aby mohly být podrobněji pochopeny mechanismy regulace antioxidačního komplexu, je třeba nejprve analyzovat a identifikovat fyziologicky aktivní složky antioxidačního systému příslušného organismu a případně testovat jejich biologické účinky in vivo. K tomu je třeba neustále vyvíjet a optimalizovat metody k co nejpřesnější analýze hladin příslušných složek antioxidačního komplexu v daném biologickém materiálu. Většinou je nezbytné optimalizovat zejména postup úpravy vzorku a extrakce, ale i podmínky stanovení s ohledem na obsah daných látek v analyzovaném materiálu.

Cílem předložené práce bylo studium vybraných enzymových i neenzymových antioxidantů v různých typech biologického materiálu se zvláštním zaměřením na enzymy zapojené v regulaci oxidačního stresu.

Práce byla rozčleněna na dvě základní části; v první byly optimalizovány metody extrakce a stanovení vybraných nízkomolekulárních i enzymových antioxidantů v různých druzích biologického materiálu. Optimalizované metody byly aplikovány při analýzách antioxidantů v ječmeni a ve sladu v souvislosti se studiem aktivace antioxidačních mechanismů v závislosti na vnějších faktorech. Výběr biologického materiálu úzce souvisel s pracovním zařízením a byl prováděn v souladu s potřebami pracoviště doktorandky. Druhá část práce byla zaměřena na sledování změn enzymových i nízkomolekulárních antioxidantů u humánních souborů za účelem posouzení vztahů mezi aktivitami jednotlivých složek antioxidačního

komplexu po dočasné exogenní suplementaci antioxidanty. I zde byly využity metody optimalizované v první části práce, zejména kolorimetrické metody ke stanovení enzymových antioxidantů ve vzorcích.

Hlavním důvodem optimalizace vybraných metod ke stanovení aktivity enzymů byl záměr zjednodušit tyto metody, přizpůsobit podmínky provedení danému biologickému materiálu a umožnit rychlé a rutinní stanovení velkého objemu vzorků. Spektrofotometrické kinetické metody jsou obvykle založeny na přímém měření úbytku koncentrace substrátu či nárůstu produktu jako změně absorbance v čase. Tato měření obvykle nejsou komplikovaná, avšak vzorky je nutno stanovovat postupně, což klade velké nároky na čas a dodržení podmínek stability vzorků. Řešením je aplikace metod na automatické biochemické analyzátory, čímž dochází k velké úspoře času, pracovních sil a v neposlední řadě k výrazné redukci objemů chemikálií i vzorků.

V případě optimalizace stanovení aktivity katalasy a lipoxygenasy bylo nutno přepracovat UV metody na kolorimetrické pro měření ve viditelné oblasti spektra, neboť automatické analyzátory nejsou na měření v UV oblasti uzpůsobeny.

Pro optimalizaci stanovení aktivity katalasy byla zvolena kolorimetrická metoda podle Gótha [100]. Původní UV metoda, založená na přímém měření úbytku substrátu peroxidu vodíku, zde byla upravena přidavkem molybdenanu amonného, který reaguje s peroxidem za vzniku žlutého zbarvení absorbujícího ve viditelné oblasti spektra. Oproti původnímu provedení bylo v metodě s ohledem na budoucí automatizaci zavedeno několik úprav – změna vlnové délky a počátečních koncentrací substrátu (peroxidu vodíku) i molybdenanového činidla. Pomocí komerčního standardu katalasy byla proměřena řada vzorků o různých koncentracích původní UV metodou a upravenou kolorimetrickou metodou. Mezi oběma metodami byla zjištěna významná pozitivní korelace. Vzhledem ke srovnatelnosti obou metod mohla být tedy stávající UV metoda nahrazena jednodušší a rychlejší kolorimetrickou.

Podobně jako v případě katalasy bylo postupováno při optimalizaci stanovení aktivity lipoxygenasy. Původní UV metoda byla založena na přímém spektrofotometrickém měření hydroperoxidů vznikajících při oxidaci polynenasycených mastných kyselin [120]. Kolorimetrická metoda podle Jianga et al. [123] využívá reakce vzniklých hydroperoxidů s Fe^{2+} . Vzniklé Fe^{3+} vytváří s xylenolovou oranží modrozelené zbarvení absorbující při 560 nm. Pro srovnání bylo použito 20 vybraných vzorků ječmene, které byly proměřeny oběma metodami – UV i kolorimetrickou. Výsledky ukázaly, že některé hodnoty aktivity lipoxygenasy u kolorimetrické metody byly výrazně vyšší než při měření totožných vzorků UV metodou. Vzhledem k malému počtu proměřených vzorků však nelze jednoznačně prokázat vyšší citlivost kolorimetrické metody.

Ke stanovení aktivity superoxiddismutasy bylo využito nepřímých metod pro sledování úbytku superoxidového radikálu. Přímé spektrofotometrické stanovení aktivity SOD vychází z práce Fridoviche a McCorda [76] sice dodnes patří k nejpoužívanějším technikám, ale superoxidový radikál je však poměrně nestabilní, takže je vcelku složité stanovit aktivitu SOD v komplexních biologických vzorcích, které obsahují potenciální interferující látky. Výsledky může ovlivnit též přítomnost katalázy a peroxidázy ve vzorcích. Všechny spektrofotometrické metody jsou založeny na primární reakci xanthinu s XOD za účelem tvorby superoxidového radikálu, který má být substrátem pro SOD a ta jej má enzymaticky

rozložit. Jednotlivé postupy se pak liší ve způsobu detekce. Obvykle však následuje reakce vzniklého superoxidu s cytochromem c (přirozený barevný redoxní systém) za vzniku barevného produktu. Cytochrom v tomto případě soutěží s SOD o radikálový substrát [152]. V průběhu dalších let však bylo zjištěno, že cytochrom c není ideální barevný indikátor, neboť konečné výsledky mohou být zkresleny enzymy cytochrom c-oxidázou a cytochrom c-peroxidázou přítomnými ve vzorku. Proto byla detekční reakce nahrazena reakcí radikálu s tetrazoliovými solemi typu NBT nebo INT. Intenzita zbarvení vznikajícího formazanu (modrého nebo růžového) se stanovuje spektrofotometricky.

Pomocí komerčních standardních roztoků byly porovnány dvě nepřímé metody využívající různé typy tetrazolipových solí – NBT a INT. Obě vykazovaly silnou pozitivní korelaci a ukázaly se být vhodné pro měření vzorků, avšak metoda NBT vykazovala větší rozptyl naměřených výsledků. Důvodem mohl být fakt, že při měření byly používány reagentie připravené v laboratoři, zatímco pro INT metodu byl využíván komerční diagnostický set se stabilizovanými činidly. Pro rutinní měření byla proto zvolena metoda INT vzhledem k její snadné dostupnosti ve formě hotového setu a možnosti automatizace.

Obecně je tato spektrofotometrická metoda poměrně citlivá, ale má i své nevýhody – je poměrně náročná na čas, velmi záleží na přípravě extraktu, což je zásadní problém u práce s komplexními biologickými matricemi. a dále dochází k postupnému poklesu aktivity XOD v roztoku. Rovněž nelze vyloučit interferenční vlivy dalších látek přítomných ve vzorku nebo extraktu, což se projevilo na časovém průběhu stanovení aktivity SOD v ječmeni. Validace metody RANSOD potvrdila nejistotu do 12% a opakovatelnost do 7% za různých podmínek stanovení (kap. 5.1.2.3.).

Aktivita enzymu peroxidasy byla stanovována metodou dle Nishioky [105]; jako donor elektronů pro oxidoredukční reakci byl použit guaiacol. Peroxidasu má poměrně úzkou substrátovou specifitu (termín se používá tehdy, když enzym reaguje jen s malým množstvím substrátů) – reaguje pouze s peroxidem vodíku, methyl- a ethylperoxydy. Naopak není specifická pro donory elektronů pro vodík – mohou jimi být fenoly, aminofenoly, diaminy, askorbát a řada aminokyselin [153]. Vzhledem ke specifické matici zkoumaného materiálu (ječmen, slad) a pro ověření informací o faktorech ovlivňujících toto stanovení konkrétně s guaiacolem byly testovány optimální pH, teplota a koncentrace enzymu i substrátu.

Optimální hodnota pH reakční směsi byla naměřena v rozmezí 6,8 – 7,2. Některé postupy pro stanovení aktivity doporučují nižší hodnoty pH: 6,0 – 6,5 [154], pH = 5,0 [155]. Různé hodnoty jsou pravděpodobně uváděny s ohledem na praktické zkušenosti s činidlem, které slouží jako donor elektronů. Nicméně stabilita enzymu je uváděna v rozmezí pH 5,0 – 9,0 [154], proto byla zvolena hodnota pH = 7,0, otestovaná v laboratoři jako optimální pro reakci a guaiacolem.

Teplotní stabilita peroxidasy byla testována od 15 °C do 75 °C. Peroxidasu vykazovala vysokou aktivitu až do 45 °C, poté již klesala a při teplotě 60 °C byl enzym inhibován v důsledku denaturace. Pro stanovení aktivity je všeobecně doporučována teplota 20 – 25 °C; jež byla zvolena nejsnazší varianta vzhledem k laboratorní teplotě. Pro budoucí automatizaci však bude třeba srovnat aktivity POD ve vzorcích při teplotě 20 °C a 37 °C, neboť biochemické analyzátoři mají naprogramovaná stanovení pro 37 °C.

Pro zjištění optimální koncentrace enzymu účastnícího se reakce byla sledována absorbance barevného produktu reakce po přidání různých množství komerčně vyrobené peroxidasy. Měřením bylo zjištěno, že pro optimální měření aktivity je maximální množství enzymu v reakční směsi do aktivity $40 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$. Při vyšším množství bylo nutné vzorky ředit, neboť v daném čase odečítání absorbance A_2 již nebyl měřený úsek lineární.

Při stanovení vlivu koncentrace guaiacolu na aktivitu POD byla sledována řada reakcí s postupně stoupající koncentrací guaiacolu. Z časové závislosti na koncentraci guaiacolu byla vypočítána počáteční rychlost reakce $V_0 = 0,003591 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a Michaelisova konstanta $K_M = 0,001781 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Stanovení celkové antioxidační aktivity bylo využito při analýzách humánních vzorků získaných během klinických experimentů. Pomocí vzorků sér získaných při druhé studii byly porovnány dvě metody – ABTS a TRAP. Výsledky obou metod se řádově nelišily, avšak u většiny vzorků byly hodnoty získané metodou ABTS vyšší. Mezi oběma metodami byla nalezena pouze slabá kladná korelace. Důvodem může být mimo jiné nestabilita a rozklad antioxidantů během skladování a transportu vzorků k luminometrickému stanovení. Rovněž ke statistickému zhodnocení by bylo vhodné použít větší počet vzorků. Z praktického hlediska se pro rutinní měření jeví vhodnější metoda ABTS, jelikož je dostupná ve formě diagnostických setů a tudíž plně automatizovatelná. Metoda TRAP naproti tomu umožňuje měření širší škály vzorků, protože není ovlivněna barvou ani čirostí vzorků. Byla s úspěchem odzkoušena v dřívější studii při měření antioxidační kapacity mléka [156].

Optimalizované metody byly použity při analýzách antioxidantů v ječmeni a ve sladu v souborech vzorků o 6 odrůdách, pěstěných na čtyřech různých lokalitách po dobu dvou let.

Při analýze superoxiddismutasy byly v ječmeni naměřeny hodnoty aktivity v rozmezí $92 - 135 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ suš.}$, přičemž v prvním roce byly hladiny vyšší nežli v následujícím. V připravených sladech se aktivity pohybovaly mezi $113 - 158 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ suš.}$ Proces sladování tedy zřejmě způsobuje aktivaci antioxidantů v obilce ječmene. Nejvyšší hodnoty SOD byly nalezeny v odrůdách Bojos a Jersey, nejnižší u odrůdy Radegast.

Významný vliv na aktivitu SOD má tedy především odrůda, hodnoty mohou kolísat až o $\pm 120 \%$. Vliv předplodiny je poměrně obtížné hodnotit, poněvadž jde vždy o komplex faktorů působících na danou odrůdu.

Rovněž umělá infekce je významným faktorem, který může ovlivnit aktivitu SOD; v provedené studii však neměla příliš velký vliv na aktivity SOD v ječmenech a sladech; rozdíly mezi jednotlivými odrůdami nejsou zřejmě v převážné většině případů statisticky významné. Sledované odrůdy se poněkud lišily spíše ve schopnosti aktivace enzymu v závislosti na napadení umělou plísňovou infekcí, případně ošetření fungicidními přípravky.

Při hodnocení aktivit katalasy v totožných vzorcích byly rovněž nalezeny rozdíly mezi aktivitou v ječmeni ($63 - 101 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ suš.}$) a ve sladu ($151 - 187 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ suš.}$), i když ve druhém roce sledování nebyly aktivity ve sladech natolik markantní ($110 - 135 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ suš.}$). Žádná z testovaných odrůd ani lokalit nevykázala významný rozdíl v katalasové aktivitě; je zřejmé, že aktivity enzymů jsou silně ovlivněny povětrnostními podmínkami v dané lokalitě.

Naměřené aktivity peroxidasy u sledovaných vzorků opět potvrdily významnou aktivaci enzymu během sladování ječmene. Hodnoty POD v ječmeni se pohybovaly v rozmezí $0,90 -$

1,39 U.g⁻¹ suš., ve sladu 3,14 – 4,89 U.g⁻¹ suš. Nejvyšší aktivity POD byly nalezeny v odrůdě Malz, nejnižší v odrůdě Sebastian.

Analýzy nízkomolekulárních antioxidantů – vitaminu E, luteinu a β -karotenu – v obilkách ječmene a sladu potvrdily výraznou aktivaci antioxidační aktivity během sladování ječmene. Nejvyšší obsahy sledovaných látek byly naměřeny v odrůdě Jersey. Nebyly nalezeny významné rozdíly v hladinách v závislosti na pěstební lokalitě. Všeobecně však došlo během sledovaného období k poklesu hladin ve druhém roce.

Souhrnně můžeme předpokládat, že patrně největší vliv na hladiny nízkomolekulárních i enzymových antioxidantů mají klimatické podmínky v dané pěstební lokalitě; oxidační procesy jsou ovlivňovány jednak množstvím vláhy, jednak slunečním svitem, který indukuje oxidační procesy v pěstovaných rostlinách. Aktivita antioxidantů v obilkách ječmene prudce narůstá během procesu sladování; za zvýšené teploty a vlhkosti dochází nejprve k aktivaci enzymových systémů včetně těch antioxidačních. V obilce probíhá zvýšená metabolická aktivita, během níž lze předpokládat zvýšenou tvorbu radikálů; za tímto účelem mohou být aktivovány ostatní antioxidační systémy, aby ochránily buňky před poškozením oxidačním stresem.

Veškeré analyzované parametry – enzymy, vitaminy i provitaminy jsou v rostlinách přímo biosyntetizovány, jde tedy látky endogenní povahy. Jejich biosyntéza v ječmeni je geneticky dána a tak lze provedenými srovnávacími studiemi nepřímou posoudit, zda některé ze studovaných faktorů mohou mít vliv na expresi genů pro příslušné enzymy/dráhy nebo případně na stabilitu daných antioxidantů v biologickém materiálu.

Zjištěné výsledky studie rostlinných antioxidantů lze považovat za zajímavou experimentální základnu pro další práce, před formulováním obecnějších závěrů je třeba další ověření a zejména dlouhodobější sledování změn aktivity enzymů i neenzymových antioxidantů v závislosti na odrůdě a na působení exogenních faktorů po dobu několika následujících let. Vzhledem k významu aktivity antioxidačního komplexu ječmene pro výslednou kvalitu finálního výrobku – piva může být další studium zdrojem užitečných výsledků s přímou praktickou aplikací, zejména při výběru odrůd, případně výběru a aplikaci ochranných a fungicidních látek.

Za účelem zjištění, nakolik mohou exogenní antioxidanty ovlivnit metabolické funkce organismu, byly ve druhé části práce navrženy a organizačně zajištěny dva klinické experimenty prováděné ve spolupráci s Oddělením klinické biochemie nemocnice v Kyjově, privátní laboratoří Vetlab v Brně a s laboratoří speciálních analýz Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Brně.

První klinická studie byla zaměřena na vliv podávání přírodního preparátu obsahujícího polynenasycené mastné kyseliny a vitamin E na metabolismus a oxidační status osob s hyperlipidemií. Zúčastnilo se 38 dobrovolníků rozdělených do čtyř skupin podle předběžného screeningu jejich lipidového profilu: 1) soubor jedinců s hyperlipidemií (n = 10), 2) jedinci s hypercholesterolemií (n = 12), 3) zdraví jedinci (n = 8) a 4) kontrolní skupina (n = 8). Prvním třem skupinám byl v daném období podáván potravinový doplněk obsahující polynenasycené mastné kyseliny a vitamin E (EPA Nature Bounty, složení preparátu v tab. 26, str. 102). Během experimentu byla všem jedincům odebírána a analyzována krev.

Vybrané klinicko-biochemické parametry byly analyzovány v laboratoři klinické biochemie za použití akreditovaných postupů. Vyhodnocením výsledků (kapitola 5.3.2.) byly zjištěny statisticky významné změny lipidových parametrů u obou rizikových skupin; u skupiny hyperlipidemiků nastal signifikantní pokles hladin celkového cholesterolu, LDL i triacylglycerolů. Hypercholesterolemici vykazovali pokles hladin triacylglycerolů. U skupin zdravých jedinců a kontrolní výrazné změny nenastaly. Ze získaných výsledků je patrné, že kombinovaný efekt PUFA přes prostaglandinovou dráhu a tokoferolu jakožto antioxidantu prostřednictvím regulace oxidačního stavu je schopen účinně a pozitivně ovlivnit hladinu lipidů v organismu.

Analýza nízkomolekulárních antixidantů ukázala zvýšení hladin retinolu a α -tokoferolu u suplementovaných skupin těsně po ukončení podávání preparátu. Kontrolní skupina naopak vykazovala během sledovaného období pokles hladin všech parametrů a jejich nárůst na konci experimentu. Tuto skutečnost lze přičíst nástupu letního období a změně stravování, kdy se do přijímané potravy dostává více ovoce a zeleniny bohaté na antioxidanty, případně postupnému kumulačnímu efektu preparátu v organismu.

Ke změnám v průběhu studie docházelo i při sledování produktů pokročilé oxidace proteinů a produktů pokročilé glykace. U rizikových skupin byly nalezeny výrazně vyšší hladiny produktů oxidace proteinů nežli skupiny zdravých jedinců; během trvání experimentu hladiny AOPP a AGE klesly. Výsledky těchto parametrů nepřímo charakterizujících oxidační stav organismu svědčí opět o pozitivní roli podávaného vitaminového preparátu zejména u jedinců s hyperlipidemií a o propojení metabolismu lipidů a mechanismů regulace oxidačních procesů.

Analýza mastných kyselin v séru probíhala v laboratořích VÚPS v Brně; během sledovaného období došlo u suplementovaných skupin k poklesu nasycených mastných kyselin, hlavně kyseliny palmitové (C16:0) a stearové (C18:0). U řady nenasycených mastných kyselin došlo během podávání preparátu k nárůstu hladin a po ukončení užívání k opětovnému poklesu, zvláště u kyseliny linolové (C18:2 ω 6) a olejové (C18:1 ω 9). Podobné změny nastaly u kyseliny dokosahehexaneové (C22:6 ω 3) a eikosanoidů, které jsou deklarovány jako hlavní účinné složky podávaného preparátu. Byl zaznamenán výrazný nárůst kyseliny nervonové (C24:1 ω 9) ve všech suplementovaných skupinách. Tato kyselina se nachází v cerebrosidech a její nízká hladina bývá indikována u pacientů s roztroušenou sklerosou.

Výsledky analýz ukazují, že suplementace potravinovým doplňkem EPA obsahujícím polynenasycené mastné kyseliny ovlivnila profily většiny významných analyzovaných mastných kyselin; polynenasycené mastné kyseliny (PUFA), zvláště skupina zahrnující omega-3-nenasycené mastné kyseliny, mají vliv na snižování hladiny triacylglycerolů, zabraňují v krevním řečišti shlukování a usazování aterosklerotických plátů, mají protizánětlivé a protisrážlivé účinky [157, 158]. Podávaný potravinový doplněk obsahuje vysoké množství PUFA; v kombinaci s vitamínem E, který zabraňuje jejich oxidaci reaktivními formami, jsou prezentovány jako účinný potravinový doplněk při prevenci aterosklerosy. Podle výsledků této studie je možné regulovat hladiny lipidů a mastných kyselin pravidelným přísunem PUFA a tokoferolu přímým požíváním rybích produktů nebo ve formě potravinového doplňku.

Druhá klinická studie byla zaměřena na sledování změn antioxidantů v souvislosti s příjmem přirozených zdrojů v čerstvé formě. Jako zdroj antioxidantů byla vzhledem k charakteru regionu a stravovacím návykům zvolena jablka v množství 500 g denně. Experimentu se zúčastnilo celkem 16 osob – první skupina (n = 8) doplňovala každý den svoji stravu o jablka po dobu dvou měsíců, druhá skupina (n = 8) sloužila jako kontrolní soubor.

Analýza biochemických parametrů byla provedena na oddělení klinické biochemie nemocnice v Kyjově. Zde byla rovněž analyzována celková antioxidační kapacita séra metodou ABTS. Během sledované doby došlo u obou skupin k signifikantnímu poklesu hladin cholesterolu na fyziologické hodnoty; došlo rovněž k výraznému poklesu hladin kyseliny močové. Hladiny nízkomolekulárních antioxidantů se v závislosti na příjmu jablek rovněž nezměnily; je to dané zvláště tím, že jablka jsou bohatá spíše na polyfenolické sloučeniny a obsahují relativně nízké hladiny karotenoidů. To koresponduje se zvýšením hladiny celkových flavonoidů u suplementované skupiny během experimentu.

V souvislosti s uvedenou studií byly zavedeny a optimalizovány metody stanovení enzymových antioxidantů v plné krvi; největší rozdíl v naměřených aktivitách byl nalezen u katalasy – zatímco u suplementované skupiny došlo v uvedeném období k mírnému nárůstu aktivity, kontrolní skupina naopak vykazovala poměrně výrazný pokles. Je tedy možné, že podávané množství jablek přispělo právě u katalasy k udržení její aktivity.

Ze získaných výsledků v rámci klinického experimentu II vyplývá, že v deficientním období (zima, jaro) nestačí 500 g jablek denně k dosažení zvýšených hladin antioxidantů tak, jako u podávání vitaminů; potvrzují to další klinické studie, provedené v dřívější době [159, 160, 161]. Doplnění ve formě vitaminových preparátů sice vede ke zvýšení hladin antioxidantů v organismu, ale pouze přechodnému. Nejvhodnějším řešením se tedy jeví trvalý přísun antioxidantů v přirozených zdrojích; zde není důležité jen množství, ale je nutné dbát i na složení a typ zdroje – jablka jsou sice v naší populaci jedním z nejvýznamnějších zdrojů a v zimě představují spolu s brambory cca 60% všech přijímaných antioxidantů, ale obsah aktivních látek v nich je poměrně nízký. Proto třeba rozšířit zejména příjem zeleniny jakožto jednoho z nejlepších zdrojů antioxidantů a současně i nenasycených mastných kyselin, podobně je třeba doplňovat další vhodné rostlinné (ořechy, cereálie) i živočišné zdroje podporující prostaglandinovou dráhu. Uvedené skutečnosti by měly být součástí preventivních informačních kampaní pro veřejnost s důrazem na specifické podmínky v české populaci.

Celkově lze z dosažených výsledků konstatovat, že antioxidační systém aerobního organismu tvoří vzájemně propojenou síť nízkomolekulárních a enzymových antioxidantů, které zasahují do řady buněčných procesů. Změny vnějších podmínek, případně zvýšený přísun esenciálních antioxidantů většinou ovlivňuje komplexně regulovanými drahami i řadu dalších metabolických parametrů a drah, jako je metabolismus sacharidů, lipidů a transportní děje. Rozvoj metod postihujících aktivitu antioxidačního komplexu i jeho složek je stále aktuální problematikou významnou k pochopení základních metabolických regulací a odezvy organismů na fyziologické i patologické či stresové faktory.

Právě rozvoj metod a jejich aplikace byly cílem předložené práce, jejímž účelem bylo přispět k poznatkům o regulaci redoxních procesů v živých systémech a některých metodách jejího sledování.

7. ZÁVĚRY

- Předložená práce byla zaměřena na studium vybraných enzymových i neenzymových antioxidantů v různých typech biologického materiálu se zvláštním zaměřením na enzymy zapojené v regulaci oxidačního stresu.
- V první části práce byly optimalizovány metody extrakce a stanovení vybraných nízkomolekulárních i enzymových antioxidantů v různých druzích biologického materiálu. Optimalizované metody byly aplikovány při analýzách antioxidantů v ječmeni a ve sladu v souvislosti se studiem aktivace antioxidačních mechanismů v závislosti na vnějších faktorech. Druhá část práce byla zaměřena na sledování změn enzymových i nízkomolekulárních antioxidantů u humánních souborů za účelem posouzení vztahů mezi aktivitami jednotlivých složek antioxidačního komplexu po dočasné exogenní suplementaci antioxidanty.
- Účelem optimalizace metod stanovení aktivity enzymů bylo umožnit rychlé a rutinní stanovení velkého množství vzorků s potenciálním využitím automatického analyzátoru. Tento však pracuje pouze ve viditelné oblasti spektra, proto byly metody stanovení v UV oblasti srovnány s kolorimetrickými metodami. Dále byly optimalizovány podmínky stanovení s ohledem na daný biologický materiál.
- Stanovení aktivity katalasy UV metodou bylo srovnáno s kolorimetrickou metodou využívající molybdenanu amonného podle Góthovy metody; obě metody vykazovaly na standardu katalasy významnou pozitivní korelaci. Optimalizace stanovení aktivity lipoxygenasy byla prováděna dle Jiangovy metody; metoda byla srovnávána s původním UV stanovením. V tomto případě nebyla potvrzena vyšší citlivost kolorimetrické metody a proto byla k analýzám reálných vzorků používána nadále UV metoda.
- Stanovení aktivity superoxiddismutasy bylo testováno nepřímými kolorimetrickými metodami využívajícími tetrazoliové soli – NBT a INT. Obě vykazovaly silnou pozitivní korelaci a ukázaly se být vhodné pro měření vzorků, avšak metoda NBT vykazovala větší rozptyl naměřených výsledků. Metoda INT byla zvolena pro měření reálných vzorků též z důvodu dostupnosti komerčního setu se stabilizovanými činidly. Validace metody RANSOD potvrdila nejistotu do 12% a opakovatelnost do 7% za různých podmínek stanovení.
- Aktivita peroxidasy byla optimalizována pomocí Nishiokovy metody za použití substrátu guaiacolu; pro ověření informací o faktorech ovlivňujících toto stanovení s guaiacolem byly testovány optimální pH, teplotní stabilita enzymu a optimální koncentrace enzymu i substrátu. Z časové závislosti na koncentraci guaiacolu byla vypočítána počáteční rychlost reakce V_0 a Michaelisova konstanta K_M .
- Pro optimalizaci stanovení celkové antioxidační aktivity zkoumaného materiálu byly vyzkoušeny metody ABTS a TRAP. Mezi oběma metodami byla nalezena pouze slabá pozitivní korelace. Výsledky obou metod se sice řádově nelišily, avšak u většiny vzorků byly hodnoty získané metodou ABTS vyšší. Pro rutinní stanovení byla zvolena metoda ABTS z důvodu dostupnosti komerčního setu a možnosti automatizace. Metoda TRAP

je vhodná pro výzkumné účely a pro stanovování široké škály vzorků pocházejících z různých matric.

- Po optimalizaci metod byly analyzovány enzymy v reálných vzorcích. V první části práce byly sledovány hladiny antioxidantů v ječmeni a sladu za účelem posouzení kvality vstupní suroviny pro výrobu piva.. Stanovení aktivity superoxiddismutasy v ječmeni a ve sladu bylo prováděno komerčním diagnostickým setem. Sladování zřejmě způsobuje aktivaci antioxidantů v obilce ječmene; aktivita SOD ve sladu byla vždy vyšší než v ječmeni. Největší vliv na aktivitu SOD má odrůda ječmene; nejvyšší hodnoty SOD byly nalezeny v odrůdách Bojos a Jersey, nejnižší u odrůdy Radegast. Dalšími faktory ovlivňujícími aktivitu SOD mohou být klimatické podmínky, infekce, fungicidy, případně typ předplodiny.
- Aktivita katalasy u sledovaných vzorků byla naměřena vyšší ve sladu než v ječmeni. Největší vliv na aktivitu měly pravděpodobně povětrnostní podmínky; nebyla zjištěna odrůdová závislost ani vliv pěstební lokality.
- Naměřené aktivity peroxidasy u sledovaných vzorků opět potvrdily významnou aktivaci enzymu během sladování ječmene. Nejvyšší aktivity POD byly nalezeny v odrůdě Malz, nejnižší v odrůdě Sebastian.
- Analýzy nízkomolekulárních antioxidantů - vitaminu E, luteinu a β -karotenu v obilkách ječmene a sladu potvrdily výraznou aktivaci i těchto antioxidantů během sladování ječmene. Nejvyšší obsahy sledovaných látek byly naměřeny v odrůdě Jersey. Nebyly nalezeny významné rozdíly v hladinách v závislosti na pěstební lokalitě.
- Souhrnně lze uzavřít, že patrně největší vliv na hladiny nízkomolekulárních i enzymových antioxidantů v ječmeni mají klimatické podmínky v dané pěstební lokalitě. Aktivita antioxidantů v obilkách ječmene prudce narůstá během procesu sladování; v obilce probíhá zvýšená metabolická aktivita, během níž lze předpokládat zvýšenou tvorbu radikálů. Za tímto účelem mohou být aktivovány ostatní antioxidační systémy, aby ochránily buňky před poškozením oxidačním stresem. Před formulováním obecnějších závěrů je třeba další ověření a zejména dlouhodobější sledování změn aktivity enzymů i neenzymových antioxidantů v závislosti na působení exogenních faktorů po dobu několika následujících let.
- Ve druhé části práce byly navrženy a organizačně zajištěny dva klinické experimenty prováděné ve spolupráci s oddělením klinické biochemie nemocnice v Kyjov, privátní laboratoří Vetlab v Brně a s laboratoří speciálních analýz Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Brně.
- První klinická studie byla zaměřena na vliv podávání přírodního preparátu obsahujícího polynenasycené mastné kyseliny a vitamin E na metabolismus a oxidační status osob s hyperlipidemií. Zúčastnilo se 38 dobrovolníků rozdělených do čtyř skupin podle předběžného screeningu jejich lipidového profilu. Prvním třem skupinám byl v daném období podáván potravinový doplněk obsahující polynenasycené mastné kyseliny a vitamin E (EPA Nature Bounty, složení preparátu v tab. 26, str. 102).

- V rámci první klinické studie byly optimalizovány metody stanovení enzymových antioxidantů v séru a dále metody stanovení nízkomolekulárních antioxidantů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie, produktů pokročilé oxidace proteinů a pokročilé glykace pomocí spektrofluorimetrie a spektrofotometrie a dále metoda stanovení individuálních mastných kyselin v krevním séru využívající plynovou chromatografii s FID detekcí..
- U obou rizikových skupin byly po suplementaci zjištěny statisticky významné změny lipidových parametrů; u skupiny hyperlipidemiků nastal signifikantní pokles hladin celkového cholesterolu, LDL i triacylglycerolů. Hypercholesterolemici vykazovali pokles hladin triacylglycerolů. U skupiny zdravých jedinců a kontrolní skupiny výrazné změny nenastaly.
- Analýza nízkomolekulárních antioxidantů ukázala zvýšení hladin retinolu a α -tokoferolu u suplementovaných skupin těsně po ukončení podávání preparátu. Kontrolní skupina naopak vykazovala během sledovaného období pokles hladin všech parametrů a jejich nárůst na konci experimentu.
- U rizikových skupin byly nalezeny výrazně vyšší hladiny produktů oxidace proteinů nežli skupiny zdravých jedinců; během trvání experimentu hladiny AOPP a AGE klesly. Výsledky těchto parametrů nepřímo charakterizujících oxidační stav organismu svědčí o propojení metabolismu lipidů a mechanismů regulace oxidačních procesů.
- Analýza mastných kyselin v séru ukázala pokles nasycených mastných kyselin, hlavně kyseliny palmitové (C16:0) a stearové (C18:0). U řady nenasycených mastných kyselin došlo během podávání preparátu k nárůstu hladin a po ukončení užívání k opětovnému poklesu, zvláště u kyseliny linolové (C18:2 ω 6) a olejové (C18:1 ω 9). Podobné změny nastaly u kyseliny dokosaheksaneové (C22:6 ω 3) a eikosanoidů. Byl zaznamenán výrazný nárůst kyseliny nervonové (C24:1 ω 9) ve všech suplementovaných skupinách.
- Podávaný potravinový doplněk obsahuje vysoké množství PUFA; omega-3-nenasycené mastné kyseliny mají vliv na snižování hladiny triacylglycerolů, zabraňují v krevním řečišti shlukování a usazování aterosklerotických plátů, mají protizánětlivé a protisrážlivé účinky. V kombinaci s vitamínem E, který zabraňuje jejich oxidaci reaktivními formami, jsou prezentovány jako účinný potravinový doplněk při prevenci aterosklerosy. Podle výsledků této studie je možné regulovat hladiny lipidů a mastných kyselin pravidelným přísunem PUFA a tokoferolu přímým požíváním rybích produktů nebo ve formě potravinového doplňku.
- Druhá klinická studie byla zaměřena na sledování změn antioxidantů v souvislosti s příjmem přirozených zdrojů v čerstvé formě. Jako zdroj antioxidantů byla využita jablka v množství 500 g denně. Experimentu se zúčastnilo celkem 16 osob – první skupina (n = 8) doplňovala každý den svoji stravu o jablka po dobu dvou měsíců, druhá skupina (n = 8) sloužila jako kontrolní soubor.
- Během sledované doby došlo u obou skupin k signifikantnímu poklesu hladin cholesterolu na fyziologické hodnoty; došlo rovněž k výraznému poklesu hladin kyseliny močové. Hladiny nízkomolekulárních antioxidantů se v závislosti na příjmu jablek nezměnily. Byly

zvýšeny hladiny celkových flavonoidů u suplementované skupiny během experimentu. U suplementované skupiny došlo v uvedeném období k mírnému nárůstu aktivity katalasy, kontrolní skupina naopak vykazala poměrně výrazný pokles.

- Získané výsledky ukázaly, že v deficientním období nestačí zvýšený příjem jablek k pokrytí hladin antioxidantů tak, jako u podávání vitaminů. Nejvhodnějším řešením se jeví trvalý přísun antioxidantů v přirozených zdrojích s ohledem na složení a typ zdroje; je třeba rozšířit zejména příjem zeleniny i nenasycených mastných kyselin, podobně je třeba doplňovat další vhodné rostlinné i živočišné zdroje podporující prostaglandinovou dráhu.
- Antioxidační systém aerobního organismu tvoří vzájemně propojenou síť nízkomolekulárních a enzymových antioxidantů, které zasahují do řady buněčných procesů. Rozvoj metod postihujících aktivitu antioxidačního komplexu i jeho složek je stále aktuální problematikou významnou k pochopení základních metabolických regulací a odezvy organismů na fyziologické i patologické či stresové faktory.

8. LITERATURA

- [1] Štípek Stanislav a kolektiv: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. Grada Publishing s.r.o., Praha 2000.
- [2] Riley, P.A.: Free radicals in biology; oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 1994, vol. 65 (1), p. 27-33.
- [3] Darley-Usmar, V., Halliwell, B.: Blood Radicals. Reactive Nitrogen Species, Reactive Oxygen Species, Transition Metal Ions and Vascular System. *Pharmaceutical Research*, 1996, vol. 13, p. 649-662.
- [4] Hansford, R.G., Hogue, B.A., Mildazeine, V.: Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 1997, vol. 29, p. 89-95.
- [5] Koop, D.R.: Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *The FASEB Journal*, 1992, vol. 6, p. 724-730.
- [6] Beckman, K.B., Ames, B.N.: The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiological Reviews*, 1998, vol. 78, p. 547-581.
- [7] Babior, B.M.: Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *New England Journal of Medicine*, 1978, vol. 298, p. 659-668.
- [8] Halliwell, B.H., Gutteridge, J.M.C.: Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press. 1999.
- [9] Green, M.J., Hill, H.A.O.: Chemistry of Dioxygen. *Methods in Enzymology*, 1984, vol. 105, p. 3-22.
- [10] Fridovich, I.: Superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, vol. 264, p. 7761-7764.
- [11] McCord, J.M., Russell, W.J.: Inactivation of Creatine Phosphokinase by Superoxide During Reperfusion Injury. *Basic Life Science*, 1988, vol. 49, p. 869-873.
- [12] Halliwell, B.: How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research Communications*, 1990, vol. 9, p. 1-32.
- [13] Halliwell, B.H., Gutteridge, J.M.C.: Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1986, vol. 246, p. 501-514.
- [14] Oya, Y., Yamamoto, K.: The biological activity of hydrogen peroxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1987, vol. 148, p. 120-125.
- [15] Gille, G., Sigler, K.: Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiologica*, 1995, vol. 40 (2), p. 131-152.
- [16] Hampl, V.: Úloha oxidu dusnatého v normálním plicním oběhu a při plicní hypertenzi. Habilitační práce, LFUK Praha, 1997.
- [17] McCall, T., Vallance, P.: Nitric oxide takes centre-stage- with newly defined roles. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1992, vol. 13 (1), p. 1-6.
- [18] Stahl W., Sies, H.: Antioxidant defense: Vitamin E and C and carotenoids. *Diabetes*, 1997, vol. 46 (2), p. 14-17.
- [19] Rice-Evans, C.A., Bruckdorfer, K.: Free radicals, lipoproteins and cardiovascular dysfunction. *Molecular Aspects of Medicine*, 1992, vol. 13, p. 1-111.

- [20] Esterbauer, H., Jurgens, G., Quehenberger, O.: Modification of Human Low Density Lipoprotein by Lipid Peroxidation. *Basic Life Science*, 1988, vol. 49, p. 369-373.
- [21] Vick, B.A., Zimmermann, D.C.: Oxidative systems for the modification of fatty acids. *Biochemistry of Plants*, 1987, vol. 9, p. 53-90.
- [22] Marnett, L.J.: Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*, 1999, vol. 424 (1-2), p. 83-95.
- [23] Vickers, T., Young I.S., McEnery, J.: Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions*, 2001, vol. 29 (Pt 2), p. 358-362.
- [24] Kopoldova, J., Liebster, J. Babicky, A.: The mechanism of the radiation chemical degradation of amino acids. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes*, 1963, vol. 14, p. 455-460.
- [25] Aeschbach, R., Amado, R., Neukom, H.: Formation of dityrosine cross-links in proteins by oxidation of tyrosine residues. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1976, vol. 439 (2), p. 292-301.
- [26] Dale, W.M., Davies, J.V., Gilbert C.W.: The kinetics and specificities of deamination of nitrogenous compounds by X-radiation. *Biochemical Journal*, 1949, vol. 45, p. 93-99.
- [27] Dean R.T., Fu S., Stocker R., Davies M.J.: Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal*, 1997, vol. 324, p. 1-18.
- [28] Neuzil J., Gebicki J.M., Stocker R.: Radical-induced chain oxidation of proteins and its inhibition by chainbreaking antioxidants. *Biochemical Journal*, 1993, vol. 293, p.601-606.
- [29] Brownlee M.: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001, vol. 414, p. 813-820.
- [30] Wang, D., Kreutzer, D.A., Essigmann, J.M.: Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutation Research*, 1998, vol. 400, p. 99-115.
- [31] Halliwell Barry: A Super Way to Kill Cancer Cells? *Nature Medicine* 2000, vol. 6, p. 1105-1106.
- [32] Racek, J. Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění. Galen Praha, 2003.
- [33] Piterková, J., Tománková, K., Luhová, L. Petřivalský M., Peč P.: Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chemické Listy*, 2005, vol. 99, p. 455 – 466.
- [34] Halliwell, B.H., Gutteridge, J.M.C.: The definition and measurements of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology & Medicine*, 1995, vol. 18, p. 125-126.
- [35] Halliwell, B.: Protection against tissue damage in vivo by desferrioxamine: What is its mechanism of action? *Free Radical Biology & Medicine*, 1989, vol. 7, p. 645-651.
- [36] Bannister, J.V., Bannister, W.H. Hill, H.A.O., Mahood, J.F., Willson, R.L., Wolfenden, B.S.: Does caeruloplasmin dismutate superoxide? *FEBS Letters*, 1980, vol. 118, p. 127-129.
- [37] Ďuračková Z.: Volné radikály a antioxidanty v medicíně (I), Slovak Academic Press, Bratislava, 1998.

- [38] Hasnain, S.S., Strange, R.W.: Marriage of XAFS and crystallography for structure-function studies of metalloproteins. *Journal of Synchrotron Radiation*, 2003, vol. 10, p. 9-15.
- [39] Cisnetti F.: Mn human mitochondrial superoxide dismutase & Active site of Mn human mitochondrial superoxide dismutase. [online]. 2006, Last revision 28th of November 2006. Dostupné z: www.search.com/reference/Superoxide_dismutase.
- [40] Neidleman, S.L., Geigert J.: Biohalogenation - principles, basic roles and applications; Ellis Horwood Ltd Publishers; Chichester; 1986.
- [41] Regalado, C., García-Almendárez, B.E., Duarte-Vázquez, M.A.: Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochemistry Reviews*, 2004, vol. 3 (1-2), p. 243-256.
- [42] Berglund, G.I., Carlsson, G.H., Smith, A.T., Szoke, H., Henriksen, A., Hajdu, J.: The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature*, 2002, vol. 417, p. 463-468.
- [43] Karpińska-Kulikowska, E., Jakoniuk-Moniuszko, J.: The Antioxidative Barrier in the Organism. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2004, vol. 13 (1), p. 5-13.
- [44] Lenartova, V., Holovska, K., Pedrajas, J.R., Martinez-Lara, E., Peinado, J., Lopez-Barea, J., Rosival, I., Kosut, P.: Antioxidant and detoxifying fish enzymes as biomarker of river pollution. *Biomarkers*, 1997, vol. 2, p. 247-252.
- [45] Kraulis, P.J.: MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 1991, vol. 24, p. 946-950.
- [46] Vossman: Catalase protein structure rendering based on PDB id. [online] 2009, Last revision 1st of March 2009. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Catalase_Structure.png
- [47] Deisseroth, A., Dounce, A.L.: Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis and physiological role. *Physiological Reviews*, 1970, vol. 50 (3), p. 319-375.
- [48] Zamocky, M., Koller, F.: Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1999, vol. 72, p. 19-66.
- [49] Velíšek, J.: Chemie potravin 2. Osis Tábor, 1999.
- [50] McKersie, Brian D.: Oxidative Stress. [online] 1996. Dostupné z: www.plantstress.com.
- [51] Cyberlipid Center: Resource site of lipid studies. [online]. Last update: 12th of July 2010. Zdroj: <http://www.cyberlipid.org/vite/vite0001.htm>.
- [52] Stallcup, O.T., Herman, H.A.: In Vitro Studies on the Conversion of Carotene to Vitamin A in Dairy Calves. *Journal of Dairy Science*, 1950, vol. 33 (4), p. 237-242.
- [53] Oregon State University: Linus Pauling Institute – Micronutrient information center. [online]. Zdroj: <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/carotenoids/>.
- [54] Velíšek J.: Chemie potravin 3, 1. vyd. Osis Tábor, 1999.
- [55] Lakhanpal, P., Rai, D.K.: Quercetin: a versatile flavonoid. *Internet Journal of Medical*, 2007, vol. 2 (2).
- [56] The Mildred E. Mathias Botanical Garden. [online], 2010. Dostupné z: www.botgard.ucla.edu.

- [57] Oregon State University: Linus Pauling Institute – Micronutrient information center. [online]. Zdroj: <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/othernuts/la/lastructure.html>.
- [58] Kodíček, M.: Glutathion. Biochemické pojmy: výkladový slovník [online]. 2007. Zdroj: [www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=glutathion>](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=glutathion).
- [59] Oregon State University: Linus Pauling Institute – Micronutrient information center. [online]. Zdroj: <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/minerals/selenium/gsh.html>.
- [60] Oregon State University: Linus Pauling Institute – Micronutrient information center. [online]. Zdroj: <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/othernuts/coq10/coqstructure.html>.
- [61] Neuzil, J., Stocker, R.: Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for α -tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein peroxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, vol. 269, p. 16712-16719.
- [62] Di Mascio, P., Devasagayam, TP., Kaiser, S.: Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers. *Biochemical Pharmacology*, 1998, vol. 56, p. 1054-1056.
- [63] Dinan, F.J.: Bilirubin: E-/Z-, but not easy. [online] 2003. Dostupné z: www.sciencecases.org/bilirubin/bilirubin.asp.
- [64] The Pherobase: Database of pheromones and semiochemicals. [online]. 2010. Dostupné z: <http://www.pherobase.com/database/synthesis/synthesis-detail-uric%20acid.php>.
- [65] Rosypal, S.: Úvod do molekulární biologie. 2. vyd. Brno 1997.
- [66] Peč, P.: Laboratorní cvičení z biochemie. UP, Olomouc. 2000.
- [67] Holková I., Bezáková L., Vanko M., Bilka F., Obložinský M.: Lipoxxygenases and their significance in biochemical processes in plant organisms. *Chemické Listy*, 2009, vol. 103, p. 487-495.
- [68] Porta H., Rocha-Sosa M.: Plant Lipoxxygenases. Physiological and Molecular Features. *Plant Physiology*, 2002, vol. 130, p. 15-21.
- [69] Rustérucci, Ch., Montillet, J.L., Agnel, J.P., Battesti, Ch., Alonso, B., Knoll, A., Bessoule, J.J., Etienne, P., Suty, L., Blein, J.P., Triantaphylides, Ch.: Involvement of Lipoxxygenase-dependent Production of Fatty Acid Hydroperoxides in the Development of the Hypersensitive Cell Death induced by Cryptogein on Tobacco Leaves. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, vol. 274 (51), p. 36446-36455.
- [70] Worthington Biochemical Corporation – Enzyme manual. [online], 2010. Dostupné na: <http://www.worthington-biochem.com/TY/default.html>.
- [71] Ošťádalová M., Pažout, V., Straka, I.: Determination of catalytic activity of polyphenol oxidase from commercial sorts of teas. *Acta fytotechnica et zootechnica Nitra*, 2009, mimoriadne číslo, str. 525-530.
- [72] Duckworth, H. W.; Coleman, J. E.: Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase. *Journal of Biological Chemistry*, 1970, vol. 245, p. 1613–1625.
- [73] Virador, V.M., Reyes Grajeda, J.P., Blanco-Labra, A., Mendiola-Olaya, E., Smith, G.M., Moreno, A., Whitaker, J.R.: Cloning, sequencing, purification, and crystal structure of Grenache (*Vitis vinifera*) polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, vol. 58, p. 1189-1201.
- [74] Weil, J., Bolton, J., Wertz, J.: Electron Paramagnetic Resonance. Elementary Theory and Practical Applications. NY Wiley, 1994.

- [75] Marklund, S.: Spectrophotometric Study of Spontaneous Disproportionation of Superoxide Anion Radical and Sensitive Direct Assay for Superoxide Dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 1976, vol. 251, p. 7504-7507.
- [76] McCord, J., Fridovich, I.: Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erythrocyte (Hemoglobin). *Journal of Biological Chemistry*, 1969, vol. 244, p. 6049-6055.
- [77] Butler, J., Koppenol, W., Margoliash, E.: Kinetics and Mechanism of the Reduction of Ferricytochrome c by Superoxide Anion. *Journal of Biological Chemistry*, 1982, vol. 257, p. 10747-10750.
- [78] Štípek, S., Crkovská, J., Dvořák, V.: Spektrofotometrické stanovení superoxiddismutasy řízené PC programem sestaveným v prostředí LabWindows. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 1995, vol. 3, str. 93-97.
- [79] Grootveld, M., Halliwell, B.: An Aromatic Hydroxylation Assay for hydroxyl Radicals Utilizing HPLC. *Free Radical Research Communications*, 1986, vol. 1, p. 243-250.
- [80] Aebi, H.: Catalase. Methods of enzymatic analysis. *Weinheim: Verlag Chemie*, 1974, p. 673-684.
- [81] Corbett, J.: The Scopoletin Assay for Hydrogen Peroxide: A Review and a Better Method. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1989, vol. 256, p. 297-308.
- [82] Paulová H., Bochořáková H., Táborská E.: Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické Listy*, 2004, vol. 98, p. 174-179.
- [83] Zima, T., Štípek, S., Crkovská, J.: Stanovení produktu lipoperoxidace – malondialdehydu – v biologickém materiálu spektrofotometricky a HPLC. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 1995, vol. 3 (24), p. 98-102.
- [84] Goldring Ch., Casini A.F., Maellaro E., Del Bello B., Comporti M.: Determination of 4-hydroxynonenal by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Lipids*, 1993, vol. 28 (2), p. 141-145.
- [85] Esterbauer, H., Cheeseman, K.H.: Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, 1992, vol. 186, p.407-421.
- [86] Keller R.J., Halmes Ch.N., Hinson J.A., Pumford N.R.: Immunochemical detection of oxidized proteins. *Chemical Research in Toxicology*, 1993, vol. 6, p. 430-433.
- [87] Castegna A., Drake J., Pocernich C., Butterfield D.A.: Protein carbonyl levels – an assesment of protein oxidation. *Methods in Pharmacology and Toxicology*, 2003, p.161-168.
- [88] Levine R.L., Garland D., Oliver C.N.: Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 1990, vol. 186, p. 464-478.
- [89] Dean R.T., Giese S., Davies M.J.: Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 1993, vol. 18, p. 437-441.
- [90] Henle, T., Deppisch, R., Beck, W., Hergesell, O., Hänsch, G.M., Ritz, E.: Advanced glycated end-products during haemodialysis treatment: discrepant results with different methodologies reflecting the heterogeneity of AGE compounds. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 1999, vol. 14, p. 1968-1975.

- [91] Kalousová M., Škrha J., Zima T.: Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with Diabetes mellitus. *Physiological Research*, 2002, vol. 51, p. 597-604.
- [92] Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Khoa T.N., Capeillère-Blandin, Ch., Nguyen, A.T., Canteloup, S., Dayer, J.M., Jungers, P., Drüeke, T., Descamps-Latscha, B.: Advanced oxidation protein products as novel mediator of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *Journal of Immunology*, 1998, vol. 161, p. 2425-2532.
- [93] Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, Ch., Khoa T.N., Nguyen, A.T., Zingraff, J., Jungers, P., Descamps-Latscha, B.: Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International*, 1996, vol. 49, p. 1304-1313.
- [94] Griffiths H.R., Lunec J.: The effects of oxygen free radicals on the carbohydrate moiety of IgG. *FEBS Letters*, 1989, vol. 245, p. 95-99.
- [95] Valavanidis A., Vlachogianni T., Fiotakis C.: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health*, 2009, vol. 27, p. 120-139.
- [96] Janebová M., Zima T.: Methods for determination of vitamins A and E. Simple assay. *Sborník lékařský*, 1997, vol. 98, p. 195-208.
- [97] Beers. R.F., Sizer, I. W.: A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1951, p. 133-140.
- [98] Worthington Biochemical Corporation – Enzyme manual. [online], 2010. Dostupné na: <http://www.worthington-biochem.com/CTL/assay.html>
- [99] Fossati, P., Prencipe, L., Berti, G.: Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clinical Chemistry*, 1980, vol. 26, p. 227-231.
- [100] Góth, L.: A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*, 1991, vol. 196, p. 143-152.
- [101] Paglia, D.E. and Valentine, W.N.: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1967, vol. 70, p. 158-169.
- [102] Nákielná, J., Diopan, V., Fabrik, I., Večerek, M., Kratochvílová, P., Vašátková, A., Adam, V., Zeman, L., Kizek, R.: Měření glutathionperoxidasy, katalasy a superoxiddismutasy pomocí automatizovaného postupu jako ukazatele oxidační zátěže. *Sborník příspěvků, XXXII Brněnské onkologické dny*, 2008, str. 49-52.
- [103] Pascual, P., Martinez-Lara, E., Bárcena, J.A., López-Barea, J., Toribio, F.: Direct assay of glutathione peroxidase activity using high-performance capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 1992, vol. 581(1), p. 49-56.
- [104] Strauss, W.: Colorimetric Analysis with N,N-Dimethyl-p-phenylenediamine of the Uptake of Intravenously Injected Horseradish Peroxidase by Various Tissues of the Rat. *Journal of Biophysical and Biochemical cytology*, 1958, Vol. 4 (5), p. 541-550.
- [105] Nishioka, T., Maki, K., Kimura, M., Takahama, U.: Determination of salivary peroxidase activity in human mixed whole saliva. *Archives of Oral Biology*, 2003, vol. 48 (5), p. 397-400.

- [106] Josephy, P.D., Eling, T., Mason, R.P.: The Horseradish Peroxidase catalyzed Oxidation of 3,5,3'5'-Tetramethylbenzidine. *Journal of Biological Chemistry*, 1982, vol. 257, p. 3669- 3675.
- [107] Hatcher, D.W., Barker, W.: A rapid microassay for determination of peroxidase in wheat and flour. *Cereal Chemistry*, 2005, vol. 82 (2), p. 233-237.
- [108] Henry Tauber: Oxidation of pyrogallol to purpurogallin by crystalline catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 1953, vol. 205, p. 395-400.
- [109] Kamidate, T., Komatsu, K., Tani, H., Ishida, A.: Direct determination of horseradish peroxidase encapsulated in liposomes by using luminol chemiluminescence. *Analytical Sciences*, 2008, vol. 24 (4), p. 477-481.
- [110] Bolann, B.J., Tangerås, A., Ulvik, R.J.: Determination of Manganese Superoxide Dismutase Activity by Direct Spectrophotometry. *Free Radical Research*, 1996, vol. 25 (6), p. 541 – 546.
- [111] Lozovskaya, E.L., Vartanyan, L.S.: Superoxide Dismutase: Determination of Activity by Inhibition of Photosensitized Chemiluminescence of Glycyltryptophan. *Biochemistry (Mosc)*, 2000, vol. 65(5), p. 599-603.
- [112] Ravindranath, S.D., Fridovich, I.: Isolation and characterization of manganese-containing superoxide dismutase from yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 1975, vol. 250 (15), p. 6107-6112.
- [113] Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K.U., Locke, S.: Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. *FEBS Letters*, 1985, vol. 187. p. 33–37.
- [114] Uotila, J.T.; Kirkkola A.L.; Rorarius, M.; Tuimala, R. J.; Metsä-Ketelä, T.: The total peroxy radical-trapping ability of plasma and cerebrospinal fluid in normal and preeclamptic parturients. *Free Radical Biology & Medicine*, 1994, vol. 16, p. 581-590.
- [115] 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 Radical Biology & Medicine*, 1998, vol. 25, p. 9-18.
- [116] Rice-Evans, C., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramlez, P.M., Pridham, J.B.: The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 1995, vol. 22, p. 375-383.
- [117] Espin, J.C., Soler-Rivas, C., Wichers, H.J.: Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, vol. 48, p. 648-656.
- [118] Yokozawa, T., Chen, C.P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G.I., Nishioka, I.: Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2 picrylhydrazyl radical. *Biochemical Pharmacology*, 1998, vol. 56 (2), p. 213-222.
- [119] du Toit, R., Volsteadt, Y., Apostolides Z.: Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents. *Toxicology*, 2001, vol. 166, p. 63-69.

- [120] McDonald C. E.: Lipxygenase and lutein bleaching activity of durum wheat semoline. *Cereal Chemistry*, 1979, vol. 56, p. 84-89.
- [121] Kvasnička F., Skřivan P., Janiczková T.: Stanovení aktivity lipxygenasy metodou kapilární izotachoforézy. *Potravinářské vědy*, 1989, vol. 7, p. 7-14.
- [122] Mitsuda, H., Yasumoto, K.: Study of soybean lipxygenase I. Preparation of crystalline enzyme by gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 1980, vol. 202, p. 313-316.
- [123] Jiang, Z.Y., Woollard, A.C.S., Wolff, S.P.: Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*, 1991. vol. 26 (10), p. 853-856.
- [124] Anthon, G.E., Barrett, D.: Colorimetric method for the determination of lipxygenase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, vol. 49, p. 32-37.
- [125] Rescigno, A., Sanjust, E., Pedulli, G.F., Valgimigli, L.: Spectrophotometric Method for the Determination of Polyphenol Oxidase Activity by Coupling of 4-tert-Butyl-o-Benzoquinone and 4-Amino-N,N-Diethylaniline. *Analytical Letters*, 1999, vol. 32 (10), p. 2007 – 2017.
- [126] Štulík Karel a kolektiv: Analytické separační metody. Karolinum Praha, 2005.
- [127] Klouda, P. Moderní analytické metody. Ostrava, 2003.
- [128] Coufal, P.: Separační metody. Zdroj: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf>
- [129] Li, L., Chen, C.Y.O., Chun, H.K., Cho, S.M., Park, K.M., Lee-Kim, Y.Ch., Blumberg, J.B., Russel, R.M., Yeum, K.J.: A fluorometric assay to determine antioxidant activity of both hydrophilic and lipophilic components in plant foods. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2009, vol. 20, p. 219-226.
- [130] Hernychová, L.: Základy hmotnostní spektrometrie. Univerzita obrany, Hradec Králové.
- [131] Sommer, L. Základy analytické chemie II. VUTIUM Brno, 2000.
- [132] Mass Spectrometry. <http://www.uwec.edu/boulteje/Boulter103Notes/18September.htm>
- [133] Tesařová, E.: HPLC. Zdroj: <http://web.natur.cuni.cz/~tesarove/hplc.pdf>
- [134] HPLC Center. Zdroj: <http://www.idex-hs.com/support/upchurch/i/hplcDiagram.gif>
- [135] Chromatografické fórum. Zdroj: <http://www.hplc.cz/>
- [136] Plynová chromatografie. Zdroj: <http://www.chemi.muni.cz/~literak/uvod.pdf>
- [137] Gas Chromatography. Zdroj: <http://www.etslabs.com/images/methods/11.gif>
- [138] Březinová-Belcredi, N., Ehrenbergerová, J., Prýma, J., Havlová, P.: Stanovení aktivity enzymu superoxiddismutasy pomocí soupravy RANSOD v rostlinném materiálu. *Chemické Listy*, 2007, vol. 101, p. 504-508.
- [139] Munch, G., Keis, R., Wessels, A., Riederer, P., Bahner, U., Heidland, A., Niwa, T., Lemke, H.D., Schinzel, R.: Determination of advanced glycation end products in serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 1997, vol. 35 (9), p. 669-677.
- [140] Prýma J., Ehrenbergerová J., Belcrediová N., Vaculová K.: Tocol content in Barley. *Acta Chimica Slovenica*, 2007, vol. 54, p. 102-105.
- [141] Zloch, Z.: Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu. [online] 2004. <http://www.institut-danone.cz/data/studie/pridelene-granty/2004-03.pdf>.

- [142] Kang, J. X., Wang J.: A simplified method for analysis of polyunsaturated fatty acids. *BMC Biochemistry*, 2005. Dostupné na: <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/6/5>.
- [143] Hendl, J.: Přehled statistických metod zpracování dat. Portál Praha, 2004.
- [144] Sun Y., Oberley L.W., Li Y.: A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 1988, vol. 34 (3), p. 497 – 500.
- [145] Browne, R. W., Armstrong D.: Simultaneous Determination of Serum Retinol, Tocopherols, and Carotenoids by HPLC. *Methods in Molecular Biology*, 1998, vol. 108, p. 269-275.
- [146] Cavina, G., Gallinella, B., Porrà, R., Pecora, P., Suraci, C.: Carotenoids, retinoids and alpha-tocopherol in human serum: Identification and determination by reversed-phase HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1998, vol. 6 (3), p. 259-269.
- [147] Appelqvist, L.A.: Lipids in Cruciferae. *The Biology and the Chemistry of Cruciferae*. 1976, pp. 221-277.
- [148] Phillipson, B.E., Rothrock, D.W., Connor, W.E., Harris, W.S., Illingworth, D.R.: Reduction of plasma lipids and apoproteins by dietary fish oils in patients with hypertriglyceridemia. *The New England Journal of Medicine*, 1985, vol. 312 (19), p. 1210-1216.
- [149] Radimer K., Bindewald B., Hughes J., Ervin B., Swanson C., Picciano M.: Dietary supplement use by US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. *American Journal of Epidemiology*, 2004, vol. 160 (4), p. 339-349.
- [150] Stanner SA, Hughes J, Kelly CN, Buttriss J (2004). "A review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis'". *Public Health Nutrition*, 2004, vol. 7 (3), p. 407-422.
- [151] Cherubini A., Vigna G., Zuliani G., Ruggiero C., Senin U., Fellin R.: Role of antioxidants in atherosclerosis: epidemiological and clinical update. *Current Pharmaceutical Design*, 2005, vol. 11 (16), p. 2017–2032.
- [152] Bamforth, C.W., Muller, R.E. & Walker, M.D.: Oxygen and oxygen radicals in malting and brewing: a review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 1993, vol. 51, p. 79-88.
- [153] Maehly A., Chance B.: The assay of catalases and peroxidases. *Methods of Biochemical Analysis*, 1954, vol. 1, p. 357-424.
- [154] Schomberg D., Salzmann M., Stephan D.: Enzyme handbook 7. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1993.
- [155] Pütter J., Becker R.: Peroxidases. *Methods of Enzymatic Analysis*, 1983, vol. 3, p. 286-293.
- [156] Macuchová S., Mikulíková R., Márová I., Češková I.: Gas chromatography analysis of fatty acids in breast milk in a sample of czech population. *Book of Abstracts and Abbreviated Papers*, 2007, 13th International Symposium On Separation Sciences, Štrbské Pleso, Slovensko, p. 1-4.
- [157] Harris, W.S.: n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1997, vol. 65 (5), p. 1645-1654.

- [158] Sanders, T.A.B., Oakley, F.R., Miller, G.J., Mitropoulos, K.A., Crook, D., Oliver, M.F.: Influence of n-6 versus n-3 polyunsaturated fatty acids in diets low in saturated fatty acids on plasma lipoproteins and hemostatic factors. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1997, vol 17 (12), p. 3449–3460.
- [159] Márová I., Macuchová S., Kotrla R., Ptáček P.: Influence of intake of complex antioxidants on metabolic status in non-insulin dependent diabetics. *The FEBS Journal*, 2004, vol. 271 (1), p. 231.
- [160] Márová I., Macuchová S., Kotrla R., Kočí R., Ptáček P.: Influence of complex antioxidant intake on lipid metabolism in Type II diabetics. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2004, vol. 130 (1), p.79.
- [161] Márová I., Macuchová S., Kotrla R., Ptáček P.: Influence of *Chlorella pyrenoidosa* intake on lipid metabolism in subjects with hyperlipidaemia. *Acta Universitatis Palackianae Olomouensis Chemica*, 2004, 43S, 6L05, p. 185.

9. POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY

ABTS	2,2.-azinobis (3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát
AGE	Advanced Glycation-End Product
AOPP	Advanced Oxidation Protein Product
ApoA/ApoB	apolipoprotein A/B
CAT	katalasa
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EPR/ESR	elektronová paramagnetická (spinová) rezonanční spektrometrie
EPA	eicosapentaneic acid
GC-MS	Gas Chromatography – Mass Spectrometry
GPx	glutathionperoxidasa
GSH	glutathion – redukována forma
GSSG	glutathion – oxidovaná forma
HDL	High-density lipoprotein
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPLC/ESI-MS	HPLC - electrospray ionisation mass spectrometry
HPLC-MS	High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
INT	IodoNitroTetrazolium
LDL	Low-density lipoprotein
LOX	lipoxygenasa
LPO	lipidová peroxidace
MDA	malondialdehyd
MS	Mass Spectrometry
NADP ⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADPH	redukový nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NBT	NitroBlueTetrazoliumchlorid
POD	peroxidasa
PPO	polyfenoloxidasa
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acids
RNS	Reactive Nitrogen Species
RONs	Reactive Oxygen and Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
RP-HPLC	Reversed phase HPLC
SOD	superoxiddismutasa
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TRAP	Total Radical Trapping Parameter
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethane
VLDL	very low-density lipoprotein
XOD	xanthin-oxidasa