

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Markery oxidačního stresu u Alzheimerovy choroby

Petra Caltová

Bakalářská práce

2017

University of Pardubice  
Faculty of Chemical Technology

Markers of oxidative stress in Alzheimer disease  
Petra Caltová

Bachelor work  
2017

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Petra Caltová**  
Osobní číslo: **C13299**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Název tématu: **Markery oxidačního stresu u Alzheimerovy choroby**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracovat teoretickou rešerši týkající se markerů oxidačního stresu u Alzheimerovy choroby.
2. V první části popsat Alzheimerovu chorobu, teorie vzniku tohoto onemocnění, klinické projevy a diagnostiku.
3. Ve druhé části se zaměřit na oxidační stres u Alzheimerovy choroby.
4. Poslední část věnovat specifickým markerům oxidačního stresu u Alzheimerovy choroby.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.**

Vedoucí bakalářské práce:

**Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce:

**28. listopadu 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

**Prohlašuji:**

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne:

Petra Caltová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala paní Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D., za odbornou pomoc, didaktické podněty, odborné rady, komentáře, trpělivost, za čas a její přístup při vedení mé bakalářské práce. Děkuji také své rodině za velkou podporu v průběhu mého studia.

## **ANOTACE**

V této bakalářské práci se zabývám oxidačním stresem a jeho markery u Alzheimerovy choroby. Práce je zaměřena na popis demence, Alzheimerovy choroby a její klinický obraz, léčbu a diagnostické metody. Dále se v práci zabývám oxidačním stresem, volnými radikály, markery oxidačního stresu a poškození biomolekul.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Alzheimerova choroba, markery oxidačního stresu, oxidační stres, volné radikály, reaktivní formy kyslíku, reaktivní formy dusíku

## **ANNOTATION**

In my bachelor thesis I deal with the oxidative stress and its markers in Alzheimer's disease. This thesis is focused on diagnostics, symptoms, causes and treatment. I deal with oxidative stress, free radicals, markers of oxidative stress and damage of biomolecules, too.

## **KEY WORDS**

Alzheimer disease, markers of oxidative stress, oxidative stress, free radicals, reactive oxygen species, reactive nitrogen species



## SEZNAM ZKRATEK

AD	Alzheimerova choroba (Alzheimer disease)
AGEs	koncový produkt glykace (Advanced glycation end products)
ALE	pokročilá koncová lipoxidace (Advanced lipoxidation end products)
AMK	aminokyselina
Ap	beta-amyloidní peptid
ApoE	apolipoprotein E
APP	amyloidový prekurzorový protein
BR	bilirubin
CNS	centrální nervový systém
CoQ	koenzym Q
COX	cyklooxygenáza
CT	počítačová tomografie (Computed tomography)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FAD	familiární formy AD
GPx	glutathion peroxidáza
GSH	glutathion
GS-SG	glutathion disulfid
GST	glutathion-S-transferáza
HNE	4-hydroxy-2-nonenal
HO•	hydroxylový radikál
IsoPs	isoprostany
L•	radikál mastné kyseliny
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě (Low-density lipoprotein)
LO•	alkoxylový radikál
LOO•	peroxylový radikál
LOOH	hydroperoxid mastné kyseliny
LP	lipidová peroxidace
MAP	mikrotubulární-asociovaný protein
MDA	malondialdehyd
MK	mastná kyselina
MR	magnetická rezonance
MTs	mikrotubuly

NFTs	neurofibrilární klubka (Neurofibrillary tangles)
NK	nukleová kyselina
NMR	nukleární magnetická rezonance
OS	oxidační stres
PET	pozitronová emisní tomografie
PHFs	párová šroubovicová vlákna (Paired helical filaments)
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny (Polyunsaturated fatty acid)
RNA	ribonukleová kyselina
RNS	reaktivní formy dusíku (Reactive nitrogen species)
ROS	reaktivní formy kyslíku (Reactive oxygen species)
sAPP	rozpuštěný amyloidní prekurzorový protein (Soluble Amyloid Precursor protein)
SDAT	senilní demence Alzheimerova typu
SOD	superoxiddismutáza
SPECT	jednofotonová emisní počítačová tomografie (Single-photon emission computed tomography)
SPs	senilní plaky
VKR	volné kyslíkové radikály
VR	volné radikály

## SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1 - Mozek zdravého člověka a mozek pacienta s AD .....	16
Obrázek 2 - Sekvenční štěpení prekurzorového proteinu .....	18
Obrázek 3 – Vlevo mozek pacienta s AD a vpravo mozek zdravého člověka .....	19
Obrázek 4 – Mikroglie .....	19
Obrázek 5 – Cesty možného působení apoE a Ap v mozku .....	20
Obrázek 6 - Metabolické cesty a zdroje ROS .....	24
Obrázek 7 - Metabolické cesty a meziprodukty ROS a RNS .....	25
Obrázek 8 - Strukturní vzorec vitamínu C .....	29
Obrázek 9 - Strukturní vzorec vitamínu E .....	30
Obrázek 10 - Reakce koenzymu Q .....	30
Obrázek 11 - Strukturní vzorec $\beta$ -karotenu .....	31
Obrázek 12 - Strukturní vzorek kyseliny močové .....	32
Obrázek 13 - Strukturní vzorec bilirubinu .....	32
Obrázek 14 - Produkty ROS aktivity v organismu .....	34
Obrázek 15 - Mechanismus peroxidace lipidů .....	36
Obrázek 16 - Strukturní vzorec malondialdehydu .....	37
Obrázek 17 - Strukturní vzorec 4-hydroxy-2-nonenalu .....	38
Obrázek 18 - Strukturní vzorec isoprostanu F2 .....	38
Obrázek 19 - Strukturní vzorec 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin .....	39
Obrázek 20 - Strukturní vzorec glutathionu .....	40
Obrázek 21 - Schéma glykace .....	42
Tabulka 1 – Hlavní buněčné cílové struktury pro volné radikály .....	33

## OBSAH

1	ÚVOD .....	13
2	DEMENCE .....	14
3	ALZHEIMEROVA CHOROBA .....	15
3.1	Definice Alzheimerovy choroby .....	15
3.2	Klinický obraz.....	16
3.2.1	Tau protein.....	17
3.2.2	Beta amyloid.....	17
3.2.3	Senilní plaky .....	18
3.2.4	Neurofibrilární klubka .....	19
3.2.5	Apolipoprotein E .....	20
3.3	Léčba.....	21
3.4	Diagnostické metody .....	21
4	OXIDAČNÍ STRES .....	22
4.1	Volné radikály.....	22
4.1.1	Reaktivní formy kyslíku .....	23
4.1.2	Reaktivní formy dusíku .....	25
4.2	Antioxidační ochranný systém.....	26
4.2.1	Enzymové antioxidační systémy .....	27
4.2.2	Antioxidanty neenzymatické povahy .....	28
4.3	Poškození biomolekul v důsledku oxidačního stresu .....	32
5	MARKERY OXIDAČNÍHO STRESU .....	34
5.1	Poškození lipidů.....	34
5.1.1	Malondialdehyd .....	37
5.1.2	4-hydroxy-2-nonenal .....	37
5.1.3	Isoprostany .....	38
5.2	Poškození nukleových kyselin.....	38
5.2.1	8-hydroxy-2'deoxyguanosin .....	39
5.3	Poškození proteinů.....	39
5.4	Vybrané nízkomolekulární látky .....	39
5.5	Poškození sacharidů.....	40
6	ZÁVĚR .....	43
7	POUŽITÁ LITERATURA.....	44

## 1 ÚVOD

Demence je závažná mozková choroba způsobena degenerativními změnami v mozkové tkáni. Nejčastější formou demence je Alzheimerova choroba, která představuje 55 - 60 % všech případů. Toto onemocnění z velké části nastává u osob starších 65 let.

V mozku dochází ke změnám, kdy proteiny se začínají usazovat a tím vznikají amyloidní plaky a spleti tau. Tím neurony přestávají fungovat, ubývá spojení s ostatními neurony a odumírají. Oxidační stres je podmíněn výskytem nepříznivých kyslíkových radikálů. Nemůžeme se jich úplně zbavit, jelikož kyslík tvoří významnou část našich těl. V těle nám tedy vznikají reaktivní formy kyslíku a dusíku, tzv. volné radikály. Antioxidační ochrana se snaží zabránit tvorbě nadměrného množství volných radikálů.

V průběhu let byly stanoveny markery, které vystihují oxidační stres. Kromě výběru vyhovujícího markeru, je rovněž důležité zvolit správnou metodu stanovení.

## 2 DEMENCE

Demence je organicky podmíněný, trvale nezvratný pokles složek intelektu. Významně limituje behaviorální, funkční a kognitivní schopnosti. Jsou změněny běžné ekonomické a sociální aktivity nemocného. Pojem demence pochází ze spojení slov de (bez) a mens (rozum, vědomí, mysl) [1].

Demence je možné dělit na dvě skupiny:

1. Primární
  - a. Atroficko-degenerativní (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Demence s Lewyho tělísky, aj.)
  - b. Ischemicko-vaskulární (multiinfarktová demence, aj.)
2. Sekundární
  - a. Symptomatická - vzniká v důsledku poškození CNS jiným organickým procesem
    - i. Traumatické změny
    - ii. Metabolické poruchy (např. jaterní selhání, poškození při urémii)
    - iii. Infekční choroby (např. leus CNS)
    - iv. Intoxikačními vlivy (chronický abuzus alkoholu nebo drog)
    - v. Hypovitaminózy (např. deficit niacinu) [2].

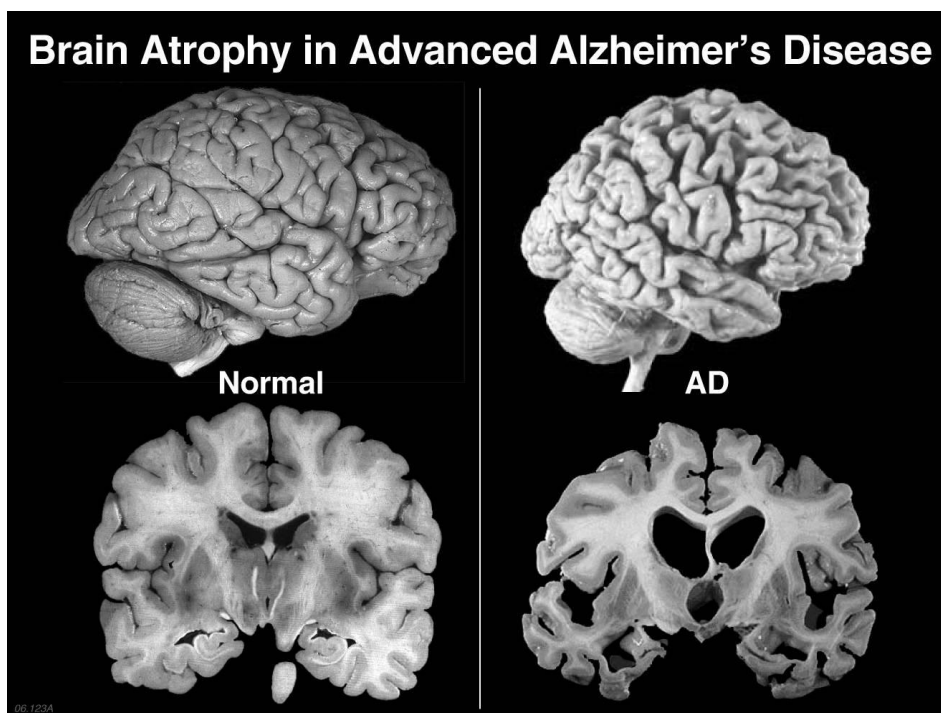
## 3 ALZHEIMEROVA CHOROBA

### 3.1 Definice Alzheimerovy choroby

Alzheimerovu chorobu (AD) v roce 1907 poprvé popsal německý neurolog, vědec, a psychiatr Alois Alzheimer. V té době byla nemoc považována za vzácnou [3]. Nyní je považována za nejčastěji se vyskytující demenci. Další podstatná část demencí vzniká na smíšeném podkladě AD a cerebrovaskulárního onemocnění [4]. AD představuje progresivní neurodegenerativní onemocnění mozkové tkáně a kognitivní zhoršení [5,6]. Je charakterizována přítomností četných senilních plaků a neurofibrilárních klubek v mozku, zejména v hipokamu a kůře mozkové [7]. V jeho důsledku dochází nejprve ke ztrátě funkce neuronů, později k zániku jednotlivých nervových buněk a následnému ubývání mozkové hmoty [6,8]. Z genetického hlediska je AD multifaktoriální nemocí. Mohou se zde vyskytovat i mutace genů a jsou zakódovány na chromozomech 1, 14, 19 a 21 [9].

Toto onemocnění nejčastěji postihuje osoby starší 65 let [9]. V současnosti trpí ¼ lidí starších 85 let demencí. AD se na tomto čísle podílí z 50 - 60 %. Odhaduje se, že ve světě touto nemocí trpí kolem 30 miliónu lidí. V roce 2009 bylo odhadováno přes 120 tisíc pacientů v České republice [10]. Toto číslo není úplně přesné, jelikož často bývá špatná diagnóza. Někdy AD není diagnostikována a stav nemocného je připisován stáří [11].

Mezi makroskopicky patrné anatomické změny patří zúžení mozkových závitů, dilatace mozkových komor a subkortikální i kortikální atrofie určitých mozkových struktur, především amygdaly, hippokampu a temporálních laloků, s pasivním rozšířením komorového systému a subarachnoideálních prostor. Charakteristickým patologickým nálezem v mozkové tkáni pacientů jsou extracelulární senilní plaky a intracelulární depozita neurofibrilární klubek (konvolutů) [1]. Na obr. 1 je znázorněn mozek zdravého člověka a mozek pacienta s AD.



**Obrázek 1** - Mozek zdravého člověka a mozek pacienta s AD [12]

### 3.2 Klinický obraz

Pro AD je typický pomalý začátek. Tento začátek je někdy nenápadný, že si okolí projevů demence všimne až s odstupem času. Nemoc má plynule postupující charakter bez nápadnějších výkyvů [2].

Mezi určující rysy AD patří nápadné změny v obou mozcích, histologické změny a změny chování. Mikroskopická kombinace dvou přítomných tříd abnormálních struktur – extracelulární amyloidové plaky a intracelulární neurofibrilární klubka jsou charakteristické pro AD. Oba obsahují vysoce nerozpustná hustá vlákna. Mezi rozpustné složky těchto struktur patří amyloidní –  $\beta$  peptidy a tau protein [13].

Senilní demence Alzheimerova typu (SDAT) je hlavní příčinou demence. Případy SDAT lze rozdělit do 2 skupin podle věku pacienta v době, kdy mu nemoc byla diagnostikována [13].

1. familiární AD – objevuje se v raném věku (často před 60. rokem života), 10 - 15 % pacientů,
2. sporadická AD – objevuje se mezi 60. – 70. rokem života, 85 - 90 % všech případů AD [14,15].



Z klinického hlediska je vhodné pro hodnocení stavu nemocného a přehledné posouzení míry postižení funkčních oblastí použít rozdělení na ABC symptomy demence. Tři základní skupiny symptomů AD jsou:

- A - aktivity denního života
- B - behaviorální změny
- C - kognitivní poruchy [16].

### 3.2.1 Tau protein

Tau je mikrotubulární-asociovaný protein (MAP), který je exprimován převážně v nervových buňkách. Podporují sestavení a stabilizaci mikrotubulů (MTs). Je odolný proti vysokým koncentracím kyselin a vysokým teplotám, aniž by ztratil svoji funkci. V AD se tau stane nadměrně fosforylovaný a ztrácí svou schopnost vázat se k MT. Agreguje do neurofibrilárních klubek (NFTs), která se skládají z párových šroubovicových vláken (PHFs) tau [17].

Má nízký obsah sekundárních struktur. Vzhledem k tomu, že neuspořádané proteiny mají tendenci být vysoce flexibilní, mohou mít různé konformace, které nejsou přístupné pro strukturní analýzu pomocí krystalografie. Nukleární magnetická rezonance (NMR) je zatím jedinou metodou, která umožňuje popisovat jejich konformace a dynamiku s vysokým stupněm rozlišení [17].

Nedostatek uspořádané struktury způsobuje překrytí signálu. Dříve bylo možné jen studovat o fragmentech tau nebo určovat jeho sekvence. V současné době je nalezen nejdelší záznam molekuly tau proteinu (441 aminokyselin) [17].

### 3.2.2 Beta amyloid

Beta-amyloidový peptid je neurotoxický a je spojený s patologií AD [18].

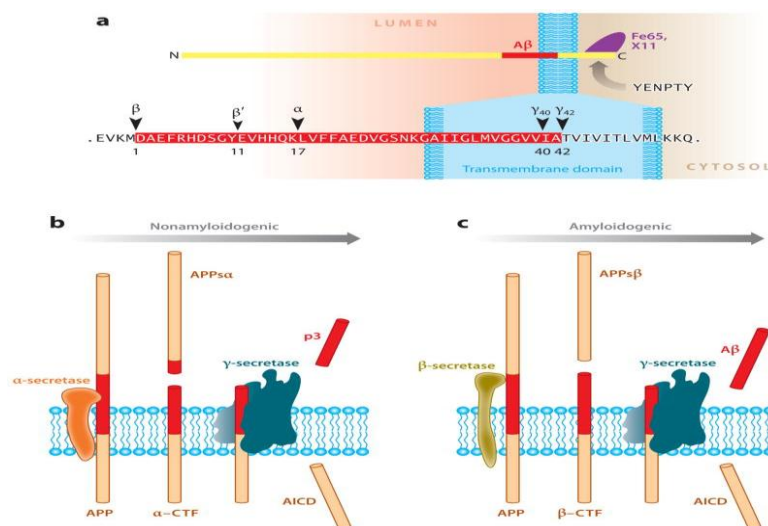
Amyloidový prekurzorový protein (APP) je integrální membránový protein, důležitý pro neuronální regeneraci a neurogenezi. APP je tvořen 365 - 700 aminokyselinovými zbytky. Gen pro APP je lokalizován na 21. chromozomu [19].

Štěpením APP vzniká beta-amyloidní peptid (Ap) tzv. amyloidogenní cestou (obr. 2).

Různé sady enzymů mohou zpracovat APP dvěma cestami:

- Non-amyloidogenní (plak netvořící) cesta
- Amyloidogenní (plak tvořící) cesta [20].

Amyloid je patologická fibrilární forma proteinu v beta struktuře (struktuře skládaného listu). Ke vzniku amyloidu dochází agregací původně solubilní (degradované) formy proteinu s primární nebo sekundární výrazně zastoupenou beta strukturou do formy fibrilární (rezistentní na degradaci) [20].



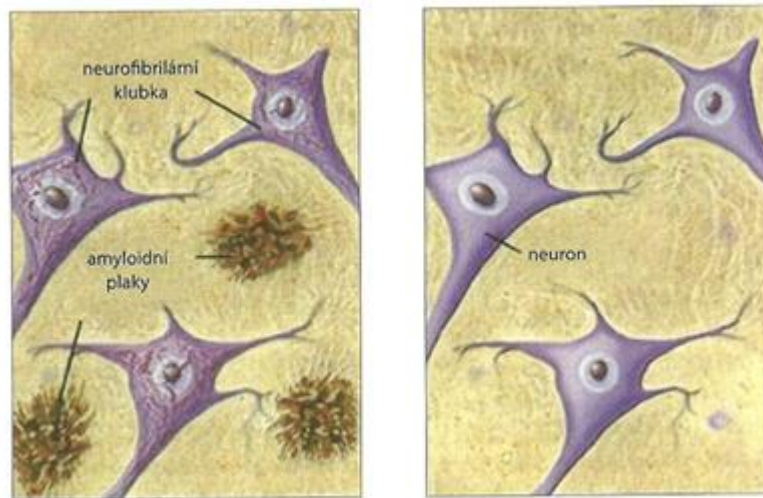
**Obrázek 2** - Sekvenční štěpení prekurzorového proteinu [21]

### 3.2.3 Senilní plaky

Senilní (amyloidní) plaky (SPs) jsou kulaté, polymorfní Ap usazeniny vyskytující se u AD a u běžného stárnutí, které poškozují mozkovou kůru. Ap je jejich nejdůležitější nebuněčná složka, která překlenuje glykoprotein tzv. amyloidního prekurzorového proteinu (APP) [7]. Rozlišujeme více druhů SPs:

- primitivní (neuritické)
- difúzní (pre-amyloidní)
- klasické (dense-cored)
- kompaktní (burnt-out) [22,23].

Rozpustné Ap proteiny (monomer, dimer a trimer) tvoří amyloidní plaky. Vstupují do procesu agregace, která je ovlivněna koncentrací a fyziologickým prostředím [24]. Na obr. 3 jsou znázorněny amyloidní plaky a neurofibrilární klubka.

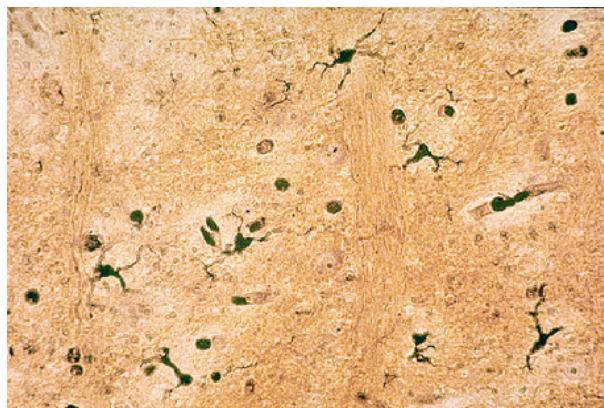


**Obrázek 3** – Vlevo mozek pacienta s AD a vpravo mozek zdravého člověka [25]

### 3.2.3.1 *Mikroglie*

Mikroglie (obr. 4) jsou malé, oválné buňky s velkou četností výběžků. Nejsou připevněné a mohou se svévolně pohybovat. Při poranění CNS narůstají, přemísťují se ke zranění, fagocytují a mění se na tzv. zrnčkové buňky. Mají schopnost ochraňovat mozek proti patogenním mikrobům, kteří se snaží dostat do mozku [26].

Mikroglie jsou součástí senilních plaků. Ve zdravém mozku jsou mikroglie rovnoměrně rozděleny v celé šedé a bílé hmotě. V mozku pacienta s AD jsou mikroglie seskupeny kolem Ap vkladů a v senilních placích se aktivují v důsledku interakce s Ap [7].



**Obrázek 4** – Mikroglie [27]

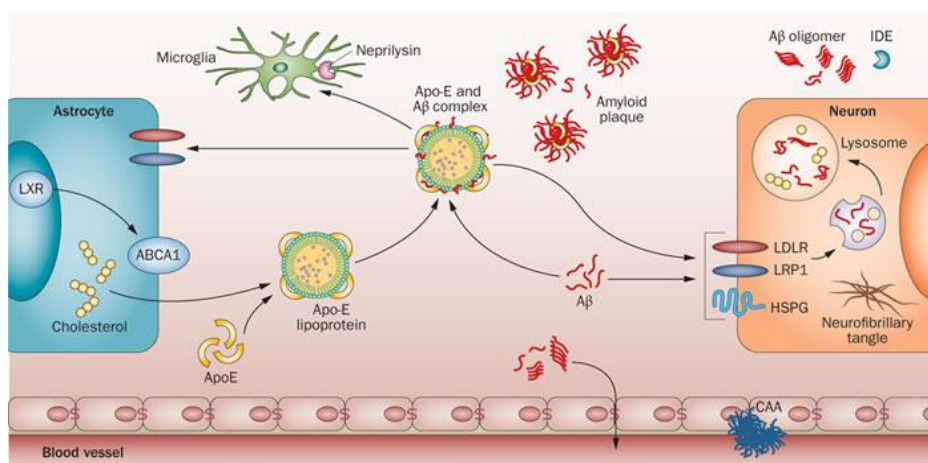
### 3.2.4 **Neurofibrilární klubka**

Neurofibrilární klubka jako první popsal Alois Alzheimer ve své pitevní kazuistice jako intraneuronální vláknité inkluze v oblasti pyramidových neuronů. Ultrastrukturální

studie mozku AD ukázaly, že NFTs jsou primárně složena z párových šroubovicových vláken. S pomocí molekulární mikroskopické techniky s vysokým rozlišením byla odhalena přítomnost zkroucených, stuze podobných shromážděných tau vláken in vitro, což je překážkou v PHFs představě [28]. NTFs jsou dodnes považována za základní mikroskopické nálezy spojené s AD. Je velmi těžké je obarvit s tradičním morfologickým barvením používaným v patologii (eosinem a hematoxylinem) [29].

### 3.2.5 Apolipoprotein E

Lidský apolipoprotein E (ApoE) je 299 aminokyselin dlouhý. ApoE je cholesterol transportující protein, které tvoří důležitou součást VLDL, HDL a chylomikronů. Slouží jako ligand pro vazbu na buněčné receptory a to zejména v játrech a CNS. ApoE je hlavním nositelem cholesterolu, který podporuje transport lipidů a opravy zranění v mozku. Tento protein s kombinací lipidů v těle tvoří molekuly zvané lipoproteiny [30,31]. Na obr. 5 jsou znázorněny cesty, kterými ApoE a Ap vzájemně působí v mozku.



**Obrázek 5** – Cesty možného působení apoE a Ap v mozku [32]

ApoE polymerní alely jsou hlavními genetickými determinantami AD. Existují v izoformách  $\epsilon_4$ ,  $\epsilon_3$  a  $\epsilon_2$ . Nejčastější forma je  $\epsilon_3$ , poté  $\epsilon_4$ ,  $\epsilon_2$  má nejnižší afinitu k receptorům. Jedinci nesoucí alelu  $\epsilon_4$  jsou vystaveni zvýšenému riziku AD ve srovnání s těmi, kteří nesou běžnější  $\epsilon_3$ . Alela  $\epsilon_2$  alela riziko snižuje. ApoE  $\epsilon_4$  alely jsou spojené se zvýšeným rizikem pro rozvoj cerebrální amyloidní angiopatie. Úbytek kognitivních funkcí souvisí s věkem a průběhem normálního stárnutí. ApoE-lipoproteiny se vážou

k několika povrchovým buněčným receptorům. Dodávají lipidy a také hydrofobní Ap, které iniciují toxické události, které vedou k synaptické dysfunkci a neurodegeneraci v AD. ApoE izoformy rozdílně regulují Ap agregaci a volný prostor v mozku a mají odlišné funkce v regulaci transportu mozkových lipidů, metabolismu glukózy, neuronové signalizace, neuronovému zánětu a mitochondriální funkce [31].

ApoE je imunochemicky lokalizován na SPs, vaskulárním amyloidu a NFTs AD. *In vitro* se ApoE v mozkomíšním moku váže na syntetický beta A4 peptid (primární složku SPs) s vysokou afinitou. Aminokyseliny 12 - 28 peptidu beta A4 jsou povinné. Gen pro ApoE se nachází na chromosomu 19q13.2, v oblasti dříve spojené s vazbou pozdního nástupu familiární AD [33].

### **3.3 Léčba**

V současnosti ještě není zcela známa etiopatogeneze AD. To nám neumožňuje optimální léčebný postup – kauzální terapii. Je však známo více etiopatogenetických řetězců, vzájemně spolu souvisejících. Právě tyto řetězce můžeme terapií ovlivnit a tak průběh demence výrazně zpomalit, především když začneme s léčbou včas. Terapie AD má být komplexní. Zahrnuje farmakoterapii, psychosocioterapii, léčbu interkurentních onemocnění, rehabilitaci tělesných funkcí [11].

### **3.4 Diagnostické metody**

Neinvazivní morfologické metody, jako je počítačová tomografie (CT) a magnetická rezonance (MR) mozku, odlišují strukturální příčiny demence (tumor, subdurální hematom, ischemické léze aj.). Nejčastějším nálezem u pacientů s pokročilou AD je atrofie (většinou kortikosubkortikální) [2,34].

Funkční zobrazovací techniky pozitronová emisní tomografie (PET) a jednofotonová emisní počítačová tomografie (SPECT) poskytují informace o regionálním mozkovém metabolismu včetně neuromediátorových změn. U pacientů s AD se prokazuje hypoperfúze v temporoparietálních oblastech mozku, snížení vazné kapacity nikotinových receptorů v postižených oblastech a abnormality krevního průtoku během paměťových úloh [2,34].

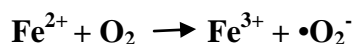
## 4 OXIDAČNÍ STRES

Oxidační stres (OS) se popisuje jako stav, kdy je porušena fyziologická rovnováha mezi antioxidanty a oxidanty ve prospěch oxidantů, nebo-li když dochází k porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním volných radikálů z reaktivní formy kyslíku ROS [35,36]. Častěji dochází k převaze volných radikálů (VR). Nepříznivé následky může mít i převaha antioxidantů. VR jsou také pro organismus důležité, ale pokud je antioxidantů přebytek, dochází k jejich blokování. Proto přebytkem antioxidantů může také dojít ke vzniku oxidačního stresu [37].

Prostřednictvím patologické redoxní reakce ROS mohou biomolekuly, jako jsou lipidy, nukleové kyseliny a proteiny, denaturovat. To může vyvolat poškození tkáně prostřednictvím nekrózy a apoptózy [35].

S amyloidními plaky, které jsou patologickým znakem AD, je spojována i zvýšená koncentrace kovových iontů. Koncentrace kovových iontů je v placích podstatně vyšší než v okolní tkáni, a to konkrétně železo, měď a zinek [35].

Železo se v organismu může vyskytovat ve dvou oxidačních stavech, a to jako kationt železnatý ( $\text{Fe}^{2+}$ ) nebo železitý ( $\text{Fe}^{3+}$ ).  $\text{Fe}^{2+}$  nejsou ve vodném prostředí stálé a reagují s molekulárním kyslíkem za vzniku  $\text{Fe}^{3+}$  a superoxidového radikálu [36].



Další významnou reakcí je Fentonova reakce, kde se účastní  $\text{Fe}^{2+}$  a vznikají vysoce reaktivní hydroxylové radikály [36].



### 4.1 Volné radikály

Volné radikály jsou nejvýznamnějším důvodem buněčného stárnutí. Jsou to ionty, molekuly či atomy schopné samostatné existence. Mají ve valenční vrstvě jeden nebo více nepárových elektronů, proto mají snahu získat další elektron a doplnit tak elektronový pár do stabilní konfigurace. Tím je dána jejich velká reaktivita a jen omezená doba existence. Reagují s ostatními VR, ale také s intaktními molekulami a vytvářejí další volný radikál; tento děj může pokračovat formou řetězové reakce [38]. VR mohou vznikat 3 způsoby:

- Oxidace – odebrání jednoho elektronu

- Redukce – přidání jednoho elektronu
- Homolytické štěpení kovalentní vazby [39].

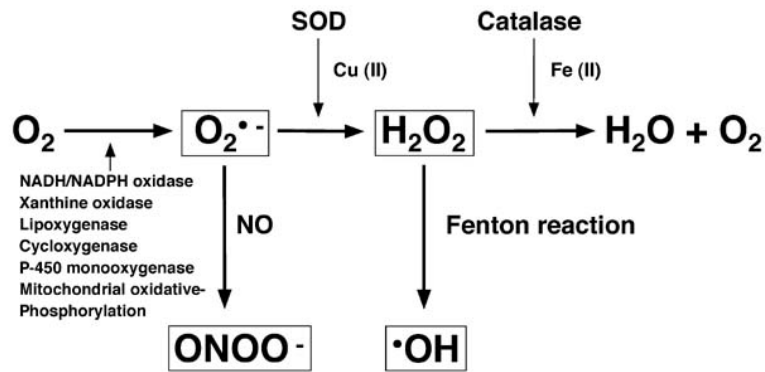
Pokud částice reaguje s volným radikálem, odstartuje se řetězová reakce, na jejímž konci vznikají sloučeniny, které nemají formu radikálu. Rozlišujeme dvě skupiny volných radikálů – ty které mají ve své molekule kyslík, jsou zařazeny mezi „reaktivní formy kyslíku“ (ROS) a molekuly s přítomností dusíku jsou zařazeny do skupiny „reaktivních forem dusíku“ (RNS). Mezi reaktivní formy kyslíku a dusíku patří jak volné radikály, tak látky, ze kterých se volný radikál může generovat [40].

VR mohou napadat lipidy v lipoproteinech a buněčných membránách, nukleové kyseliny, sacharidy i bílkoviny včetně enzymů, což může vést k těžkému poškození tkání a celých orgánů [41].

#### 4.1.1 Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku (častěji nazývané jako „volné kyslíkové radikály“) vznikají jako meziprodukty redukce kyslíku na vodu. Mají jeden nepárový elektron v jejich nejvzdálenější vrstvě elektronů. Díky tomuto charakteru jsou ROS vysoce reaktivní. Lze je rozdělit do dvou skupin: volné kyslíkové radikály (VKR) a látky neradikálové povahy [42]. Na obr. 6 jsou znázorněny metabolické cesty a zdroje vzniku ROS.

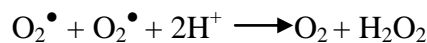
- Volné radikály
  - superoxid,  $O_2^\bullet$
  - hydroxylový radikál,  $HO^\bullet$
  - peroxy,  $ROO^\bullet$
  - alkoxy,  $RO^\bullet$
  - hydroperoxy,  $HO_2^\bullet$
- Látky, které nemají radikálovou povahu
  - peroxid vodíku,  $H_2O_2$
  - kyselina chlorná,  $HClO$
  - ozon,  $O_3$
  - singletový kyslík,  $^1O_2$  [43]



Obrázek 6 - Metabolické cesty a zdroje ROS [44]

### Superoxid

Superoxid ( $O_2^{\bullet}$ ) je značně reaktivní kyslíkový radikál (anion  $O_2^{\bullet -}$ ), který vzniká redukcí molekuly kyslíku. Dochází současně k oxidaci a redukci, kdy molekula odevzdává elektron druhé molekule, tzv. dizmutace. Reakcí vzniká kyslík a peroxid vodíku:



Enzym superoxiddismutáza v biologických organismech napomáhá zrychlovat reakci i přesto, že se reakce ve vodném prostředí uskutečňuje rychle [39].

### Peroxid vodíku

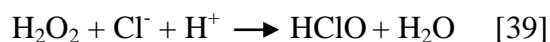
Peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) řadíme do ROS, i když není radikálem, ale podílí se na jejich vzniku. Rychlost reakce je nízká, ale po kontaktu s  $Fe^{2+}$  nebo  $Cu^+$  se  $H_2O_2$  redukuje:



Tato reakce se nazývá Fentonova reakce a produkuje toxický hydroxylový radikál. Odebírá elektron z nenasycených MK a napadá AMK a báze NK [39].

### Kyselina chlorná

Kyselina chlorná ( $HClO$ ) prostřednictvím myeloperoxidázy syntetizuje polymorfonukleáry:

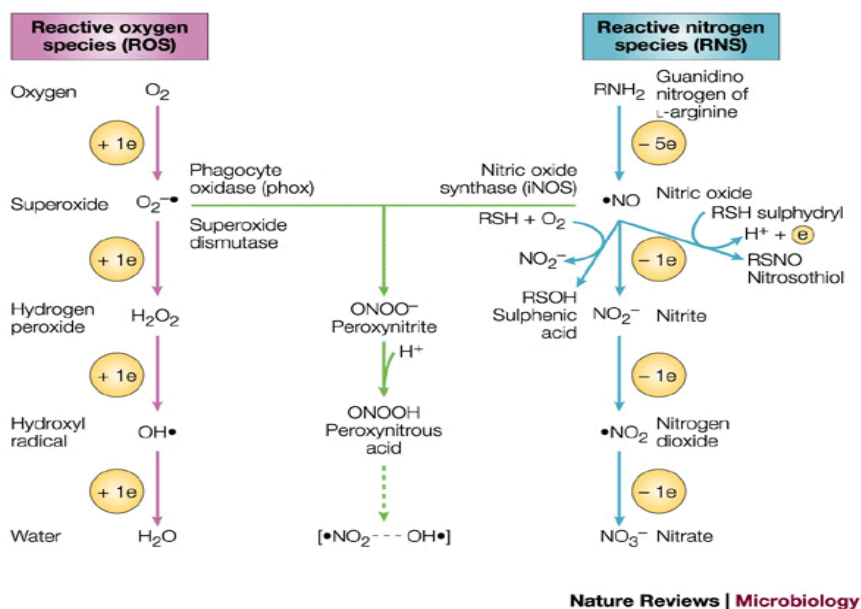




#### 4.1.2 Reaktivní formy dusíku

Reaktivní formy dusíku jsou sloučeniny odvozené od oxidu dusnatého [45]. Podobně jako ROS se dělí na volné radikály a látky neradikálové povahy. Na obr. 7 jsou znázorněny metabolické cesty a meziproducty ROS a RNS.

- Volné radikály
  - oxid dusnatý,  $\text{NO}^\bullet$
  - oxid dusičitý,  $\text{NO}_2^\bullet$
- Látky, které nemají radikálovou povahu
  - nitrosil,  $\text{NO}^+$
  - nitroxid,  $\text{NO}$
  - kyselina dusitá,  $\text{HNO}_2$
  - oxid dusitý,  $\text{N}_2\text{O}_3$
  - oxid dusičitý,  $\text{N}_2\text{O}_4$
  - nitronium,  $\text{NO}_2^+$
  - peroxyinitrit,  $\text{ONOO}^-$
  - alkylperoxyinitrit,  $\text{ROONO}$  [43]



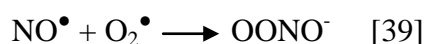
Obrázek 7 - Metabolické cesty a meziproducty ROS a RNS [46]

## Oxid dusnatý

V organismu je oxid dusnatý (NO<sup>•</sup>) syntetizován relativně komplikovaným enzymovým mechanismem, i když se jedná o jednoduchou molekulu. Oxid dusnatý spolu se svými metabolity patří mezi velmi toxické látky. I přesto, že patří mezi radikály, tak *in vivo* s biomolekulami reaguje pozvolna, jelikož inaktivace hemoglobinem a difúze do krve je daleko rychlejší než uvažované reakce. *In vivo* reaguje rychle pouze s radikály a přechodnými kovy [39].

## Peroxynitrit

Patologicky významnou molekulou je peroxynitrit (OONO<sup>-</sup>), který vzniká reakcí superoxidu s oxidem dusnatým. Jedná se oxidační činidlo.



## 4.2 Antioxidační ochranný systém

Na základě vztahu k VR, organismus využívá 3 typy ochrany. První způsob je zamezit vzniku nadměrného množství ROS a RNS například regulací činnosti enzymu, který je produkuje (indukovatelná syntéza NO<sup>•</sup>), nebo vychytáváním tranzitivních prvků z reaktivních míst (ferritin, transferin) [39].

Druhý způsob je zachycení a odstranění radikálů, které se již vytvořily. Jsou označovány jako zametači, vychytávači, lapače nebo zhášeče [39].

Mezi třetí způsob jsou zařazovány opravné mechanismy, které opravují poškozené biomolekuly. Poškozené mastné kyseliny jsou z fosfolipidů odstraňovány pomocí fosfolipázy, poškozenou DNA opravují reparační enzymy a oxidačně modifikované proteiny se rozkládají proteolyticky.

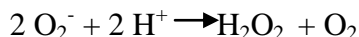
Antioxidační systém můžeme rozdělit na:

- enzymové antioxidační systémy,
- antioxidanty neenzymatické povahy
  - nízkomolekulární endogenní antioxidanty,
  - vysokomolekulární endogenní antioxidanty [39].

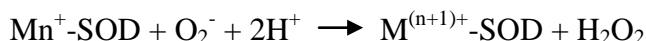
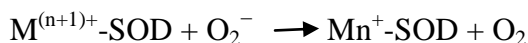
#### 4.2.1 Enzymové antioxidační systémy

##### Superoxiddismutáza (EC 1.15.1.1)

Superoxiddismutáza (SOD) katalyzuje přeměnu superoxidu na peroxid vodíku, který může být ještě rozkládán katalázou. Superoxidový aniont má redukční i oxidační vlastnosti, jelikož podléhá dismutaci, při které jedna molekula poskytuje elektron druhé molekule. Výsledek reakce je kyslík a peroxid vodíku [47,48].



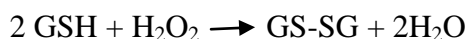
Tato reakce probíhá ve vodném prostředí, v biologických systémech dochází k urychlování enzymem SOD, který urychluje proces přeměny superoxidu ( $\text{O}_2^-$ ) na peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a kyslík podle reakcí:



Kde  $\text{M} = \text{Cu}$  ( $n=1$ );  $\text{Mn}$  ( $n=2$ ). Rozlišujeme 3 formy SOD. SOD1 se objevuje v cytoplasmě, SOD2 v mitochondriích a SOD3 v extracelulárním prostoru. Zinek a měď jsou obsaženy v SOD1 a SOD2, mangan v SOD3 [47,48].

##### Glutathion peroxidáza (EC 1.11.1.9)

Glutathion peroxidáza (GPx) pozměňuje karcinogenně účinkující peroxid vodíku na vodu a molekulární kyslík. Nejdůležitější činitel antioxidačního obranného systému buňky je glutathion (GSH), protože ve spojení s enzymy GPx a glutathion-S-transferázou pí (GSTpí) představuje klíčovou roli v biotransformaci chemoterapeutických léčiv a detoxikaci. GPx je selen-dependentní cytosolový enzym, který využívá GSH jako kofaktor. Katalyzuje štěpení peroxidu vodíku na vodu a současnou oxidaci redukovaného GSH na oxidovanou formu (GSSG) [48].



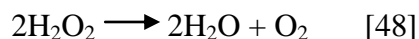
##### Glutathion-S-transferáza (EC 2.5.1.18)

Glutathion-S-transferáza zajišťuje konjugaci glutathionu s řadou hydrofóbních látek, které mají elektrofilní centrum. Tento enzym je významný v detoxikaci různých xenobiotik (antibiotika, léčiva, aflatoxiny). GST je nejvíce obsažena v játrech a ledvinách [49]. Obecná rovnice pro tento enzym:



### **Kataláza (EC 1.11.1.6)**

Enzym kataláza urychluje štěpení peroxidu vodíku za vzniku kyslíku a vody. Veškeré doposud známé katalázy mají společnou základní reakci - dizmutaci peroxidu vodíku podle rovnice:



## **4.2.2 Antioxidanty neenzymatické povahy**

### **4.2.2.1 Vysokomolekulární endogenní antioxidanty**

Některé proteiny dokážou vázat přechodně prvky, jako je měď a železo. Změní jejich oxidoredukční vlastnosti a tím prvky zastaví katalýzu radikálových reakcí. Mezi antioxidanty řadíme transferin (v plazmě) a laktoferin (v polymorfonukleárních leukocytech), které jsou si strukturně podobné. Obsahují jeden polypeptidový řetězec a reverzibilně navazují na molekulu 2 atomy železa. Tyto proteiny silně poutají železo ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a tím nemůže vstupovat do Fentonovy reakce [39,50].

Feritin je hlavním zásobním proteinem pro železo. Váže velké množství  $\text{Fe}^{3+}$ , které je pro organismus netoxické a rozpustné. Díky feroxidázové aktivitě, působí feritin jako antioxidant. Udržuje vázané železo v oxidovaném stavu, dokud není odpoutáno silně redukující látkou (askorbát) [51].

Ceruloplazmin je antioxidační protein plazmy, který váže měď. Měď je důležitá pro feroxidázovou aktivitu ceruloplazminu, která oxiduje  $\text{Fe}^{2+}$  na  $\text{Fe}^{3+}$ . Zároveň je kyslík oxidován 4 elektrony na  $\text{H}_2\text{O}$  bez toho, aby se vytvářely toxické meziprodukty [52].

Dalšími proteiny jsou metalothioneiny, které patří do skupiny intracelulárních proteinů bohatých na cystein, ale neobsahují žádné aromatické aminokyseliny. Mají důležitou úlohu v buněčném jádře. Pomocí síry chelatují ionty kovů. Jejich syntéza vzroste při oxidačním stresu [53].

Chaperony jsou bílkoviny, které napomáhají při svinování dalších bílkovin. Uplatňují se 3 způsoby: a) napomáhají dobrému sbalení, b) brání předčasnému svinutí, c) brání intramolekulárním interakcím dosud nesvinutých bílkovin a tím i jejich precipitaci [54]. OS indukuje syntézu chaperonů, které rozeznají proteiny, které byly poškozeny oxidací. Připoutají je na sebe a v proteazomech zrychlí jejich likvidaci. Napomáhají také při nápravě konformace proteinů. Chaperony se řadí do systému reparujícího tkáň po oxidačním poškození [39].

Thiolové skupiny proteinů mají značný vliv na reaktivitu VR. Lidský sérový albumin je nejhojnějším plazmatickým proteinem. Albumin má schopnost vázat měď a hem a tím působí jako antioxidant. Ion  $\text{Cu}^{2+}$ , který je navázaný na albuminu se přítomností peroxidu vodíku oxiduje na  $\text{Cu}^{3+}$ .  $\text{Cu}^{3+}$  je vysoce toxický iont, který se z albuminu neuvolní a tím narušuje okolní struktury albuminu. Albumin je z cirkulace eliminován degradačními procesy [39].

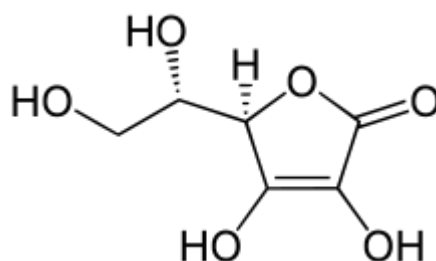
Hem uvolněný z hemoproteinů včetně hemoglobinu a myoglobinu a hemoglobin uvolněný z erytrocytů, jsou prooxidačně nebezpečnou formou Fe. Z toho důvodu mezi další antioxidanty řadíme haptoglobin a hemopexin. Haptoglobin prvotně vycytává extracelulární hemoglobin a hemopexin váže uvolněný hem [55].

#### 4.2.2.2 Nízkomolekulární endogenní antioxidanty

##### Askorbát (vitamín C)

Vitamín C je silný antioxidant rozpustný ve vodě, který působí ve vodném prostředí těla. Je nezbytný jako kofaktor enzymů během syntézy kolagenu a při proměně dopaminu na noradrenalin. Vitamín C pracuje jako donor elektronů (redukční činidlo) a redukuje  $\text{Cu}^{2+}$  na  $\text{Cu}^{+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$ . Umožňuje tak absorpci železa ze střeva a použití přechodných prvků v aktivním centru hydroláz. Vitamín C extracelulárně zabraňuje oxidaci lipoproteinů o nízké hustotě (LDL) a regeneruje tokoferol z tokoferoxylového radikálu. Během těchto reakcí se askorbát změní na askorbylový radikál [39,56].

Nízká hladina vitamínu C se vyskytuje u střední a závažné formy AD [57]. Na obr. 8 je znázorněn strukturní vzorec vitamínu C.



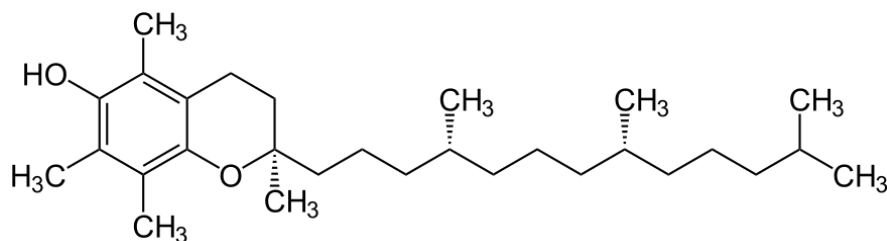
Obrázek 8 - Strukturní vzorec vitamínu C [58]

##### Vitamín E a $\alpha$ -tokoferol

Vitamín E je souhrnné označení pro skupinu osmi izomerů, z nichž  $\alpha$ -tokoferol je u lidí nejaktivnější formou. Jedná se o silně membránově vázaný antioxidant a jeho struktura je lipofilní. Během peroxidace lipidů dochází ke změně alkylperoxylového

radikálu  $\text{LOO}^\bullet$  na hydroperoxid, se kterými si poradí GPx. Zlikviduje tak peroxylové radikály předtím, než napadnou okolní lipidy. Tokoferol se změní na tokoferolový radikál, který je pevnější než substance, se kterými tokoferol reaguje [39,56].

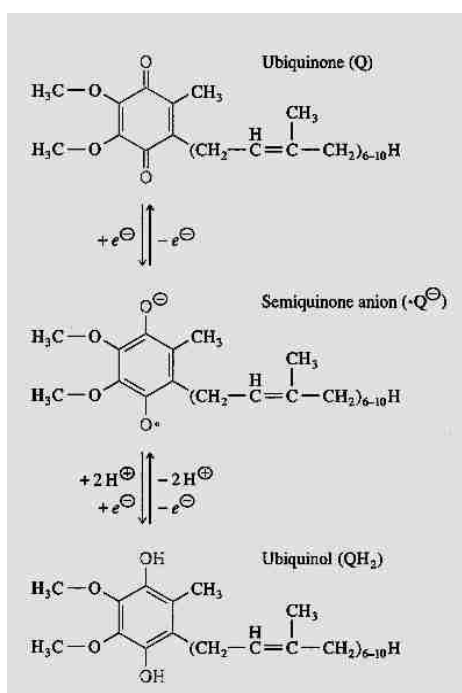
U Alzheimerovy choroby je množství sérového či plazmového vitamínu E podstatně nižší. Doplněním hladiny, nedochází ke zlepšení dalšího vývoje AD [57]. Na obr. 9 je znázorněn strukturní vzorec vitamínu E.



**Obrázek 9** - Strukturní vzorec vitamínu E [59]

### Ubichinon (koenzym Q)

Koenzym Q (CoQ) patří do skupiny benzochinonů, které se liší délkou lipofilního izoprenového řetězce (obr. 10). U člověka je nejběžnější  $\text{CoQ}_{10}$  s 10 izoprenylovými podjednotkami v postranním řetězci. CoQ je součástí dýchacího řetězce mitochondrií, kde vystupuje jako přenašeč elektronů. Nachází se ve všech membránách, kde spolu s tokoferolem, potlačuje radikálové reakce. Ubichinon podporuje (napomáhá) obnovení vitamínu E z tokoferolového radikálu [39,60].

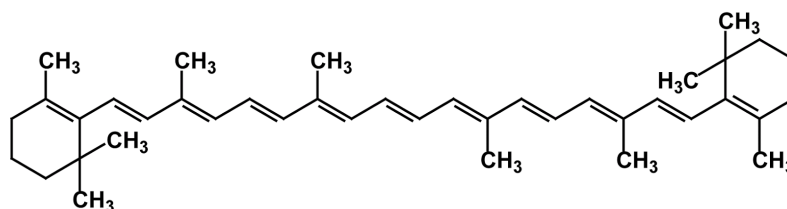


**Obrázek 10** - Reakce koenzymu Q [61]

## Karotenoidy, $\beta$ -karoten a vitamín A

Karotenoidy jsou lipofilní organické látky spadající do skupiny terpenů. Dělí se na 2 skupiny: karoteny (červené barvivo) a kyslíkaté sloučeniny (alkoholy, ketony aj.) odvozené od xantofylů (žluté barvivo). Karoteny jsou polynenasycené uhlovodíky, které mají 40 atomů uhlíků (obr. 11). Nejzákladnějším karotenem je necyklický uhlovodík lykopen, ze kterého cyklizací a izomerací můžeme odvodit  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -karoten. Z určitých karotenů se vytváří vitamín A<sub>1</sub>-retinol a A<sub>2</sub>-dehydroretinol. Mění excitovanou formu singletového kyslíku na tripletový kyslík [39,62].

Výzkumy pozorující hladinu vitamínu A v plazmě či séru prokázaly velký rozdíl mezi Alzheimerovou chorobou a kontrolní skupinou [57].



Obrázek 11 - Strukturální vzorec  $\beta$ -karotenu [63]

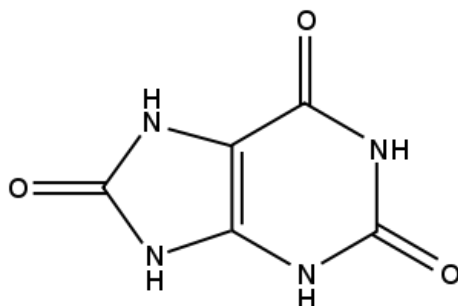
## Thioly a disulfidy

Jako ochrana vůči radikálovým reakcím účinkují disulfidy (oxidovaná forma glutathionu – GSSG), thioly (redukováná forma glutathionu – GSH) a sirné sloučeniny (např. taurin, homocystein, lipoamid) [39,64]

## Kyselina močová

Kyselina močová je heterocyklická sloučenina, jejíž vzorec je C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> (obr. 12). Jedná se o koncový produkt metabolismu purinů. Nejedná se jen o odpadní látku, jelikož má také silné antioxidační vlastnosti. Jako antioxidant zabraňuje tvorbě hydroxylového radikálu a vycytává RO<sup>•</sup> a HClO. Kyselina močová váže železo a měď za vzniku stabilních komplexů, které nepřispívají ke vzniku radikálové reakce. Biologicky může škodit urát, který se změní v radikál, který vzniká po reakci kyseliny močové s hydroxylovým radikálem a periferylovými radikály (komplexy železa s aktivním kyslíkem) [65,66].

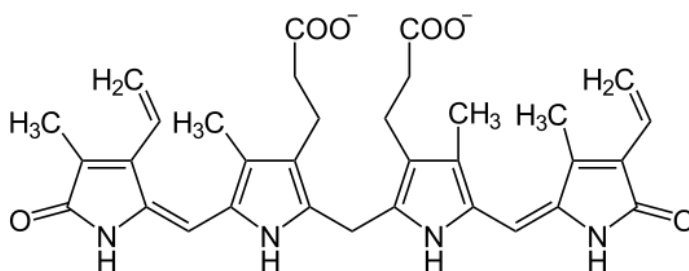
Některé studie poukazují na sníženou hladinu kyseliny močové v séru či plazmě, zatímco jiné výzkumy tyto rozdíly nenašly. Vyloučení pacientů s metabolickým syndromem je důležité při měření nižší hladiny kyseliny močové u pacientů s AD. To znamená, že metabolický syndrom je schopen interferovat s množstvím kyseliny močové jako nepřímým markerem oxidačního stresu u AD [57].



**Obrázek 12** - Strukturální vzorek kyseliny močové [67]

### Bilirubin

Bilirubin (BR) je konečným produktem katabolismu hemu, jehož struktura je necyklický tetrapyrrol (obr. 13). BR není rozpustný ve vodě, ale je rozpustný v lipidech, proto je schopný vniknout do buněčných membrán a poškodit metabolické procesy. Jako volný i vázaný na albumin a jiné proteiny má antioxidační význam. BR zabraňuje peroxidaci lipidů tím, že obnovuje  $\alpha$ -tokoferol, který je obsažen v lipoproteinech. BR vázaný se oxiduje na biliverdin (rozpustný ve vodě) a přesouvá radikálovou reakci z LDL do vodné fáze. Zachycuje VR a zhasí  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^\bullet$  a  $^\bullet\text{OH}$  [39,68].



**Obrázek 13** - Strukturální vzorec bilirubinu [69]

### 4.3 Poškození biomolekul v důsledku oxidačního stresu

ROS nebo peroxydusitany, pocházející z reakce oxidu dusnatého a peroxidového aniontu, jsou intenzivními oxidačními činidly, která poškozují DNA, proteiny a nenasycené mastné kyseliny (MK) v lipidech (tabulka 1) [39,70].



**Tabulka 1** – Hlavní buněčné cílové struktury pro volné radikály [39]

<b>Cíl</b>	<b>Poškození</b>	<b>Důsledky</b>
nenasyčené MK v lipidech (buněčné membrány)	ztráta dvojných vazeb, tvorba reaktivních metabolitů (aldehydy, peroxydy)	změna fluidity a propustnosti membrán, tvorba chemoreaktivních látek pro mikrořágy
proteiny	agregace, síťování, fragmentace, štěpení, reakce s hemovým Fe, modifikace thiolových skupin a benzenových jader aminokyselin (AMK)	změny v transportu iontů, vstup Ca <sup>2+</sup> do cytosolu, změny v aktivitě enzymů
DNA	štěpení kruhu deoxyribózy, modifikace a poškození bází, zlomy řetězce	translační chyby, inhibice proteosyntézy, mutace

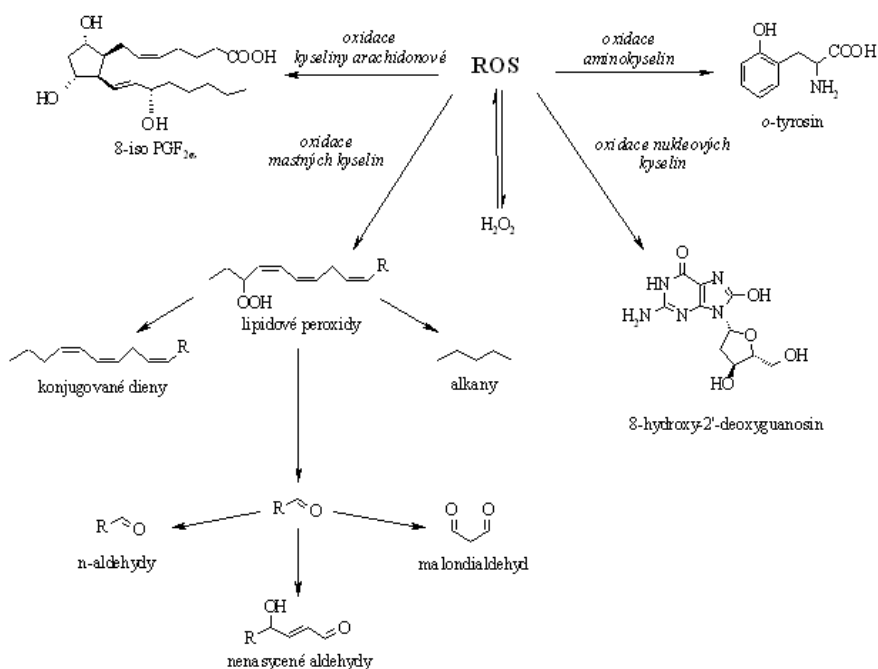
## 5 MARKERY OXIDAČNÍHO STRESU

Jedná se o velice reaktivní molekuly s krátkou životností [71].

Změna činnosti enzymů (CAT, GPx, SOD, GST) patří mezi markery oxidačního stresu. Aktivita CAT se měří pomocí spektrofotometrické metody, u které se pozoruje úbytek substrátu  $H_2O_2$ . GPx se stanovuje nepřímým měřením činnosti, kdy se spektrofotometricky měří množství NADPH spotřebovaného na redukci GSSG [39].

U SOD, oxidáz a CAT je možné pozorovat změny exprese mRNA [72].

Změnu antioxidačního potenciálu nebo změnu koncentrace reaktivní formy kyslíku je možné považovat za markery oxidačního stresu (obr. 14). Vzhledem ke krátkému poločasu života reaktivních molekul je jejich zjišťování obtížné, z tohoto důvodu jsou metody přímého stanovení VR technicky a ekonomicky náročné. Ke stanovení se využívá chemiluminiscence, fluorescenční sledování radikálů nebo elektronová paramagnetická rezonanční spektrometrie [73].



Obrázek 14 - Produkty ROS aktivity v organismu [74]

### 5.1 Poškození lipidů

Lipidová peroxidace (LP) je mechanismus, kdy volné radikály berou lipidům elektrony. Lipidy jsou napadené ROS, které mají dostatečnou reaktivitu na odebrání atomu vodíku z methylenového uhlíku v jejich postranním řetězci. Vznikají hydroperoxydy a cyklické peroxidy mastných kyselin, ze kterých následnými reakcemi

vznikají sekundární produkty. Čím větší je počet dvojných vazeb v molekule, tím snadnější je odstranění atomu vodíku. To vysvětluje, proč polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) jsou velice náchylné na peroxidaci lipidů [47,75].

Mozkové membránové fosfolipidy jsou složeny z PUFA, především z kyseliny arachidonové a dokosaheptaenové [75].

Bylo prokázáno, že v mozku pacientů s AD je úroveň peroxidace lipidů vyšší, než zdravých lidí [75]. Peroxidace lipidů rozdělujeme na:

- Enzymatická peroxidace

Tvorba biologicky činných produktů, které jsou důležité pro řízení, signalizaci a řadu dalších buněčných procesů. VR nejsou uvolněny z činných center enzymů (např. lipoxygenáz a cyklooxygenáz) do okolí a proto nejsou škodlivé pro organismus (např. prostaglandiny a leukotrieny). Vznikají zde i oxidanty, ale ty jsou zničeny antioxidačním systémem organismu [47,76].

- Neenzymatická peroxidace

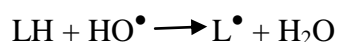
Nekontrolovatelný průběh změny lipidů.

Řetězce mastných kyselin se lehce štěpí na kratší řetězce, jako jsou uhlovodíky a toxické aldehydy (malondialdehyd a 4-hydroxy-2-nonenal). Ty se lehce naváží na proteiny a pozměňují jejich funkci a životnost. Vyrůstá permeabilita pro ionty a zapříčiňují lýzu buněk [47,76].

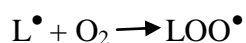
U neenzymové peroxidace lipidů jsou rozlišovány 3 základní fáze: iniciace, propagace a terminace (obr. 15).

### **Iniciace:**

Je to děj, při kterém dochází k ataku mastné kyseliny volným kyslíkovým radikálem (např. hydroxylový radikál  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{HO}_2^\bullet$ ,  $\text{RO}^\bullet$ ,  $\text{ROO}^\bullet$ ). Nejvíce je atakována metylenová skupina, která je nejcitlivější a z obou stran má dvojnou vazbu. Mastná kyselina je přeměněna na radikál ( $\text{L}^\bullet$ ).

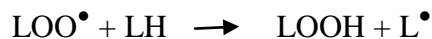


Po odtržení vodíku vznikne v řetězci mastné kyseliny konjugovaný dien po přeskupení dvojných vazeb. Ten jednoduše reaguje s molekulou kyslíku a vzniká lipoperoxylový radikál ( $\text{LOO}^\bullet$ ), který odstartuje fázi propagace [39,47,77].

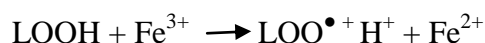
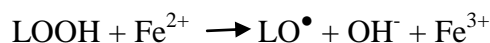


### Propagace:

Jedná se o autokatalytický proces, kdy radikály MK reagují opakovaně s PUFA a kyslíkem a vytváří se hydroperoxy (LOOH)



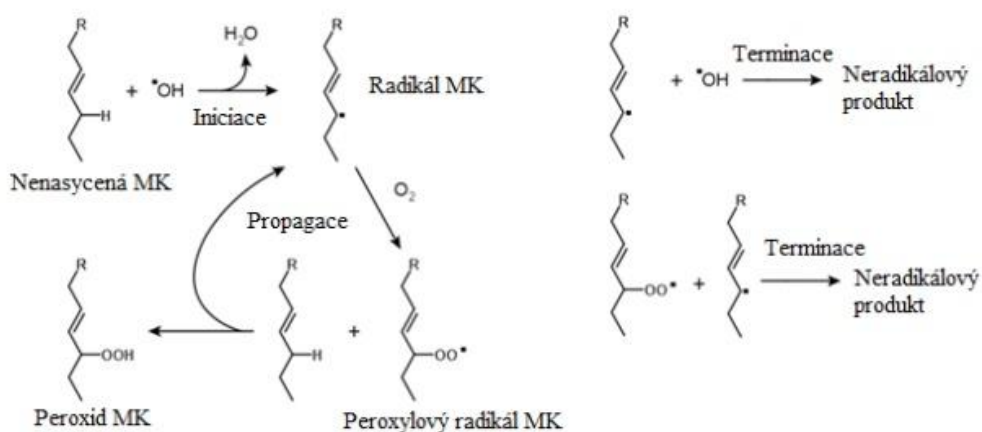
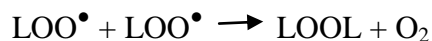
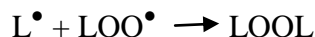
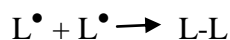
Hydroperoxy MK jsou nestálé v přítomnosti přechodných kovů (např. Cu a Fe). Dochází k jejich rozštěpení na peroxylové a alkoxylové ( $\text{LO}^\bullet$ ) radikály



Přechodné kovy mají význam jako katalyzátory, protože dochází k urychlování vzniku nových radikálů [39,47,77].

### Terminace:

Poslední fáze terminace vzniká v okamžiku, kdy se VR setká s jiným VR nebo s molekulou antioxidantu. Dochází k vytvoření stabilního dimeru a tím se propagace radikálové reakce zastaví [39,47,77].



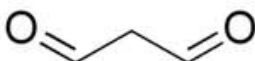
Obrázek 15 - Mechanismus peroxidace lipidů [78]

Výzkumy prokázaly zvýšené množství lipoperoxidace, HNE a akroleinu u lidí trpících Alzheimerovou chorobou, proto oxidační poškození lipidů se nevyskytuje u normálního stárnutí organismu [36].

### 5.1.1 Malondialdehyd

Malondialdehyd (MDA) je genotoxická a velmi reaktivní organická sloučenina. Jedná se o dialdehyd kyseliny malonové, jehož vzorec je  $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$  (obr. 16) [79]. Vlivem ROS dochází k lipoperoxidaci řetězců polynenasycených MK. Tvoří kovalentní proteinové sloučeniny, nazývané jako pokročilé koncové produkty lipoxidace (ALE). Vznikají dvě fáze. V první fázi se vytvářejí hydroperoxydy a v druhé fázi dochází ke štěpení uhlíkového řetězce a odštěpování jednoduchých molekul. Nejvýznamnější je MDA. Váže se přes thiolovou a aminovou skupinu na NK a proteiny a tím dochází k jejich poškození. Z klinického hlediska je nejdůležitější stanovit celkovou koncentraci MDA, ale v tkáních se nachází jako vázaný a malé množství ve volné formě [80,81]. Tento aldehyd je velice toxická molekula. Jeho vzájemné působení s deoxyribonukleovou kyselinou (DNA) a bílkovinou je potenciálně mutagenní a aterogenní [82].

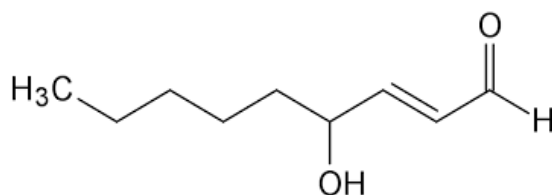
Zvýšené množství MDA je důležitým činitelem porušení neuronu a patogeneze AD [83].



Obrázek 16 - Strukturální vzorec malondialdehydu [84]

### 5.1.2 4-hydroxy-2-nonenal

4-hydroxy-2-nonenal (HNE) je jeden z hlavních konečných produktů peroxidace lipidů. Z chemického hlediska se jedná o  $\alpha,\beta$ -nenasycený aldehyd (obr. 17). Mezi potenciálními prekurzory pro vznik HNE patří kyselina arachidonová a kyselina linolová. Podílí se na přenosu signálů a má, v závislosti na koncentraci, vliv na události buněčného cyklu. Jako silný elektrofil může měnit redoxní stavy buněk, nebo reagovat s jinými biomolekulami [82,85,86].

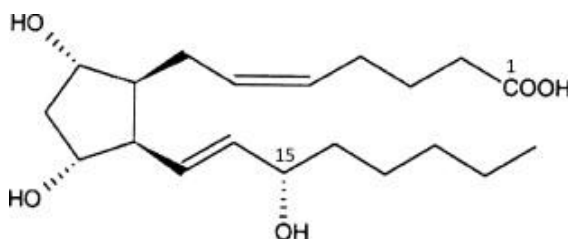


Obrázek 17 - Strukturální vzorec 4-hydroxy-2-nonenalu [87]

### 5.1.3 Isoprostany

Isoprostany (IsoPs) jsou produkovány *in vivo* neenzymatickou oxidací mastných kyselin (především kyseliny arachidonové), vlivem kyslíkových radikálů bez účasti enzymu cyklooxygenázy (COX). Svou strukturou spadají do skupiny prostanoidů obsahující tři i více dvojných vazeb (obr. 18) [88,89].

IsoPs rozdělujeme do 3 skupin lišící se strukturou: F2, E2, a D2. U osob trpící AD bylo prokázáno zvýšené množství F2 – isoprostanů v mozkomíšním moku, a proto je považován za biomarker této choroby [90].

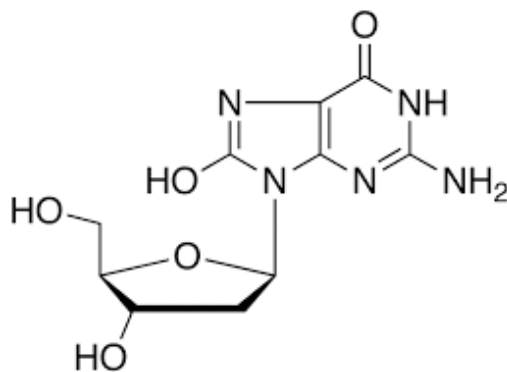


Obrázek 18 - Strukturální vzorec isoprostanu F2 [91]

## 5.2 Poškození nukleových kyselin

Ribonukleová kyselina (RNA) a DNA jsou biomolekuly citlivé na oxidační poškození. K oxidačnímu poškození má větší tendenci RNA, protože je výhradně jednovláknová a její báze nejsou chráněny vodíkovými vazbami ani histony. Nukleové kyseliny (NK) jsou opětovným cílem hydroxylových radikálů a vytváří se cukerné zbytky nebo různě modifikované báze [36,92]. NK nepoškozuje pouze hydroxylové radikály, ale dochází také k jejich poškození a modifikaci pomocí ROS a RNS. ROS a RNS způsobují modifikaci a rozštěpení řetězce nefyziologické vazby [36].

U pacientů s AD je důležitým markerem oxidačního poškození DNA 8-hydroxy-2'deoxyguanosin (obr. 19) nebo jeho enol-keto tautomerní forma 2'deoxy-7,8-dihydro-8-oxonosin [36,92].



**Obrázek 19** - Strukturální vzorec 8-hydroxy-2'deoxyguanosin [93]

### 5.2.1 8-hydroxy-2'deoxyguanosin

8-hydroxy-2'deoxyguanosin (obr. 19) je derivát dusíkatých bází v moči. Tato látka se dobře stanovuje, není přijímána potravou a tak její hladinu neovlivňuje dieta. Hladina 8-hydroxy-2'deoxyguanosinu v moči i jiných biologických materiálech, je brána jako platný marker oxidačního poškození DNA a v širším významu také jako marker oxidačního stresu [94]. Studie prokázali, že hladina 8-hydroxy-2'deoxyguanosinu u AD je výrazně zvýšená [57].

## 5.3 Poškození proteinů

Proteiny mohou být napadány radikálovými sloučeninami. Hojně zastoupení v organismu způsobuje to, že se stávají hlavním cílem oxidačního poškození. Narušení proteinů může vzniknout přímým útokem VR nebo sekundárně konečnými produkty peroxidace lipidů jako např. MDA, HNE a izoketaly. Aldehydy a ketony jsou karbonylové deriváty proteinů, jejichž vznik je typický pro poškození proteinů. Karbonylové deriváty tvoří v současnosti nejběžnější biomarker oxidačního poškození proteinů. Karbonylace je neenzymatická, nevratná změna proteinu, kdy do postranních řetězců zavedeme karbonylové skupiny [90,95].

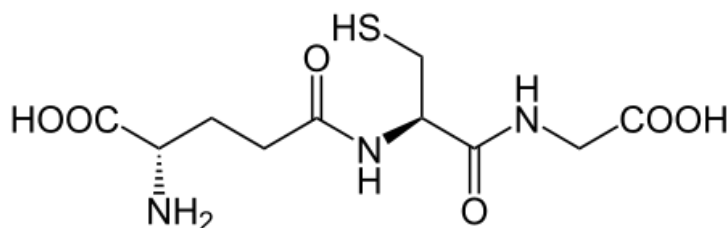
U AD nastává patologické usazování proteinů. Ukládají se jako vlákna, nebo kolem neuronů jako SPs. Zapříčiňují poškození a zánik neuronů a jejich spojení. Nervové vzruchy vznikají, jelikož poklesne hladina acetylcholinu. [96].

## 5.4 Vybrané nízkomolekulární látky

Kromě produktů poškození biomolekul vzešlých v průběhu OS je významným kritériem změna koncentrace nízkomolekulárních látek. Nejčastějším stanovovaným

biomarkerem je glutathion (obr. 20) a jeho oxidovaná forma GSSG. Tripeptid glutathion je složený ze 3 aminokyselin (kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu), nebo přesněji se jedná o L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinyl-glycin [97].

Glutathion nacházíme v buňkách ve 2 formách: redukovaná (GSH) a oxidovaná (GSSG) [76]. Jedná se o nejhojnější intracelulární antioxidační thion a je hlavní redoxní ochrana během OS [98]. Vyskytuje se ve vysokých koncentracích ve většině buněk. Hraje klíčovou roli v odstraňování ROS a udržuje sulfhydrylové skupiny (proteinů, cysteinu, koenzymu A atd.) v redukované formě. Snížení hladiny redukovaného GSH v buňkách je jedním ze znaků oxidačního stresu tkáně [39,99].



Obrázek 20 - Strukturní vzorec glutathionu [100]

## 5.5 Poškození sacharidů

Oxidačně poškozené molekuly sacharidů mají souvislost s následným poškozením proteinů. Přechodné kovy způsobují urychlení oxidace monosacharidů za vzniku VR, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a reaktivní dikarboxylové sloučeniny. Poté tyto substance reagují s proteiny, které vytvářejí kovalentní vazby a vznikají tzv. koncové produkty glykace (AGEs). Fruktóza, glyceraldehyd-3-fosfát, deoxyglukóza aj., jsou nejvíce reagujícími molekulami, zatímco glukóza díky energii patří mezi velmi málo reaktivní cukry [36].

Dalším principem vzniku AGEs je Maillardova reakce. Tato neenzymatická reakce vzniká mezi aminokyselinami a redukujícími cukry (produkty degradace). Rozlišujeme tři kroky reakce – iniciace, terminace a propagace (obr. 21) :

### **Iniciace** – tvorba Amadoriho produktů

Neenzymovou kondenzací redukujícího cukru a aminu vzniká Shiffova báze, která není stabilní. Po přesmyku, tato báze vede ke stabilnějšímu Amadoriho nebo Heynsovu produktu (podle toho, zda reagující cukr je ketosa nebo aldosa). Reakce je reverzibilní [101].

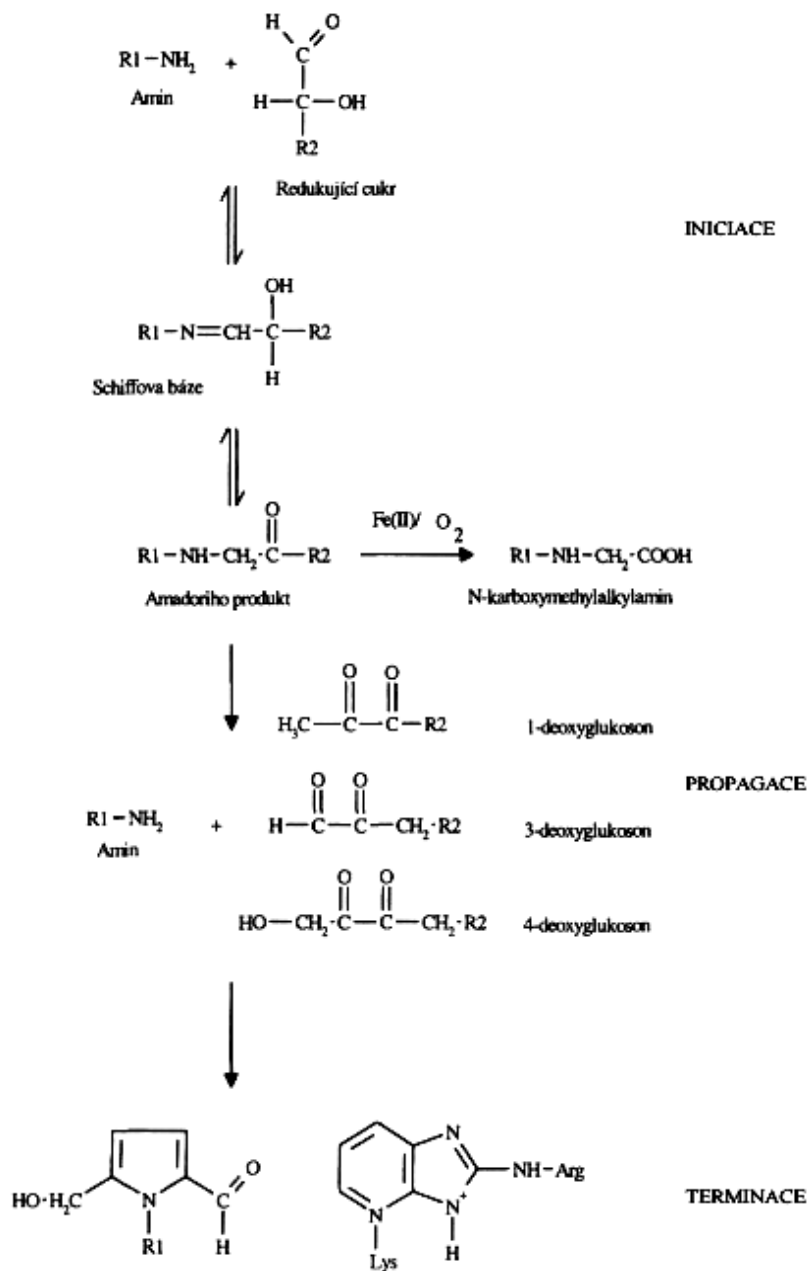


**Propagace** - degradace Amadoriho produktů

Amadoriho produkty se rozkládají na prvotní amin a 1-, 3-, nebo 4-deoxyglukoson nebo se nevratně oxidují a tak vzniká N-karboxymethylalkylamin [101].

**Terminace** – tvorba AGEs

V závěrečné fázi Amadoriho produkty (jeho degradační sloučeniny) reagují s volnými aminoskupinami proteinů (myelin, kolagen, elastin). Produkty AGEs jsou nevratné a trvale poškozují tkáň [101].



Obrázek 21 - Schéma glykace [101]

Na AD se z velké části podílí glykace. V průběhu stárnutí dochází k poklesu funkcí tkání a buněk, kterému napomáhá nevratné nefyziologické propojování dlouhého poločasu s proteiny, prostřednictvím AGEs. Dochází k jejich shromažďování v extracelulárním (SPs) a intracelulárním (NFTs) prostoru, jelikož agregace proteinů zabraňuje jejich degradaci. AGEs nepatří mezi primární příčiny patogeneze AD, ale představují hnací sílu nadměrné tvorby a ukládání amyloidu a tvorby senilních plaků [36].

## 6 ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsem se zabývala Alzheimerovou chorobou a markery oxidačního stresu. Popsala jsem klinický obraz AD, léčbu a diagnostické metody u této nemoci.

Alzheimerova choroba je dosud nevyřešeným problémem. Zatím není lék, který by tuto nemoc vyléčil. Existuje celá řada léků, které tlumí nebo odstraňují symptomy a zlepšují kvalitu života lidí, kteří touto nemocí trpí. Léčba se dělí na nefarmakologickou a farmakologickou. Chceme-li zmírnit a zlepši průběh onemocnění, je důležitá kombinace obou terapeutických postupů. Oxidační stres dokáže způsobit poškození biomolekul v organismu a zhoršit přirozenou činnost buněk. OS doprovází patologické procesy v mozku AD, hromadění produktů radikálového narušení biomolekul a nefunkčnost způsobující neurodegeneraci. Doposud není zcela jisté, zda OS je primární příčina nebo sekundární reakce patologické přeměny mozku u AD, ale podle dosavadních studií je jasné, že radikálové poškození a špatné fungování biologických struktur poukazují, že se OS na vzniku a vývoji nemoci podílí.

## 7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] HOŘEJŠÍ, J., ed. *Alzheimerova choroba*. Praha: Galén, 1999. Symposium (Galén). ISBN 80-7262-025-8.
- [2] JIRÁK, R., *Demence*. Praha: Maxdorf, c1999. ISBN 80-85800-44-6.
- [3] <http://www.alzheimer.cz/alzheimerova-choroba/> [cit. 2016-10-11]
- [4] RABOCH, J., PAVLOVSKÝ, P., *Psychiatrie*. Praha: Karolinum, 2012. ISBN 9788024619859.
- [5] YU, N., TAN, M., YU, J., XIE, A., TAN, L., The role of Reelin Signaling in Alzheimer's Disease. *Molecular neurobiology*. [online]. 2016, 53(8), 5692-700 [cit. 2016-10-15]. DOI 10.1007/s12035-015-9459-9. ISSN 0893-7648.  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26491027>.
- [6] NEVŠÍMALOVÁ, S., TICHÝ, J., RŮŽIČKA, E., *Neurologie*. Praha: Galén, c2002. ISBN 8072621602.
- [7] KHOURY, E. J., LUSTER, A. D., Mechanisms of microglia accumulation in Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Trends in Pharmacological Sciences*. [online]. 2008, 29(12), 626-632 [cit.2017-10-15]. DOI 10.1016/j.tips.2008.08.004. ISSN 01656147.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016561470800196X>.
- [8] ČESKÁ ALZHEIMEROVSKÁ SPOLEČNOST. O Alzheimerově chorobě [online]., 2003 [cit. 2016-11-7].  
Dostupné z: <http://www.gerontologie.cz/showdoc.do?docid=25>.
- [9] ALZHEIMER'S ASSOCIATION. What Is Alzheimer's? [online]., 2017 [cit. 2017-01-07].  
Dostupné z: [http://www.alz.org/alzheimers\\_disease\\_what\\_is\\_alzheimers.asp](http://www.alz.org/alzheimers_disease_what_is_alzheimers.asp).
- [10] PODEPSÁNO SRDCEM. Alzheimerova nemoc [online]., 2017 [cit. 2017-01-07].  
Dostupné z: [http://www.podepsanosrdcem.eu/clanek\\_cz/1612/662/home/alzheimerova-nemoc/](http://www.podepsanosrdcem.eu/clanek_cz/1612/662/home/alzheimerova-nemoc/)
- [11] KOUKOLÍK, F., JIRÁK, R., *Alzheimerova nemoc a další demence*. Praha: Grada, 1998. ISBN 80-7169-615-3.

- [12] <http://scistand.com/2015/ultrasound-may-therapeutic-effect-alzheimers-disease/>  
[cit. 2016-11-12]
- [13] CASTELLANI, R. J., ROLSTON, R. K., SMITH, M. A., Alzheimer Disease. *Disease-a-Month*. [online]. 2010, 56(9), 484-546 [cit. 2016-12-10]. DOI 10.1016/j.disamonth.2010.06.001. ISSN 00115029.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011502910000684>.
- [14] HARMAN, D., Free radical theory of aging: Alzheimer's disease pathogenesis. *AGE*. [online]. 1995, 18(3), 97-119 [cit. 2016-12-10]. DOI: 10.1007/BF02436085. ISSN 0161-9152.  
Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02436085>.
- [15] CREWS, L., MASLIAH, E., Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Human molecular genetics*. [online]. 2010, 19(R1), R12-R20 [cit. 2016-12-10].  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20413653>.
- [16] PIDRMAN, V., *Demence pro praktické lékaře: diagnostika a léčba*. Praha: Maxdorf, c2005. Jessenius. ISBN 80-7345-052-6.
- [17] MURKRASCH, M., BIBOW, S., KORUKOTTU, J., JEGANATHAN, S., BIERNAT, J., GRIESINGER, C., MANDELKOW, E., ZWECKSTETTER, M., Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution. *PLoS Biol*. [online]. 2009, 7(2), e34 [cit. 2016-12-10]. DOI 10.1371/journal.pbio.1000034.  
Dostupné z: <http://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1000034>.
- [18] XIE, L., HELMARHOSRST, E., TADDEI, K., PLEWRIGHT, B., VAN BRONSWIJK, W., MARTINS, R., Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *Research Support*. [online]. 2002, 22(10), RC221 [cit. 2016-12-13].  
Dostupné z: <http://europepmc.org/abstract/med/12006603>.
- [19] EMBL-EBI. Amyloidofenic glycoprotein, amyloid-beta peptide [online]., 2017 <http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR013803> [cit. 2017-01-13]
- [20] <http://www1.lf1.cuni.cz/udmp/web2/cell/amyloid.htm> [cit. 2016-12-13]
- [21] O'BRIEN R. J., WONG, P. C., Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annual review of neuroscience*. [online]. 2011, 34(1), 185-

- 204 [cit. 2016-12-14]. DOI 10.1146/annurev-neuro-061010-113613. ISSN 0147-006x  
 Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3174086>.
- [22] AGAMANOLIS, D. P., Alzheimer's disease [online]., 2016 [cit. 2016-12-15].  
 Dospuné z: <http://neuropathology-web.org/chapter9/chapter9bAD.html>.
- [23] AMSTRONG, R. A., The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Folia Neuropathologica*. [online]. 2009, 47(4), 289-299 [cit. 2016-12-15].  
 Dostupné z: <https://www.termedia.pl/The-molecular-biology-of-senile-plaques-and-neurofibrillary-tangles-in-Alzheimer-8217-s-disease,20,13830,1,1.html>.
- [24] BAIK, S. H., KANG, S., SON, S. M., MOOK-JUNG, I., Microglia contributes to plaque growth by cell death due to uptake of amyloid  $\beta$  in the brain of Alzheimer's disease mouse model. *Glia*. [online]. 2016, 64(12), 2274-2290 [cit. 2016-12-16]. DOI 10.1002/glia.23074. ISSN 08941491.  
 Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.23074/abstract>.
- [25] BARTOŠ, A., Schématický mikroskopický obraz mozku pacienta s AD při srovnání s normálním mozke [online]., 2007 [cit 2016-12-16].  
 Dostupné z: <http://www.psychologon.cz/component/content/article/151-alzheimerova-choroba-pravdepodobne-priciny-a-prevence>.
- [26] ŠÁCHA, P., Mikroglie [online]., 2016 [cit. 2016-12-16].  
 Dostupné z: <https://www.celostnimedicina.cz/mikroglie.htm>.
- [27] <http://www.biology.estranky.cz/fotoalbum/histologie/nervovy-system/mikroglie.gif.-.html> [cit. 2016-12-17]
- [28] SERRANO-POZO, A., FROSCH, M. P., MASLIAH, E., HYMAN, B. T., Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in medicine*. [online]. 2011, 1(1), a006189-a006189 [cit. 2016-12-18]. DOI 10.1101/cshperspect.a006189. ISSN 2157-1422.  
 Dostupné z: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/1/1/a006189.full.pdf+html>.
- [29] PERL, D. P., Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Mount Sinai Journal of Medicine*. [online]. 2010, 77, 32-42 [cit. 2016-12-18].  
 Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/msj.20157/epdf>.

- [30] HOLTZMAN, D. M., HERZ, J., BU, G., Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. [online]. 2012, 2(3), [cit. 2016-12-19]. DOI 10.1101/cshperspect.a006312. ISSN 2157-1422.  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22393530>.
- [31] CHIA-CHEN, L., TAKAHISA, K., HUAXI, X., GUOJUN, B., Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms, and therapy. *Nature reviews. Neurology*. [online]. 2013, 9(2), 106-118 [cit. 2017-01-04].  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3726719>.
- [32] LIU, CH., KANEIYO, T., XU, H., BU, G., Apolipoprotein E and Alzheimer disease: Risk, mechanism and therapy. *Nature Reviews Neurology*. [online]. 2013, 9(4), 106-118 [cit. 2017-01-04].  
Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/234084475\\_Apolipoprotein\\_E\\_and\\_Alzheimer\\_disease\\_Risk\\_mechanisms\\_and\\_therapy](https://www.researchgate.net/publication/234084475_Apolipoprotein_E_and_Alzheimer_disease_Risk_mechanisms_and_therapy).
- [33] STRITTMATTER, W., SAUNDERS, A., SCHMECHEL, D., PERICAK-VANCE, M., ENGHILD, J., SALVESEN, G., ROSES A., Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. [online]. 1993, 90(5), 1977-81 [cit. 2017-01-5].  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8446617>.
- [34] ZIMA, T., *Laboratorní diagnostika. 2., dopl. a přeprac. vyd.* Praha: Galén, c2007. ISBN 9788072623723
- [35] MADEO, J., The Role of Oxidation Stress in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism*. [online]. 2013, 03(02), [cit. 2017-01-06].  
Dostupné z: <https://www.omicsonline.org/the-role-of-oxidative-stress-in-alzheimers-disease-2161-0460.1000116.php?aid=15262>.
- [36] CHMATALOVÁ, Z., SKOUMALOVÁ, A., Oxidační stress u Alzheimerovy choroby a jeho důsledky. *Klinická biochemie a metabolismus*. [online]. 2014, 22(43), 189-195 [cit. 2017-01-16].  
Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2014/2014-4/KBM-4-2014-Chmatalova-189.pdf>.

- [37] RACEK, J., *Oxidační stres a jeho ovlivnění*. Praha: Galén, c2003. Repetitorium. ISBN 80-726-2231-5.
- [38] GUTTERIDGE, J. M., Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical chemistry*. [online]. 1995, 41(12 Pt 2), 1819-28 [cit. 2017-01-16].  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7497639>.
- [39] ŠTÍPEK, S., *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Praha: Grada, 2000. ISBN 80-7169-704-4.
- [40] HŘEBÍČKOVÁ, Š., Antioxidanty a volné radikály: rozdělení, jejich kapacita a aktivita. *Czech Nutrition Society*. [online]. 2009, 30-33 [cit. 2017-01-18].  
Dostupné z: <http://www.vyzivaspol.cz/wp-content/uploads/2015/09/vyziva-2-2009.pdf>.
- [41] RACEK J., HOLEČEK, V., Enzymy a volné radikály. *Che. listy*. [online]. 1999, 93, 774-780 [cit. 2017-02-02].  
Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999\\_12\\_774-780.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_12_774-780.pdf)
- [42] LIOU, G., STORZ, P., Reactive oxygen species in cancer. *Free radical research*. [online]. 2010, 44(5), 479-496 [cit. 2017-02-07]. DOI 10.3109/10715761003667554. ISSN 1071-5762.  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3880197>.
- [43] LEDVINA, M., STOKLASOVÁ A., CERMAN, J., *Biochemie pro studující medicíny*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0851-0.
- [44] KYAW, M., YOSHIZUMI, M., TSUCHIVA, K., IZAWA, I., KANEMATSU, Y., TAMAKI, T., Atheroprotective effects of antioxidants through inhibition of mitogen-activated protein kinases. *Acta Pharmacologica Sinica*. [online]. 2004, 25(8), 977-985 [cit. 2017-02-07].  
Dostupné z: <http://www.chinaphar.com/1671-4083/25/977.pdf>.
- [45] KUPKOVÁ, Z., BENEŠ, L., Chemické vlastnosti, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého. *Chem. Listy* [online]. 2004, 98, 116-122 [cit. 2017-02-09].  
Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004\\_03\\_01.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_03_01.pdf).
- [46] FRAG, F. C., Reactive oxygen and nitrogen intermediate productio in mammalian cells [online]., 2004 [cit. 2017-02-09].



- Dostupné z:  
[http://www.nature.com/nrmicro/journal/v2/n10/fig\\_tab/nrmicro1004\\_F2.html](http://www.nature.com/nrmicro/journal/v2/n10/fig_tab/nrmicro1004_F2.html)
- [47] RACEK, J., Superoxiddismutáza [online]., 1999 [cit. 2017-02-10].  
<http://www.krevnicentrum.cz/laboratorni-prirucka/BOJRAAI.htm>.
- [48] MATUSKOVA, M., RUTTKAY-NEDECKY, B., KIZEK, R., Antioxidační enzymy–biochemické marker oxidačního stresu. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*. [online]. 2014, 3, 53-56 [cit. 2017-02-17].
- Dostupné z:  
[http://web2.mendelu.cz/af\\_239\\_nanotech/J\\_Met\\_Nano/0314/pdf/jmn3-13.pdf](http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0314/pdf/jmn3-13.pdf).
- [49] RACEK, J., Glutathion S-transferasa [online]., 2004 [cit. 2017-03-19].  
Dostupné z: <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/D/JRAAF.htm> .
- [50] BROCK, J. H., Iron-binding proteins. *Acta Paediatrica Scandinavica, Supplement* [online]. 1989, 361:31-43 [cit. 2017-03-21].  
Dostupné z: <http://europepmc.org/abstract/med/2485582>
- [51] KNOVICH, M. A., STOREY, J. A., COFFMAN, L. G., TORTI, S. V., Ferritin for the clinican. *Blood reviews*. [online]. 2009, 23(3), 95-104 [cit. 2016-03-25 ].  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2717717>.
- [52] VASSILIEV, V., HARRIS, Z. L., ZATTA, P., Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases. *Brain Reviews*. [online]. 2005, 49(3), 633-640 [cit. 2017-03-27]. DOI 10.1016{j.brainresrev.2005.03.003. ISSN 01650173
- Dostupné z:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165017305000469>.
- [53] RUTTKAY-NEDECKY, B., NEJDL, L., GUMULEC, J., ZITKA, O., MASARIK, M., ECKSCHLAGER, T., STIBOROVA, M., ADAM, ADAM, V., KRIZEK, R., The Role of Metallothionein in Oxidative Stress. *International journal of molecular sciences*. [online]. 2013, 14(3), 6044-6066 [cit. 2017-03-28].  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3634463>.
- [54] KODICEK, M., Biochemické pojmy: výkladový slovník. [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2017-04-01].  
Dostupné z: [http://147.33.74.135/knihy/uid\\_es-002/ebook.html?p=chaperon](http://147.33.74.135/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=chaperon).
- [55] SCHAER, D. J., VINCHI, F., INGOGLIA, G., TOLOSANO, E., BUEHLER, P. W., Haptoglobin, hemopexin, and related defense pathways-basic science,

- clinical perspectives, and drug development. *Frontiers in physiology*. [online]. 2014, 5, 415 [cit. 2017-04-01].  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4211382>.
- [56] RAHMAN, K., Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical interventions in aging*. [online]. 2007, 2(2), 219-236 [cit. 2017-04-05].  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2684512>.
- [57] CHANG, Y., CHANNG, W., TSAI, N., et al. The Roles of Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant in Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *BioMed Research International*. [online]. 2014, 2014, 1-14 [cit. 2017-06-18]. DOI 10.1155/2014/182303. ISSN 2314-6133  
Dostupné z : <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/182303/>.
- [58] YIKRAZUUL. L-ascorbic acid [online]., 2009 [cit. 2017-04-05].  
Dostupné z: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:L-Ascorbic\\_acid.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:L-Ascorbic_acid.svg).
- [59] NEUR Otiker. Struktue of alpha-Tocopherol [online]., 2008 [cit. 2017-04-05].  
Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Alpha-Tocopherol.svg>.
- [60] RAUCHOVA, H., VOKURKOVA, M., Současný pohled na koenzym Q. *Chem. Listy*. [online]. 2009, 103. 32-39 [cit. 2017-04-16].  
Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009\\_01\\_32-39.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_01_32-39.pdf)
- [61] LASS, A., AGARWAL, S., SOHAL, R. S., Mitochondrial Ubiquinone Homologues , Superoxide Radical Generation, and Longevity in Different Mammalian Species. *Journal of Biological Chemistry*. [online]. 1997, 272(31), 19199-19204 [cit. 2017-04-16].  
Dostupné z: <http://www.benbest.com/nutrceut/CoEnzymeQ.html>
- [62] [http://hplc1.sweb.cz/Carotenoids/ch\\_karotenoids.htm](http://hplc1.sweb.cz/Carotenoids/ch_karotenoids.htm) [cit. 2017-04-16].
- [63] POLIMEREK. Chemical structure of  $\beta$ -carotene [online]., 2006 [cit. 2017-04-16].  
Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Beta-carotene.png>
- [64] CHAKRAVARTHI, S., JESSOP, C. E., BULLEID, N. J., The role of glutathione in disulfide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO reports*. [online]. 2006, 7(3), 271-275 [cit. 2017-04-20].  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1456887>.
- [65] SETTLE, T., KLANDORF, H., The Role of Uric Acid as an Antioxidant in Selected Neurodegenerative Disease Pathogenesis: A Short Review. *Brain*

- Disorders and therapy*. [online]. 2014, 3:129 [cit. 2017-05-2]. DOI 10.4172/2168-975X. ISSN 2168975x.  
Dostupné z: <https://www.omicsgroup.org/journals/the-role-of-uric-acid-as-an-antioxidant-in-selected-neurodegenerative-disease-pathogenesis-a-short-review-2168-975X.1000129.php?aid=26410>.
- [66] KVASNICOVÁ, V., Urát [online]., 2004 [cit. 2017-05-2]  
Dostupné z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/AJDJZ.htm>.
- [67] ZOOFARI. Urid Acid [online]., 2009 [cit. 2017-05-2].  
Dostupné z: [http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Uric\\_Acid.svg](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Uric_Acid.svg).
- [68] SCHWARZ, J., GONCHAROVA, I., Využití spektroskopie ECD ke sledování konkurenční vazby léčivo-bilirubin na sérový albumin: role sekundárních vazebných míst. *Chem. Listy*. [online]. 2013, 107, 261-264 [cit. 2017-05-06].  
Dostupné z : [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2013\\_s2\\_s261-s264.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2013_s2_s261-s264.pdf)
- [69] NEUR Otiker. Structure of bilirubin [online]., 2007 [cit. 2017-05-10].  
Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Bilirubin#/media/File:Bilirubin.svg>.
- [70] THEROND, P., Oxidative stress and damages to biomolecules (lipids, proteins, DNA). *Annales pharmaceutiques francaises*. [online]. 2006, 64(6), 383-9 [cit. 2017-05-10].  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17119467>.
- [71] JANICKA, M., KOT-WASIK, A., KOT, J., NAMIESNIK, J., Isoprostanes- Biomarkers of Lipid Peroxidation: Their Utility in Evaluating Oxidative Stress and Anylysis. *International journal of molecular sciences*. [online]. 2010, 11(11), 4631-4659 [cit. 2017-05-10].  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3000105>.
- [72] OSLVIK, P., KRISTENSEN, T., WAAGBO, R., ROSSELAND B., TOLLEFSEN, K., BAEVERFJORD, G., BERNTSSEN, M., mRNA expression of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GSH-Px) and lipid peroxidative stress in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to hyperoxic water during smoltification. *Comparative biochemistry and physiology C, Toxicology and pharmacology*. [online]. 2005, 141(3), 314-23 [cit. 2017-06-05].  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16107325>.
- [73] LUSHCHAK, V., Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology*. [online]. 2011, 101(1), 13-30 [cit. 2017-06-05].

- Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21074869>.
- [74] <http://pvac.vscht.cz/ustav/vyzkumne-projekty/biomarkery-oxidacniho-stresu>.  
[cit. 2017-06-05].
- [75] PRATICO, D., Evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease brain and antioxidant therapy: lights and shadows. *Annals of the New York Academy of Sciences*. [online]. 2008, 1147:70-8 [cit. 2017-05-18].  
Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1196/annals.1427.010/abstract>.
- [76] CATALA, A., Lipid Peroxidation [online]., 2012 [cit. 2017-02-16].  
Dostupné z: <http://library.umac.mo/ebooks/b28050253.pdf>.
- [77] HUDSON, B. J., Food Antioxidants. Dordrecht: Springer Netherlands , 1990. ISBN 9789400907539.
- [78] VICKERS TIM. Radical chain reaction mechanism of lipid peroxidation [online]., 2007 [2017-02-16].  
Dostupné z: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lipid\\_peroxidation.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lipid_peroxidation.svg)
- [79] CLOUD-CLONE CORP. Malondialdehyde [online]., 2009 [cit. 2017-02-16].  
Dostupné z: <http://www.cloud-clone.com/items/A597.html>.
- [80] SOURCE, Malondialdehyde [online]., 2005 [cit. 2017-02-16].  
Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Malondialdehyde#section=Top>.
- [81] MATEJICKOVA, J., SAMEC, M., JACEK, M., TUMA, P., Monitorování malondialdehydu u pacientek s karcinomem dělohy a vaječníku pomocí HPLC. *Chem. Listy*. [online]. 2011, 105, 375-380 [cit. 2017-05-24 ].  
Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011\\_05\\_375-380.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_05_375-380.pdf).
- [82] DEL RIO, D., STEWART, A., PELLAGRINI, ., A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular disease*. [online]. 2005, 15(4), 316-28 [cit. 2017-05-26].  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16054557>.
- [83] AYBEK, H., ERCAN, F., ASLAN, D., SAHINER, T., Determination of malondialdehyde, reduced glutathione levels and APOE4 allele frequency in late-onset Alzheimer's disease in Denizli, Tuerkey. *Clinical Biochemistry*. [online]. 2007, 40(3-4), 172-6 [cit. 2017-06-12].

- Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17069783>.
- [84] BEETLE403. Malondialdehyde [online]., 2017 [cit. 2017-05-26].  
Dostupné z: <http://www.curezone.org/ig/i.asp?i=60579>.
- [85] AWASTHI, Y., YANG, Y., TIWARI, N., PATRICK, B., SHARMA, A., LI, J., AWASTHI, S., Regulation of 4-hydroxynonenal-mediated signaling by glutathione S-transferases. *Free radical biology and medicine*. [online]. 2004, 37(5), 607-19 [cit. 2017-05-26].  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15288119>.
- [86] CHEN, Z., NIKI, E., 4-Hydroxynonenal (4-HNE) has been widely accepted as an inducer of oxidative stress. Is this the whole truth about it or can 4-HNE also exert protective effects? \*. *IUBMB Life*. [online]. 2006-5-1, 58(5-6), 372-373 [cit. 2017-05-29]. DOI: 10.1080/15216540600686896. ISSN 1521-6543.  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16754333>.
- [87] DSCHANZ. Chemical structure of 4-hydroxy-2-nonenal [online]., 2007 [cit. 2017-05-29].  
Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:4-Hydroxy-2-nonenal.svg>.
- [88] MONTUSCHI, P., CORRADI, M., CIABATTONI, G., NIGHTINGALE, J., KHARITONOV, S., BARNES, P., Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *American journal of respiratory and critical care medicine*. [online]. 1999, 160(1), 216-20 [cit. 2017-05-22].  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10390403>.
- [89] ROBERTS, J. 2<sup>nd</sup>, FESSEL, J., The biochemistry of the isoprostane, neuroprostane, and isofuran pathways of lipid peroxidation. *Chemistry And physics of lipids*. [online]. 2004, 128(1-2), 173-86 [cit. 2017-05-22].  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15037162>.
- [90] SKOUMALOVÁ, A., HORT, J., Blood markers of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Journal of cellular and molecular medicine*. [online]. 2012, 16(10), 2291-2300 [cit. 2017-05-31].
- [91] NIKOLAIDIS, M. G., KYPAROS, A., VRABAS, I. S., F2-isoprostane formation, measurement and interpretation: The role of exercise. *Progress in*

*Lipid Research*. [online]. 2011, 50(1), 89-103 [cit. 2017-05-30]. DOI 10.1016/j.plipres.2010.10.002. ISSN 01637827.

Dostupné z:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163782710000500>.

- [92] BUTTERFIELD, D. A., DRAKE, J., POCERNICH, CH., CASTEGNA, A., Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid  $\beta$ -peptide. *Trends in Molecular Medicine*. [online]. 2001, 7(12), 548-554 [cit. 2017-05-30]. DOI: 10.1016/S1471-4914(01)02173-6. ISSN 14714914. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491401021736>.

- [93] MEDICAL ISOTOPES. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine [online]., 2017 [cit. 2017-05-30].

Dostupné z:

[http://www.medicalisotopes.com/display\\_product.php?catnum=26391&cat\\_id=197&caller=CUSTOM](http://www.medicalisotopes.com/display_product.php?catnum=26391&cat_id=197&caller=CUSTOM).

- [94] ĎURÁČKOVÁ, Z., Vol'né radikály a antioxidyanty v medicíne I. Bratislava: Slovak Academic Press, 1998. ISBN 80-88908-11-6.

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3823422/>.

- [95] BALTACIOGLU, E., ALVER, A., DEGER, O., KARABULUT, E., *Archives of Oral Biology*. [online]. 2008, 34(7), 558-565 [cit. 2017-05-31].

Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-051X.2007.01091.x/full>.

- [96] <http://www.alzheimercentrum.cz/alzheimerovo-onemocneni/alzheimerova-choroba/> [cit. 2017-06-10].

- [97] HELLOU, J., ROSS, N. W., MOON, T. W., Glutathione, glutathione S-transferase, and glutathione conjugates, complementary markers of oxidative stress in aquatic biota. *Environmental Science and Pollution Research*. [online]. 2012, 19(6), 2007-2023 [cit. 2017-05-31]. DOI 10.1007/s11356-012-0909-s. ISSN 0944-1344.

Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11356-012-0909-x>.

- [98] BISWAS, S., RAHMAN, I., Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Molecular aspects of medicine*. [online]. 2009,30(1-2), 60-76 [cit. 2017-06-04].

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18760298>.

- [99] PIZZORNO, J., Glutathione! *Integrative medicine (Encinitas)*. [online]. 2014, 13(1), 8-12 [cit. 2017-06-04].  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4684116>.
- [100] NEUR, Otiker. Struktura of glutathione [online]., 2007 [cit. 2017-06-05].  
Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Glutathion#/media/File:Glutathion.svg>.
- [101] OBŠIL, T., PAVLICEK, Z., Glykace proteinů a fosfolipidů: Maillardova reakce in vivo. *Chem. Listy*. [online]. 1997, 91, 558-569 [cit. 2017-06-05].  
Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1997\\_08\\_558-569.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1997_08_558-569.pdf).