



**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**



Ústav lékařské chemie a biochemie 2.LF UK

**Matej Kohutiar**

**Stanovenie fluorescenčných produktov  
v erythrocytoch u pacientov s Alzheimerovou  
chorobou**

*Assay of fluorescent products in erythrocytes of  
patients with Alzheimer' s disease*

*Diplomová práce*

Praha, 2010

Autor práce: Matej Kohutiar

Študijný program: Magisterský

Študijný odbor: Všeobecné lekárstvo

Vedúci práce: **Prof. RNDr. Jiří Wilhelm, PhD.**

Pracovisko vedúceho práce: **Ústav lékařské chemie a  
biochemie 2.LF UK**

Dátum a rok obhajoby: 28.6.2010

## **Prehlásenie**

Prehlasujem, že som predkladanú prácu spracoval samostatne a použil len uvedené pramene a literatúru. Súčasne dávam zvolenie k tomu, aby táto diplomová práca bola používaná k študijným účelom.

V Prahe, dňa 28. júna 2010

Matej Kohutiar

## **Pod'akovanie**

Na tomto mieste by som rád poďakoval pánu profesorovi Wilhelmovi za odborné vedenie, poskytnutie zázemia a materiálov, bez ktorých by vypracovanie mojej diplomovej práce nebolo možné. Taktiež by som rád poďakoval Bc. Michalovi Pekovi za pomoc a korektúru anglickej verzie súhrnu práce.

## Obsah

<b>ZOZNAM SKRATIEK .....</b>	<b>7</b>
<b>ÚVOD.....</b>	<b>8</b>
<b>1. VOĽNÉ RADIKÁLY A RADIKÁLOVÉ REAKCIE.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 REAKTÍVNE ZLÚČENINY KYSLÍKA (ROS).....</b>	<b>10</b>
1.1.1 Kyslík.....	10
1.1.2 Superoxidový radikál.....	11
1.1.3 Peroxid vodíka.....	11
1.1.4 Kyselina chlórna.....	12
1.1.5 Hydroxylový radikál.....	12
<b>1.2 REAKTÍVNE ZLÚČENINY DUSÍKA (RNS).....</b>	<b>12</b>
1.2.1 Oxid dusnatý a peroxyntitrit.....	13
<b>1.3 BIOCHEMICKÝ VÝZNAM VOĽNÝCH RADIKÁLOV.....</b>	<b>14</b>
1.3.1 Voľné radikály a enzýmy.....	14
1.3.2 Voľné radikály a imunitný systém.....	14
1.3.3 Voľné radikály a bunčná signalizácia.....	15
<b>1.4 ANTIOXIDAČNÁ OBRANA BUNKY.....</b>	<b>15</b>
1.4.1 Enzýmové antioxidačné mechanizmy.....	16
1.4.1.1 Superoxiddismutáza.....	16
1.4.1.2 Glutathionperoxidáza.....	16
1.4.1.3 Kataláza.....	17
1.4.2 Neenzýmové antioxidačné mechanizmy.....	17
1.4.2.1 Glutathion.....	17
1.4.2.2 Kyselina askorbová.....	18
1.4.2.3 Tokoferol.....	19
1.4.3 Tranzitné kovy a voľné radikály.....	20
1.4.3.1 Úloha železa v biochémi voľných radikálov.....	20
1.4.3.2 Úloha medi v biochémi voľných radikálov .....	21
1.4.4 Antioxidačná rovnováha.....	21
<b>1.5 OXIDATÍVNE POŠKODENIE BIOMOLEKÚL.....</b>	<b>22</b>
1.5.1 Peroxidácia lipidov.....	22
1.5.2 Poškodenie proteínov.....	23
1.5.3 Poškodenie nukleových kyselín.....	24
<b>2. ALZHEIMEROVA CHOROBA.....</b>	<b>25</b>
<b>2.1 NEUROPATOLÓGIA ALZHEIMEROVEJ CHOROBY.....</b>	<b>25</b>
<b>2.2 LIPOFUSCINOIDNÉ PIGMENTY.....</b>	<b>26</b>

<b>3.</b>	<b>LUMINISCENCIA A LUMINISCENČNÁ SPEKTROSKOPIA.....</b>	<b>28</b>
3.1	LUMINISCENCIA.....	28
3.2	FLUOROFORY.....	29
3.2.1	<i>Fluorescencia proteínov.....</i>	<i>29</i>
3.3	FLUORESCENČNÁ SPEKTROSKOPIA.....	30
3.4	SYNCHRÓNNA FLUORESCENČNÁ SPEKTROSKOPIA.....	31
<b>4.</b>	<b>EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....</b>	<b>32</b>
4.1	POPIS EXPERIMENTU.....	32
4.2	VÝSLEDKY.....	32
<b>5.</b>	<b>DISKUSIA.....</b>	<b>37</b>
	<b>ZÁVER.....</b>	<b>39</b>
	<b>SÚHRN.....</b>	<b>40</b>
	<b>SUMMARY.....</b>	<b>42</b>
	<b>ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY.....</b>	<b>44</b>
	<b>ZOZNAM OBRÁZKOV A TABULIEK.....</b>	<b>49</b>
	<b>ZOZNAM PRÍLOH.....</b>	<b>50</b>

## **Zoznam skratiek**

**1.LF UK** 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy

**A $\beta$**  – amyloid  $\beta$

**AD** Alzheimer's disease

**AP-1** Activator protein 1, transkripčný faktor

**APP** Amyloidový prekurzorový proteín

**DNA** Deoxyribonucleic acid

**FAD** Flavinadenindinukleotid

**GPx** Glutathionperoxidáza

**GSH** Glutathion, redukovaná forma

**GSSG** Glutathion, oxidovaná forma

**LDL** Low density lipoprotein

**LFP** Lipofuscin like pigments

**NADH** Nikotinamidadenindinukleotid

**NADPH** Nikotinamidadenindinukleotidfosfát

**NF- $\kappa$ B** Nukleárny faktor  $\kappa$ B

**p47** Proteín 47

**Phe** Fenylalanín

**ROS** Reactive oxygen species

**RNS** Reactive nitrogen species

**SOD** Superoxiddizmutáza

**Trp** Tryptofan

**Tyr** Tyrozín

**UV** Ultra violet

**VFN** Všeobecná fakultní nemocnice

## Úvod

Tému „Stanovenie fluorescenčných produktov v erythrocytoch u pacientov s Alzheimerovou chorobou“ som si vybral pre svoj dlhodobý záujem o chemické odbory. Získal som možnosť stať sa súčasťou poznávacieho procesu, zúročiť vedomosti, ktoré mi dalo štúdium na lekárskej fakulte, a získať skúsenosti s experimentálnou prácou v laboratóriu.

Živá hmota je zložená z atómov, preto v nej platia rovnaké chemické zákony a princípy ako v sústave neživej. Obrovský rozvoj vedy a poznania v posledných desaťročiach posúva medicínu stále viac na úroveň molekúl. Množstvo nových poznatkov je dokladom, že pochopiť chorobu a procesy, ktoré k nej vedú nie je bez porozumenia normálnej fyziológie a metabolizmu možné. Alzheimerova choroba patrí do kategórie chronických progresívnych ochorení výrazne znižujúcich kvalitu života postihnutého a jeho okolia. Príčina choroby nie je známa.

V svojej práci sa snažím bližšie pochopiť mechanizmy vedúce k poškodeniu nervových buniek z hľadiska radikálovej teórie vzniku demencie Alzheimerovho typu.

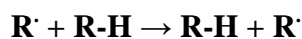
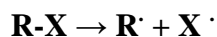


# 1. Voľné radikály a radikálové reakcie

Radikály obsahujú v molekule atóm, ktorý obsahuje v orbitale jeden nespárovaný elektrón. Molekula môže byť neutrálna, alebo elektricky nabitá. Štruktúru s nespárovaným elektrónom a kladným nábojom nazývame kationradikál, záporne nabitú aniónradikál. Radikály patria medzi mimoriadne reaktívne častice, ktoré nevykazujú rovnakú stabilitu. Prítomnosť aromatického jadra v molekule zlúčeniny výrazne zvyšuje stabilitu radikálu z dôvodu konjugácie voľného elektrónu s  $\pi$ -elektrónmi aromatického jadra [1]. Chemická väzba môže byť štiepená homolyticky (nepolárne) alebo heterolyticky (polárne). Pre reakcie prebiehajúce mechanizmom radikálovej substitúcie je charakteristická:

1. fáza iniciácie
2. fáza propagácie
3. fáza terminácie

Vo fáze iniciácie dochádza k vzniku vlastného radikálu. Iniciácia prebieha spontánne, alebo pôsobením svetla, tepla, UV-žiarenia, organických peroxidov, látok s nízko energetickými väzbami (disulfidy, azozlúčeniny). Vo fáze propagácie dochádza k reťazovej reakcii medzi radikálom a substrátom s tvorbou ďalších a ďalších radikálov. Proces propagácie je ukončený vzájomným spojením dvoch radikálov – terminácia.



Pre reťazovú radikálovú reakciu je charakteristická jej nekoordinovanosť a potenciál zapojiť do reakcie mnoho molekúl. Rada biologicky významných zlúčenín môže mať radikálový charakter a podliehajú tak radikálovým procesom.

## 1.1 Reaktívne zlúčeniny kyslíka (ROS)

Do súboru ROS radíme reaktívne látky radikálového i neradikálového charakteru. Tabuľka uvádza najvýznamnejšie reaktívne formy kyslíka:

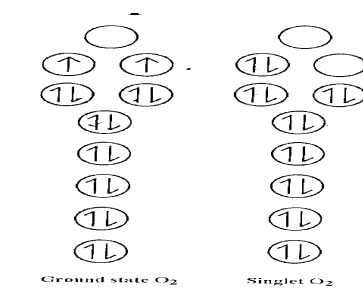
Tabuľka č. 1: Reaktívne zlúčeniny kyslíka<sup>1</sup>

Radikály	Ne-radikály
superoxid $O_2^-$	peroxid vodíka $H_2O_2$
hydroperoxid $HO_2$	kyselina chlórna $HClO$
hydroxylový radikál $OH$	singletový kyslík $^1O_2$
alkoxyl $RO$	ozón $O_3$
peroxyl $ROO$	

### 1.1.1 Kyslík

Atmosférický kyslík je z hľadiska elektrónovej štruktúry biradikál. Usporiadanie elektrónov v molekulových orbitaloch znázorňuje obrázok:

Obrázok č. 1: Usporiadanie elektrónov v orbitaloch kyslíka<sup>2</sup>



<sup>1,2</sup> Zdroj: KALOISOVÁ, M. et al. *Patobiochemie ve schématech*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006.

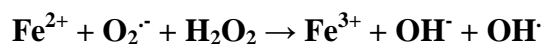
Kyslík s elektrónovým usporiadaním vľavo s dvoma voľnými elektrónmi v orbitaloch zodpovedá tripletovomu stave. V pravom diagrame sa nachádza elektrónový pár v jedinom orbitale s multiplicitou singletového kyslíka. Singletový kyslík je energeticky na vyššej úrovni, preto vykazuje vysokou reaktivitu [2]. Nepovažujeme ho ale za voľný radikál, pretože všetky elektróny sú spárované. Vysoká reaktivita a schopnosť iniciovať radikálové reakcie ho radí k ROS.

### 1.1.2 Superoxidový radikál

Hypoteticky vzniká spojením molekuly kyslíka s voľným elektrónom. Je nositeľom záporného náboja a jedného nespárovaného elektrónu. Superoxid sám o sebe nie je príliš reaktívny a v bunke podlieha dizmutačným reakciám. Bežne vzniká v červených krvinkách oxidáciou hemoglobínu na methemoglobin a v dýchacom reťazci [4].

### 1.1.3 Peroxid vodíka

Peroxid vodíka nepatrí medzi výrazne reaktívne molekuly. Voľne prechádza bunecnými membránami a je schopný difundovať ďaleko od miesta svojho vzniku [3]. Podlieha neenzymatickej reakcii so superoxidom v prítomnosti katiónov tranzitných prvkov, hlavne železa a medi:

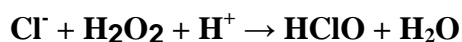


Jeho nebezpečný potenciál skrýva vyššie zapísaná Haberova-Weissova reakcia, kde sa peroxid vodíka stáva zdrojom nebezpečných hydroxylových radikálov. Špeciálnym prípadom Haberovej-Weissovej reakcie je Fentonova reakcia rozkladu peroxidu vodíka v prítomnosti železnatého katiónu [4]:



#### 1.1.4 Kyselina chlórna

Kyselina chlórna je slabá anorganická kyselina vznikajúca v neutrofiloch v priebehu oxidačného vzplanutia. Vzniká pôsobením peroxidu vodíka na anióny halogenvodíkových kyselín (hlavne Cl<sup>-</sup>) za katalýzy myeloperoxidázou [4].:



Kyselina chlórna je veľmi silné oxidačné činidlo, atakuje sulfanylové a primárne aminoskupiny proteínov. Významne sa podieľa na mechanizmoch tkanivového poškodenia [4].

#### 1.1.5 Hydroxylový radikál

Hydroxylový radikál je zo všetkých uvedených reaktívnych foriem kyslíka najreaktívnejší a najtoxickejší. Je schopný napadnúť všetky druhy biomolekúl a vyvolať ich deštrukciu. V metabolizme vzniká nasledujúcim mechanizmom:

1. Haberova-Weissova reakcia
2. Reakcia kyseliny chlórnej so superoxidom
3. Fotolýzou vody vyvolanou ionizujúcim žiarením
4. Rozkladom peroxyinitritu

V bunke má veľmi krátky polčas rozpadu, preto pôsobí v mieste svojho vzniku [3].

### 1.2 *Reaktívne zlúčeniny dusíka (RNS)*

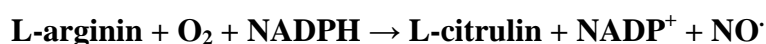
Do súboru RNS radíme podobne ako v prípade reaktívnych foriem kyslíka dusíkaté zlúčeniny radikálového i neradikálového charakteru:

Tabuľka č. 2: Reaktívne zlúčeniny dusíka <sup>3</sup>

Radikály	Ne-radikály
oxid dusnatý NO <sup>•</sup>	nitrosonium NO <sup>+</sup>
oxid dusičitý NO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	nitronium NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>
	nitroxyl NO <sup>-</sup>
	kyselina dusitá HNO <sub>2</sub>
	oxid dusitý a dusičitý , N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
	peroxynitrit ONOO <sup>-</sup>

### 1.2.1 Oxid dusnatý a peroxynitrit

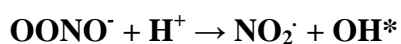
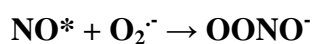
Oxid dusnatý NO je plynňý radikál, v metabolizme vznikajúci z L-argininu v NO syntázovej reakcii [2]:



Existujú tri rôzne NO syntázy:

1. NOS I – konštitutívna, neuronálna
2. NOS II – inducibilná, fagocytárna
3. NOS III – konštitutívna, endoteliálna

Oxid dusnatý má v tkanivách krátky polčas, pretože reaguje s kyslíkom a superoxidovým radikálom [4]. Je fyziologicky inaktivovaný hemoglobínom. Toxicita je podmienená tvorbou peroxynitritu, ktorý sa v kyslom prostredí rozpadá na hydroxylový radikál [2]:



<sup>3</sup> Zdroj: KALOUSOVÁ, M.et al. *Patobiochemie ve schématech*. 1.vyd. Praha: Grada, 2006. 264 s. ISBN 80-247-1522-8.

### **1.3 Biochemický význam voľných radikálov**

Reaktívne formy kyslíka a dusíka sú nevyhnuté pre fyziologický priebeh metabolických procesov. Vznikajú v enzymaticky katalyzovaných reakciách a niektoré plnia významnú úlohu signálnych molekúl [7].

#### **1.3.1 Voľné radikály a enzýmy**

V každej enzymaticky katalyzovanej reakcii, kde enzým využíva molekulový kyslík ako substrát, existuje riziko vzniku voľných radikálov. K redukcii molekuly kyslíka na vodu dochádza v mitochondriách, v dýchacom reťazci. Odhaduje sa, že 1-2% celkovej telesnej spotreby kyslíka sa premení na superoxidový radikál. Hlavným miestom úniku elektrónov sú redoxné centrá dýchacích komplexov, najmä komplex I a III [2]. Molekula peroxidu vodíka a superoxidu ostáva viazaná na enzým, čím sa minimalizuje poškodenie okolitých bunčných štruktúr [7].

Oxygenázy, sú enzýmy využívajúce molekulový kyslík ako substrát. Oxygenázovou aktivitou vstupuje do molekúl hydroxylová skupina. Molekula sa tak stáva polárnejšou a rozpustnejšou vo vodnom prostredí [7]. Pre bioyntézu žľčových kyselín, catecholamínov, steroidov, degradáciu niektorých aminokyselín a transformáciu xenobiotík je preto prítomnosť oxygenáz nevyhnutná.

#### **1.3.2 Voľné radikály a imunitný systém**

Pozitívny vplyv voľných radikálov možno demonštrovať na ich účelnom využití mechanizmami imunitného systému. Imunokompetentné bunky (granulocyty, eozinofily, monocyty a makrofágy) obsahujú vo svojej bunčnej membráne NADPH-oxidázu [3]. Po aktivácii cudzorodým materiálom mikrobiálneho pôvodu dôjde k respiračnému vzplanutiu. Produktom reakcie katalyzovanej NADPH-oxidázou je superoxidový radikál, ktorý pôsobením superoxiddizmutázy dizmutuje na peroxid vodíka a kyslík [4].

Reakciou peroxidu vodíka s halidovými aniónmi za katalýzy myeloperoxidázou vzniká kyselina chlórna HClO, silné oxidačné činidlo a baktericídna látka. Reaktívne zlúčeniny kyslíka slúžia imunitnému systému ako účinná zbraň v boji proti mikróbov a nádorovým bunkám [2].

### **1.3.3 Voľné radikály a bunčná signalizácia**

Tvorbu reaktívnych foriem kyslíka v bunke môže vyvolávať aj väzba cytokínov a interleukínov na membránové receptory [3]. Zistilo sa, že transkripčné faktory NF- $\kappa$ B a AP-1 menia svoju aktivitu pôsobením ROS [7]. Oba faktory riadia expresiu génov riadiacich syntézu mediátorov zápalovej odpovede [2]. Momentálne nie je ale k dispozícii dôkaz, že ROS skutočne patria do kategórie signálnych molekúl [7].

## **1.4 Antioxidačná obrana bunky**

V priebehu fylogenetického vývoja a adaptácie biologických systémov na atmosféru a metabolizmus využívajúci kyslík ako substrát bolo nevyhnutné vyvinúť efektívny mechanizmus chrániaci živé organizmy pred toxickým pôsobením kyslíka a jeho metabolitov. Existujú tri známe možnosti, akými sa bunka môže pôsobeniu reaktívnych látok brániť [3, 7]:

1. Regulácia produkcie reaktívnych foriem
2. Zachytenie už vytvorených reaktívnych foriem
3. Reparácia poškodených biomolekúl

Antioxidačnú ochranu považujeme preto za prostriedok, akým sa bunka bráni pôsobeniu reaktívnych metabolitov. Fylogeneticky sa vytvorili antioxidačné systémy majúce charakter enzýmov a antioxidačných substrátov [3]. Niektoré antioxidačne pôsobiace látky zahŕňa tabuľka 3:

Tabuľka č. 3: Antioxidačné systémy <sup>4</sup>

Enzymové antioxidanty	Antioxidačné substráty
superoxiddizmutáza SOD	glutacion
glutacionperoxidáza GPx	kyselina askorbová
kataláza	tokoferol
laktoperoxidáza	ubichinon
cytochrómoxidáza	karotenoidy
mitochondriálny cytochromoxidázový systém	kyselina močová
	bilirubín
	tioly
	albumin
	kyselina lipoová

## 1.4.1 Enzymové antioxidačné systémy

### 1.4.1.1 Superoxiddismutáza

Superoxiddizmutáza sa nachádza v každej bunke. Pre svoju funkciu vyžaduje prítomnosť Cu, Zn alebo Fe v molekule. Existujú dva typy superoxiddizmutázy, podľa lokalizácie hovoríme o cytoplazmatickej SOD 1 a mitochondriálnej SOD2 [7]. Obe katalyzujú dizmutáciu superoxidového radikálu podľa reakcie:



### 1.4.1.2 Glutacionperoxidáza

Glutacionperoxidáza je enzým katalyzujúci oxidáciu glutacionu molekulou organického peroxidu podľa schémy:

<sup>4</sup> Zdroj: KALOUSOVÁ, M.et al. *Patobiochemie ve schématech*. 1.vyd. Praha: Grada, 2006. 264 s. ISBN 80-247-1522-8.



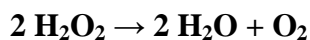


Ako substrát môže slúžiť aj peroxid vodíka  $\text{H}_2\text{O}_2$  [4]. Súčasťou aktívneho centra GPx je selenocystein [7]. Oxidovaný glutation musí byť spätne redukovaný, aby mohol plniť funkciu antioxidantu. Deje sa tak pôsobením glutationreduktázy za prítomnosti kofaktoru NADPH [3]:

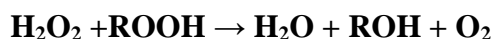


### 1.4.1.3 Kataláza

Kataláza sa nachádza vo všetkých typoch buniek a jej úlohou je odstraňovať peroxid vodíka z buniečného prostredia [2]:



Kataláza je tvorená štyrmi polypeptidovými reťazcami s kovalentne viazanými prostetickými skupinami protoporfyrinu s  $\text{Fe}^{3+}$  [7]. Nižšími rýchlosťami prebieha aj analogická peroxidázová reakcia [2, 7]:

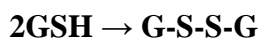
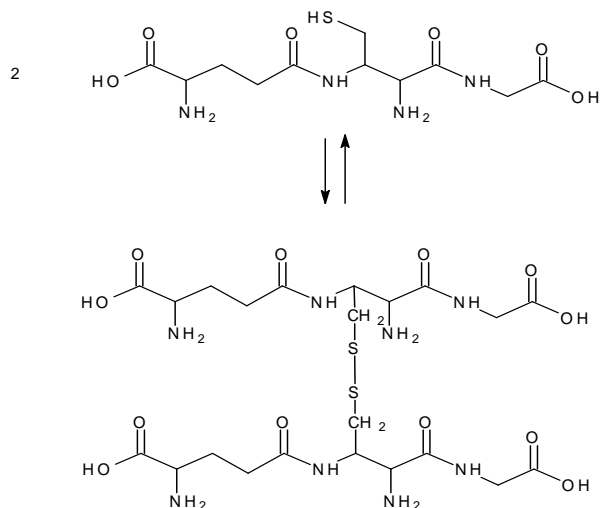


## 1.4.2 Neenzýmové antioxidantné systémy

### 1.4.2.1 Glutation

Glutation je tripeptid,  $\gamma$ -glutamylcysteinylglycín. Antioxidantné pôsobenie glutationu je založené na reverzibilnej oxidácii a redukcii molekuly:

Obrázok č. 2: Redoxná rovnováha glutationu

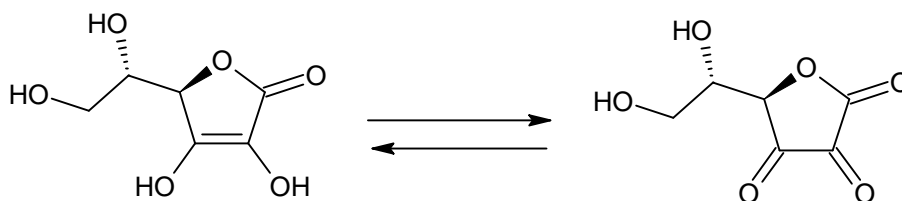


V bunkách sa nachádza v pomerne vysokej koncentrácii (1-10mmol/l) a patrí medzi najvýznamnejšie redoxné pufry [7].

### 1.4.2.2 Kyselina askorbová

Kyselina askorbová je antioxidant sacharidovej povahy. V metabolizme je nevyhnutná pre syntézu kolagénu, catecholamínových hormónov, zúčastňuje sa na vstrebávaní železa z tráviaceho traktu. Kyselina askorbová je vratne oxidovaná na kyselinu dehydroaskorbovú, ktorá nevratne hydrolyzuje na kyselinu dioxogulonovú [8]. Rovnováhu popisuje reakcia:

Obrázok č. 3: Redoxná rovnováha kyseliny askorbovej

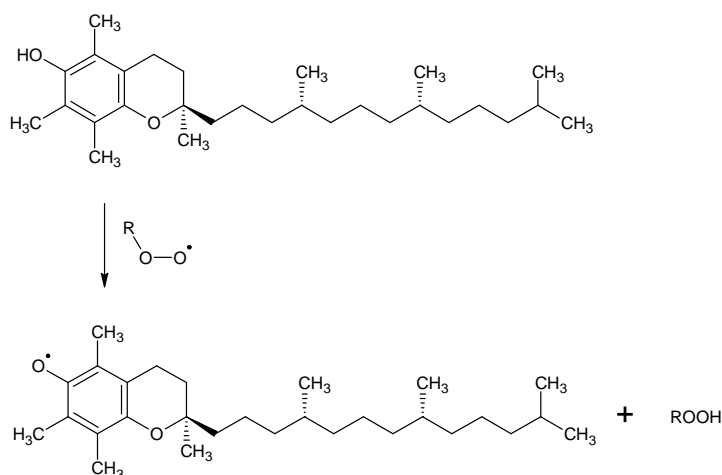


Dehydroaskorbát sa vratne premieňa na askorbát pôsobením dehydroaskorbátoreduktázy za prítomnosti glutationu. Reakcia je postupná a premena prebieha za tvorby askorbylového radikálu [7].

### 1.4.2.3 Tokoferol

V prírode existuje mnoho foriem tokoferolu, najrozšírenejší a biologicky najvýznamnejší je D- $\alpha$ -tokoferol [4]. Mechanizmus antioxidačného pôsobenia je založený na schopnosti tokoferolu prerušiť propagáciu radikálovej reakcie. Zdá sa, že pôsobí ako ochranný faktor, zabraňujúci oxidácii látok lipidového charakteru. V lipoproteínoch triedy LDL je najviac zastúpeným antioxidantom. Vysoké koncentrácie tokoferolu v LDL zabraňujú tvorbe oxidovaných LDL hrajúcich významnú úlohu v patogenéze aterosklerózy [4]. Nemalé sa zdá byť protektívne pôsobenie tokoferolu na nervové bunky a jeho účasť na patogenéze neurodegeneratívnych ochorení typu Alzheimerovej choroby [10]. Reakciu tokoferolu s radikálom zobrazuje schéma:

Obrázok č. 4: Redoxná rovnováha tokoferolu



### 1.4.3 Tranzitné kovy a voľné radikály

Medzi biologicky významné tranzitné (prechodné) kovy patrí železo a meď. Kovy sa nachádzajú vo všetkých proteínoch využívajúcich molekulu kyslíka ako substrát [2].

#### 1.4.3.1 Úloha železa v biochémií voľných radikálov

V absolútnom množstve obsahuje ľudské telo asi 4 g železa. Z toho 70% pripadá na hemoglobín, 20-30% na zásobnú formu ferritin a 10% na myoglobín, cytochrómy a enzýmy viažúce hemové alebo nehémové železo[2].

Železo je biologicky aktívne vo forme železnateho  $\text{Fe}^{2+}$  a železitého katiónu  $\text{Fe}^{3+}$ . V plazme cirkuluje katión  $\text{Fe}^{2+}$  viazaný na molekulu ferritinu. Po oxidácii na  $\text{Fe}^{3+}$  sa viaže na transferín a vstupuje do buniek prostredníctvom transferínového receptora najmä na povrchu budúcich erytrocytov [15].

Potenciálna toxicita voľného železa je podmienená schopnosťou katalyzovať rozklad peroxidu vodíka Fentonovou reakciou:



Vznikajúci hydroxylový radikál pôsobí veľmi toxicky na okolité molekuly a poškodzuje ich štruktúru. Do Fentonovej reakcie môže vstupovať jedine železo voľné vo forme  $\text{Fe}^{2+}$  [2]. V experimentoch prevedených in vitro bol sledovaný potenciál neurotoxického peptidového fragmentu proteínu A $\beta$ . Prídavok 10 $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  zvýšil produkciu ROS v mitochondriálnej frakcii mozgovej kôry potkana po spoločnej inkubácii. Prídavok 0,5mM  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  nevykazoval výrazné zmeny v produkcii ROS. Vzhľadom na hypotézu o možnom pôsobení hliníka v patogenéze Alzheimerovej choroby je zaujímavé, že spoločná prítomnosť  $\text{FeSO}_4$  a  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  vo vzorke vyvolala masívnu produkciu ROS. Prítomnosť hliníka vyvolala významne vyššiu tvorbu ROS ako prítomnosť samotného železa [16, 17, 18].

### 1.4.3.2 Úloha medi v biochémií voľných radikálov

Ľudský organizmus obsahuje asi 100mg medi [7]. Meď je stopový prvok ako súčasť enzýmov sa zúčastňuje na metabolizme melanínu, syntéze kolagénu a elastínu, metabolizme železa, neurónov a premenách katecholamínov. Je zabudovaná do molekuly ceruloplazmínu, ktorý plní funkciu sérovej feroxidázy. Zabezpečuje oxidáciu železa pred jeho zabudovaním do molekuly transferínu [15]. V in vitro experimentoch prídavok 10  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  vyvolal tvorbu ROS v mitochondriálnej frakcii mozgovej kôry potkana [16]. Zdá sa, že komplex  $\text{Cu}^{2+}$ -A $\beta$  môže v mozgu pôsobiť prooxidačne a podporovať tvorbu ROS [19]. Narastajúci význam tranzitných kovov v rozvoji Alzheimerovej choroby dokladá i terapeutický prístup založený na znížení ich koncentrácie v mozgu. Metóda zahŕňa chelatačnú terapiu kombinovanú s technológiou nanočastíc [19].

### 1.4.4 Antioxidačná rovnováha

Za fyziologických okolností existuje prirodzená rovnováha medzi tvorbou a odstraňovaním reaktívnych metabolitov kyslíka a dusíka. Zabezpečenie plynulého toku eliminácie reaktívnych častíc je dané vyvážením tvorby a adekvátnou dostupnosťou antioxidačne pôsobiacich mechanizmov. Vzniká dynamická rovnováha, ktorá môže byť narušená nadmernou tvorbou voľných radikálov, prípadne neschopnosťou bunky častice eliminovať, alebo kombináciou oboch mechanizmov. Nerovnováha má za následkom rozvoj oxidačného stresu.

Na vzájomné pôsobenie antioxidantov v línii obrany nie je možné nazerať jednotlivo. Antioxidačný systém predstavuje zložitý komplex vzájomne spolupracujúcich mechanizmov. Systém bude v rovnováhe vtedy, keď bude existovať plynulý tok metabolitov biochemickými dráhami [7].

Nezastupiteľnú úlohu plnia reaktívne molekuly v mechanizmoch imunitných reakcií (kap. 1.3.2). Bakteriálne komponenty aktivujú membránový receptor imunokompetentných buniek. Aktivácia spúšťa sériu vnútrobunecných kaskád vedúcu k fosforylácii podjednotky p47 proteínu tvoriaceho aktívny

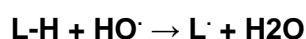
membránový komplex. Tým je zahájená riadená produkcia superoxidového radikálu. Mikroorganizmus vystavený pôsobeniu superoxidu (a ďalším reaktívnym látkam) podlieha lýze. Vysoká koncentrácia superoxidu môže byť účinne odstránená v prípade dostupnosti superoxididizmutázy. Vznikajúci peroxid vodíka je odstránený katalázou alebo glutathionperoxidázou. Glutathionperoxidáza využíva ako substrát redukovaný glutathion, ktorého dostupnosť závisí na dodávke NADPH z pentózafosfátového cyklu. Narušenie niektorého z uvedených krokov môže mať za následok prelomenie antiooxidačnej bariéry bunky s rozvojom oxidačného stresu. Oxidačný stres môže byť podkladom rôznych chorobných procesov [2, 7].

## ***1.5 Oxidatívne poškodenie biomolekúl***

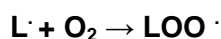
### **1.5.1 Peroxidácia lipidov**

Lipidy sú estery vyšších mastných kyselín s alkoholom (glycerol, sfingozín). Mastné kyseliny delíme na základe prítomnosti násobnej väzby na kyseliny nasýtené a nenasýtené. K oxidačným procesom sú výrazne náchylnejšie nenasýtené mastné kyseliny v dôsledku oslabenia väzby C-H [7]. Peroxidácia lipidov je oxidácia prebiehajúca radikálovým mechanizmom. Premena nenasýtenej mastnej kyseliny arachidónovej cyklooxygenázovou alebo lipooxygenázovou dráhou vedie mechanizmom cyklických endoperoxidov k tvorbe prostanoïdov a leukotriénov [4].

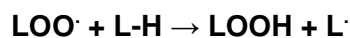
Nenasýtené mastné kyseliny v bunčných membránach sú neustále ohrozované reaktívnymi zlúčeninami kyslíka. Iniciátorom radikálovej peroxidácie môže byť napríklad hydroxylový radikál:



Radikál mastnej kyseliny ďalej reaguje s molekulovým kyslíkom za vzniku lipoperoxidu:



Peroxylový radikál pôsobí ako propagačné činidlo, pretože napadá susedné molekuly mastných kyselín:



Reťazová reakcia sa ukončí v prípade stretnutia dvoch radikálov, alebo reakciou radikálu s lapačom (scavenger, vitamín E) [7]. Neenzýmová peroxidácia lipidov vedie k cyklizácii a fragmentácii molekúl a tvorbe degradačných produktov. Za významné, analyticky stanoviteľné produkty lipoperoxidácie považujeme 4-hydroxynonenál a malondialdehyd [3]. Oba aldehydy sú schopné ďalej reagovať s molekulami proteínov a meniť ich štruktúru [9].

Dochádza k zosieťovaniu štruktúry proteínov, zmenám fluidity bunecnej membrány a aktivácii cytotoxických mechanizmov [2].

Nález 4-hydroxynonenálu, akroleínu, F2-izoprostanov v hippocampe, gyrus parahippocampalis, amygdale a cerebrospinálnej tekutine podporuje hypotézu úlohy produktov lipoperoxidácie v patogenéze Alzheimerovej choroby [14].

### 1.5.2 Poškodenie proteínov

V proteínoch sú k oxidácii náchylné niektoré aminokyselinové zbytky. Dochádza k oxidácii aromatických aminokyselín hydroxylovým radikálom (Trp, Phe, Tyr). Peroxynitrit nitruje tyrozín za vzniku nitrotyrozínu. Malondialdehyd a 4-hydroxynonenál reagujú s  $\epsilon$ -aminoskupinami lyzínu. Modifikácia aminokyselín vedie k zosieťovaniu a agregácii, čo znižuje stabilitu a zvyšuje náchylnosť k proteolýze [2, 7]. Signifikantne zvýšené množstvá oxidačne modifikovaných proteínov boli zaznamenané v mozgoch pacientov s Alzheimerovou chorobou najmä v oblasti parietálnych lalokov a hippocampe. Predpokladá sa, že proteíny A $\beta$  môžu indukovať tvorbu ROS a oxidáciu proteínov [13].

### 1.5.3 Poškodenie nukleových kyselín

Poškodenie nukleových kyselín vyvoláva najčastejšie hydroxylový radikál. Napadá purínové a pyrimidínové bázy. Z thyminu vzniká thyminglykol, cytozínu 5-hydroxycytozín, z guanínu 8-hydroxyguanosín a z adenínu 8-hydroxyadenín [3, 7]. V mozgu pacientov s pokročilou Alzheimerovou chorobou bola dokázaná zvýšená koncentrácia poškodených purínových a pyrimidínových báz. Zdá sa, že poškodenie DNA by mohlo byť vo vzťahu s patogenézou Alzheimerovej choroby, nakoľko poškodenie jadrovej i mitochondriálnej DNA bolo zaznamenané u pacientov s rozvíjajúcim sa kognitívnym deficitom [11, 12].



## 2. Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba patrí medzi najrozšírenejšie formy demencie. Jedná sa o primárne degeneratívne ochorenie mozgu nejasnej etiológie s charakteristickými neuropatologickými a neurochemickými prejavmi [20]. Alzheimerovu chorobu radíme do skupiny atroficko-degeneratívnych demencií s postupným úbytkom neurónov v hipokampe, temporoparietálnom a frontálnom kortexe [21]. Medzi klinické prejavy patrí postupná strata kognitívnych funkcií, poruchy logického uvažovania, zmeny nálady a degradácia osobnosti [21].

### 2.1 Neuropatológia Alzheimerovej choroby

Histopatologický korelát AD predstavuje nález Alzheimerovských plakov. Za fyziologických podmienok je amyloidový prekursorový proteín APP štiepený  $\alpha$ -sekretázou. Solubilné oligopeptidové fragmenty pôsobia neuroprotektívne a podieľajú sa na tvorbe nových synapsií. Za patologických okolností je APP štiepený na nerozpustné produkty, ktoré extracelulárne precipitujú a dávajú vznik patologickému amyloidu  $\beta$ . Dochádza k rozvoju zápalovej reakcie, aktivácii makrofágov s masívnou tvorbou voľných kyslíkových radikálov. Kvantitatívne najvýznamnejším zdrojom ROS v nervovom tkanive sú mitochondrie. U AD je aktivita cytochrómu oxidázy znížená o 25-30%. V niektorých prípadoch sa našiel mutovaný gén pre tento enzým a jeho znížená aktivita môže viesť k nárastu produkcie ROS [22]. Enzým NADPH-oxidáza generuje po aktivácii superoxidový radikál a peroxid vodíka. Je lokalizovaná v membráne mikroglíí atrahovaných zápalom do blízkosti plakov [23].

Ďalším zdrojom voľných radikálov v mozgu je proces glykoxidácie. Metabolizmus glukózy je nevyhnutný pre správnu funkciu nervového tkaniva a niektoré štúdie potvrdili, že u AD dochádza k produkcii glykoxidáčnych produktov [24, 25]. Produkty glykoxidácie sú zapojené do procesov, ktoré môžu aktivovať membránovú NADPH-oxidázu a zvýšiť produkciu ROS [22].

V neurónoch je neuronálnou NO-syntázou produkovaný oxid dusnatý NO. Nadmerná produkcia NO je potenciálne toxická. NO vstupuje do reakcie

so superoxidovým radikálom a tvorí peroxynitrit. Zvýšené koncentrácie 3-nitrotyrozínu sa našli v neurónoch a v mozgomiechovom moku pacientov s Alzheimerovou chorobou [26, 27].

Amyloid  $\beta$  sa hromadí v intersticiálnych priestoroch mozgu a v mozgových cievach [28]. K zvýšenej produkcii ROS môže dochádzať prostredníctvom aktivácie receptorov glykooxidačných produktov amyloidom  $\beta$ . Samotný amyloid viaže katióny tranzitných kovov a zvýšená koncentrácia  $\text{Fe}^{2+}$  prehľbuje oxidačný stres cestou Fentonovej reakcie a produkcie hydroxylového radikálu [29].

Nemenej významným prejavom intraneuronálnej degenerácie je poškodenie  $\tau$ -proteínu. Fyziologický význam proteínu  $\tau$  spočíva v stabilizácii cytoskeletálneho aparátu neurónov. Patologicky hyperfosforylovaný  $\tau$ -proteín u pacientov s AD tvorí helikálne filamenty, ktoré sú podkladom neurofibrilárnych košíčkov (tangles). Štrukturálna zmena  $\tau$ -proteínu vedie k zániku neurónov [21].

## **2.2 Lipofuscinoïdné pigmenty**

Všetky vyššie zmienené mechanizmy môžu prispievať k zvýšenej produkcii voľných radikálov v mozgu. Nervové tkanivo je z 50% zložené z látok lipidovej povahy [30]. Pre vysoký podiel nenasýtených mastných kyselín sú neuróny a glie citlivé k oxidačnému poškodeniu a liperoxidácii [31].

Aldehydické produkty lipoperoxidácie reagujú s molekulami proteínov, DNA a fosfolipidov. Reakčné produkty vykazujú podobné fluorescenčné vlastnosti ako lipofuscin a nazývajú sa preto lipofuscinoïdné pigmenty [32]. Vzhľadom k vysokej citlivosti analytickej metódy je fluorescenčná analýza lipofuscinoïdných pigmentov využívaná v stanovení miery oxidačného poškodenia v rôznych biologických systémoch. Fluorescenčná spektroskopia je schopná zachytiť konečné produkty lipoperoxidácie. Existujú špeciálne fluorescenčné techniky, ktoré sú schopné detegovať kvalitatívne i kvantitatívne zmeny v zložení LFP v súvislosti s pôsobením voľných radikálov

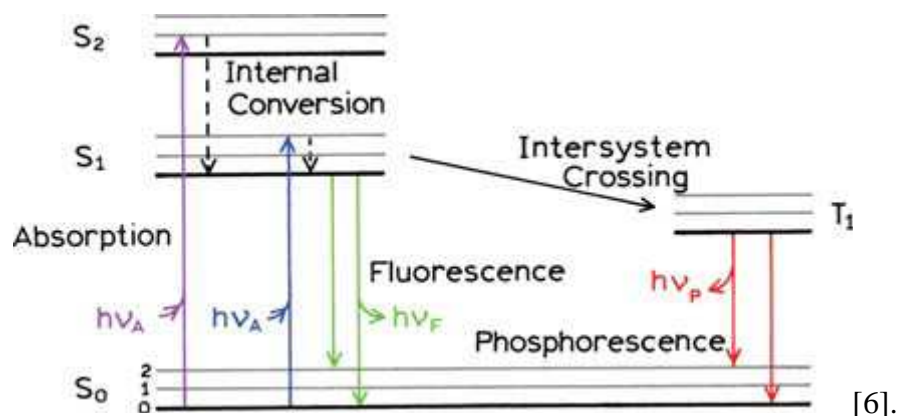
(synchronná a trojrozmerná fluorescenčná spektroskopia). Produkty lipoperoxidácie difundujú z miesta svojho vzniku a môžu napadnúť iné bunky, napríklad červené krvinky. Biologická membrána erytrocytov je bohatá na nenasýtené mastné kyseliny a stáva sa preto citlivou k poškodeniu voľnými radikálmi. Experimentálna expozícia červených krviniek vysokým koncentráciám ROS viedla k intracelulárnemu hromadeniu LFP [33]. Priamy kontakt erytrocytov s amyloidom  $\beta$  uloženým v mozgových cievach vedie k prehĺbeniu oxidačného stresu a ďalšej propagácii amyloidózy [34].

### 3. Luminiscencia a luminiscenčná spektroskopia

#### 3.1 Luminiscencia

Luminiscencia je emisia svetla látkou. Emisia nastáva pri prechode elektrónu zo stavu excitovaného do stavu základného. Luminiscenciu delíme na fluorescenciu a fosforescenciu. Absorpcia žiarenia vedie k preskoku elektrónu na vyššiu vibračnú hladinu. Excitovaná molekula zrážkami s ostatnými molekulami znižuje svoj energetický stav. Ak nastane energetický prechod na základní hladinu zo singletového stavu dôjde k emisii fotónu a žiarivému prechodu. Doba trvania excitovaného singletového stavu je asi  $10^{-8} - 10^{-5}$  s a žiarivý prechod nazývame fluorescenciou.

Obrázok č. 5: Jablonského diagram<sup>5</sup>



Uvoľnenie fotónu spojené s žiarivým prechodom z excitovaného tripletového stavu do základného stavu sa nazýva fosforescencia. Doba existencie tripletového stavu môže byť viac ako 10s. Energetické prechody medzi vibračnými hladinami a ich vzájomné vzťahy názorne ilustruje Jablonského diagram. Z diagramu tiež vyplýva, že energie emitovaného svetla je vždy nižšia

<sup>5</sup> Zdroj: LAKOWICZ, J. Principles of fluorescent spectroscopy. 3. vyd. Singapore: Springer, 2006. 954 s. ISBN 10: 0-387-31278-1

než energia žiarenia excitačného. Preto platí, že vlnová dĺžka emitovaného žiarenia je vždy vyššia než vlnová dĺžka žiarenia excitačného (Stokesov zákon) [5].

$$\lambda_{em} \geq \lambda_{ex}$$

### 3.2 *Fluorofory*

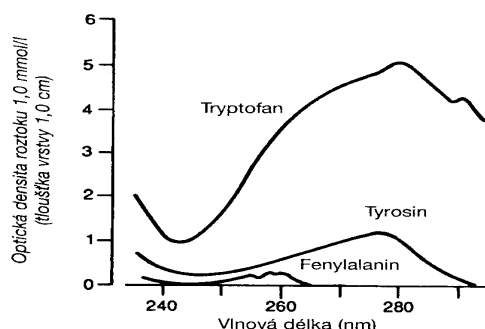
Väčšina organických zlúčenín sama o sebe nevykazuje fluorescenčné javy. Aby molekula mohla fluoreskovať, musí obsahovať funkčnú skupinu schopnú absorbovať žiarenie. Funkčná skupina zodpovedná za fluorescenciu sa nazýva fluorofor. V biologicky významných molekulách sú za vlastnú fluorescenciu zodpovedné:

1. Proteíny
2. Redukované formy kofaktorov oxidoreduktáz NADH, NADPH a oxidovaná forma FAD
3. cytochrómy, hemoglobín a peroxidáza

#### 3.2.1 **Fluorescencia proteínov**

Vo všetkých vyššie uvedených skupinách molekúl je fluorescencia daná schopnosťou absorbovať žiarenie prítomnosťou aromatického cyklu. V proteínoch patria medzi najvýznamnejšie fluorofory aromatické aminokyseliny fenylalanín, tryptofán a tyrozín. Z obrázku č. 6 je vidieť, že najširšie emisné spektrum vykazuje tryptofán. K absorpcii UV žiarenia v molekulách proteínov dochádza preto hlavne vďaka tryptofanu [4, 35].

Obrázok č. 6: Absorpčné spektrum tyrozínu, tryptofanu a fenylalanínu <sup>6</sup>



Reaktívne aldehydy vznikajúce v priebehu lipoperoxidácie môžu reagovať s aminokyselinami proteínov a meniť ich v lipofuscinoidné pigmenty. Podarilo sa dokázať, že in vitro reakciou malóndialdehydu s aminokyselinami vznikajú zlúčeniny s podobnými fluorescenčnými vlastnosťami ako LFP. Analýzou experimentálnych fluorescenčných spektier sa našli dve emisné maximá medzi 260-280nm a 350-390nm. Analýza infračervených a hmotnostných spektier zlúčenin dokázala prítomnosť aminoiminopropénovej štruktúry  $-N=CH-CH=CH-NH-$  [36].

### 3.3 *Fluorescenčná spektroskopia*

Fluorescenčná spektroskopia je inštrumentálna analytická metóda s vysokou citlivosťou. Samotné meranie prebieha v luminiscenčnom spektrofotometri.

Analytický signál (intenzita fluorescencie) je vynášaný proti vlnovej dĺžke a spojený grafický záznam sa nazýva fluorescenčné spektrum. Keď sledujeme zmenu intenzity fluorescencie v závislosti na excitačnej vlnovej dĺžke pri zachovaní konštantnej emisnej vlnovej dĺžky získame excitačné spektrum.

<sup>6</sup> Zdroj: MURRAY, K. et al. *Harperova biochemie*. 2. vyd. Jinočany: H+H, 2001. 872 s. ISBN

V praktickom experimente som sledoval závislosť intenzity fluorescencie pri konštantnej excitačnej vlnovej dĺžke a získal som spektrum emisné. Vzťah medzi excitačným a emisným ukazuje obrázok v prílohe č. 2 [6].

### **3.4 Synchronná fluorescenčná spektroskopia**

Technika synchronnej fluorescenčnej spektroskopie bola vyvinutá k zvýšeniu citlivosti analytických fluorescenčných meraní. Na rozdiel od klasickej luminiscenčnej spektroskopie v priebehu synchronnej analýzy sledujeme závislosť intenzity fluorescencie na synchronne menenej excitačnej a emisnej vlnovej dĺžke. Podmienkou synchronného merania je zachovanie konštantného rozdielu medzi oboma vlnovými dĺžkami, preto platí:

$$\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$$

Synchronne spektrá majú jednoduchšiu štruktúru, s užšími a ostrejšími píkmi. Sú preto vhodné pre analýzu komplikovaných zmesí obsahujúcich viacero zložiek. Obrázok v prílohe č. 3 ilustruje klasické fluorescenčné spektrum zmesi naftalénu, tetracénu, antracénu, fenantrénu a perylénu v porovnaní so synchronným záznamom [37, 38].

## 4. Experimentálna časť

### 4.1 Popis experimentu

Experimentálna časť sa previedla na Ústave lekárskej chémie a biochémie 2. lekárskej fakulty UK. K analýze bolo použitých 38 vzoriek, z toho 30 vzoriek pacientov s AD a 8 zdravých kontrol. V štúdiu boli spracované vzorky erytrocytov získané od pacientov Geriatrickej kliniky 1. LF UK a VFN. Fluorescenčné spektrá materiálu z červených krviniek pacientov s Alzheimerovou chorobou boli porovnávané so skupinou zdravých kontrol bez príznakov demencie v zodpovedajúcej vekovej kategórii.

Emisné spektrá analyzovaných vzoriek boli merané pri konštantnej excitačnej vlnovej dĺžke 360nm. Spektrá boli zaznamenávané v intervale vlnových dĺžok 340-500 nm.

Lipofuscinoïdné pigmenty tvoria po chemickej stránke heterogénnu, nie presne definovanú skupinu zlúčenín. Fluorescenčné spektrum je výsledkom superpozície emisných maxím celej rady fluoroforov prítomných vo vzorke. Pre identifikáciu maxím je preto nutné skúmať derivačné spektrá. Fluorescenčné spektrum zobrazuje závislosť intenzity fluorescencie na vlnovej dĺžke. Heterogenita vzorky prispieva k prekryvaniu emisných pásov. Pre druhú derivačnú krivku platí, že v miestach, v ktorých nadobúda funkcia lokálne minimum sa nachádza lokálne maximum pôvodnej, nederivovanej funkcie. Sledovaním druhej derivácie spektra je teda možné odhaliť významné maximá funkcie, ktoré by ostali pri analýze fluorescenčného spektra skryté.

Všetky vzorky boli analyzované na spektrofluorimetri s integrovaným operačným systémom pre záznam spektier a výpočet druhých derivácií.

### 4.2 Výsledky

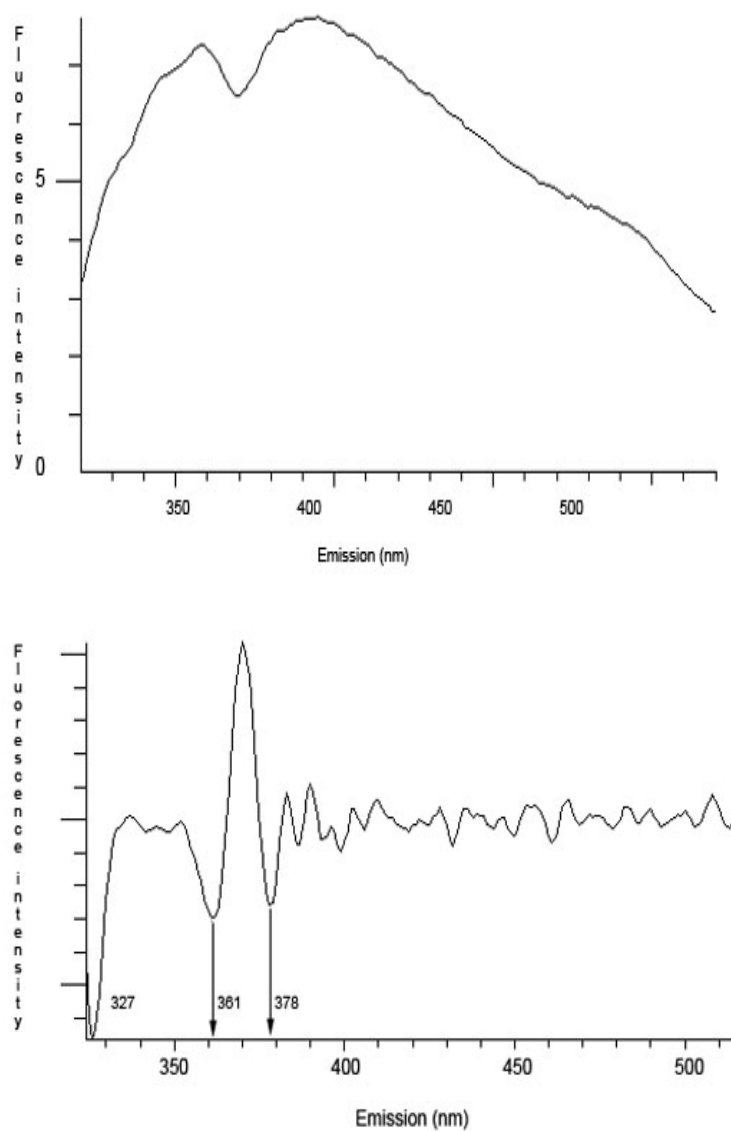
Cieľom experimentu bolo sledovať derivačné fluorescenčné spektrá a porovnať namerané záznamy pacientov s Alzheimerovou chorobou so zdravými



kontrolami. V spektrách sú pre rýchlu orientáciu šípkou označené charakteristické píky. Spektrá sú uvedené v nameranej sérii vzorky pacienta a príslušného derivačného spektra.

Fluorescenčné spektrum pacienta č. 1 vykazuje 2 emisné maximá pri vlnových dĺžkach 360 a 400 nm. Pík s maximom 360 nm vzniká superpozíciou dvoch píkov, čomu zodpovedá nález píku s maximom 345nm.

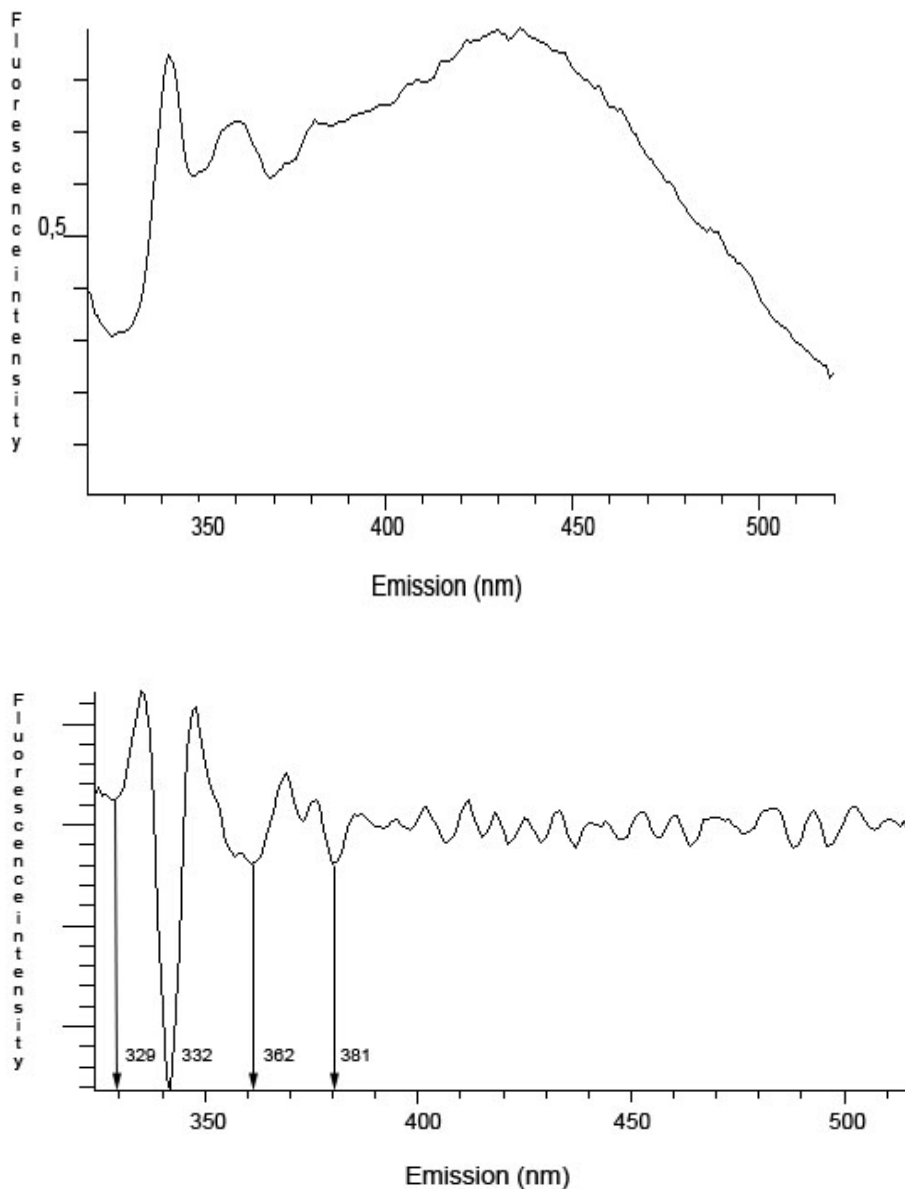
Obrázok č. 7: Fluorescenčné a derivačné spektrum pacienta č. 1



Derivačné spektrum pacienta 1 vykazuje výrazné minimá pri 327, 361 a 378nm.

Pre porovnanie uvádzam namerané fluorescenčné spektrum zdravej kontroly č. 3. V zázname pozorujeme výrazné maximá pri 340, 360 a 440nm. Derivačné spektrum vykazuje výrazné minimá pri 329, 332, 362 a 381 nm.

Obrázok č. 8: Fluorescenčné a derivačné spektrum kontroly č.3



Pre vyššiu prehľadnosť uvádzam charakteristické píky vzoriek všetkých pacientov spolu s údajmi z derivačných spektier a zdravých kontrol v tabuľke:

Tabuľka č. 4 : Namerané spektrálne maximá a minimá kontrol

<b>Kontrola č.</b>	<b>Namerané maximá (nm)</b>	<b>Namerané minimá (nm)</b>
<b>kontrola č. 1</b>	345,360,400	344,362,383,392,425
<b>kontrola č. 2</b>	348,360,380	328,343,362
<b>kontrola č. 3</b>	343,360,430	329,332,362,381
<b>kontrola č. 4</b>	343,358	343,357
<b>kontrola č. 5</b>	343,360	342,358
<b>kontrola č. 6</b>	343,360	342,362
<b>kontrola č. 7</b>	343,360	343,357,378
<b>kontrola č. 8</b>	343,360	342,352,367

Tabuľka č. 5 : Namerané spektrálne maximá a minimá vzoriek pacientov

<b>Vzorka č.</b>	<b>Namerané maximá (nm)</b>	<b>Namerané minimá (nm)</b>
<b>Pacient č. 1</b>	360, 400	327, 361, 378
<b>Pacient č. 2</b>	345, 400	343, 362
<b>Pacient č. 3</b>	345, 408	328, 340, 358, 379
<b>Pacient č. 4</b>	345, 360, 385	328, 335, 358, 377, 423
<b>Pacient č. 5</b>	345	327, 333, 342, 361, 392, 420, 428, 437
<b>Pacient č. 6</b>	340, 430	329, 342, 361, 379
<b>Pacient č. 7</b>	345, 400	327, 343, 357, 362, 379, 442
<b>Pacient č. 8</b>	345, 360, 400	327, 364, 378
<b>Pacient č. 9</b>	345, 400	345, 358, 381, 396, 426
<b>Pacient č. 10</b>	345, 360, 400	342, 359, 387
<b>Pacient č. 11</b>	345, 400	343, 362, 382, 392, 403, 413, 426
<b>Pacient č. 12</b>	345, 405	362, 378, 398
<b>Pacient č. 13</b>	345, 410	343, 361, 387, 402
<b>Pacient č. 14</b>	345, 410	345, 358, 379, 382

<b>Pacient č. 15</b>	345, 400	343, 356, 384, 413, 458
<b>Pacient č. 16</b>	345, 360, 400	342, 359, 378, 421, 451
<b>Pacient č. 17</b>	345, 358, 400	343, 359, 372, 382, 422, 460
<b>Pacient č. 18</b>	345, 360, 410	347, 359, 378, 398, 428
<b>Pacient č. 19</b>	345, 400	343, 356, 362, 379, 428
<b>Pacient č. 20</b>	345, 400	342, 358, 413, 433, 442
<b>Pacient č. 21</b>	345, 360, 400	365, 378, 396
<b>Pacient č. 22</b>	340, 400	343, 363, 385, 404, 441
<b>Pacient č. 23</b>	345, 405	333, 345, 631, 395
<b>Pacient č. 24</b>	345, 360, 405	328, 343, 362
<b>Pacient č. 25</b>	345, 400	332, 342, 358, 417
<b>Pacient č. 26</b>	345, 400	330, 342, 360, 418, 438
<b>Pacient č. 27</b>	345, 360, 395	328, 343, 381, 431
<b>Pacient č. 28</b>	360, 405	328, 343, 358, 378
<b>Pacient č. 29</b>	330, 345	328, 343, 358, 379, 460
<b>Pacient č. 30</b>	345, 360, 400	346, 363, 379, 401, 409, 460

## 5. Diskusia

V experimente som sledoval zmeny vo fluorescenčných spektrách vzoriek z erytrocytov u pacientov s Alzheimerovou chorobou. Sledoval sa charakter spektier u celkove 30 pacientov a u 8 zdravých kontrol bez príznakov demencie. Namerané emisné spektrá pri excitačnej vlnovej dĺžke 360nm boli počítačovým programom zderivované a vyhodnotené.

V prípade demencie Alzheimerovho typu sa uvažuje o významnej úlohe voľných radikálov v patogenéze ochorenia. Rada štúdií dokázala, že oxidačný stres je súčasťou fyziologických bunecných pochodov. Vzhľadom na vysokú reaktivitu radikálových častíc je nutné, aby existovali adekvátne mechanizmy schopné udržať potenciálne nebezpečné pochody spojené s deštrukciou tkanív v rovnováhe. Radikálmi poškodené bunecné komponenty majú tendenciu kumulovať sa intra i extracelulárne a tvoria podklad lipofuscinoidných pigmentov. Skupina pigmentov vykazuje značnú heterogenitu a nie je z chemického hľadiska úplne špecifikovaná.

Schopnosť produktov radikálového napadnutia difundovať z miesta svojho vzniku je teoretickým predpokladom ich stanovenia v iných tkanivách. Preto je možné očakávať, že červené krvinky pri prietoku mozgom budú vystavené produktom oxidačného stresu.

V skupine zdravých kontrol som pozoroval konštantnú prítomnosť emisných pásov v intervale vlnových dĺžok 327-343nm. Druhé maximum konštantne prítomné v oboch skupinách vzoriek v okolí 360nm zodpovedá excitačnej vlnovej dĺžke. Z tabuľky, respektíve z priložených spektier vidieť, že emisie pri vyšších vlnových dĺžkach nad 380nm sú príznačné pre vzorky pacientov s Alzheimerovou chorobou, u zdravých kontrol sa vyskytujú minimálne. Prítomnosť charakteristického píku, ktorý by sa vyskytoval len vo vzorkách pacientov s Alzheimerovou chorobou nepozorujem. Z nameraných spektier ale vyplýva, že nižšiu heterogenitu v emisných pásoch vykazujú zdravé kontroly. Dá sa preto predpokladať, že podrobnejšia analýza patologických vzoriek by mohla priniesť očakávaný výsledok a vysvetliť zmeny v štruktúre spektier. V rozsahu práce nebola prevádzaná kvalitatívna ani kvantitatívna

analýza lipofuscinoïdných pigmentov. Presnejšie údaje s kvantitatívnym vyhodnotením by bolo možné získať analýzou trojdimenzionálnych spektier.

## Záver

Pre stanovenie produktov oxidačného stresu v červených krvinkách pacientov s Alzheimerovou chorobou bolo k dispozícii 38 vzoriek. Lipofuscinoidné pigmenty v extraktoch z erytrocytov boli stanovené metódou fluorescenčnej spektroskopie. Analýza bola zameraná na výskyt zmien spektrálnych charakteristík v skupine pacientov v porovnaní so zdravými kontrolami. Namerané fluorescenčné spektrá boli počítačovým programom prevedené na spektrá derivačné a následne vyhodnocované. U zdravých kontrol sa našiel relatívne konštantný výskyt emisných pásov v intervale vlnových dĺžok 327-343nm. Vo vzorkách pacientov bola pozorovaná značná heterogenita v oblasti nad 380nm. Charakteristický pík prítomný len v patologických vzorkách sa nenašiel.

Alzheimerova choroba predstavuje významný sociálny a ekonomický problém súčasnosti. Momentálne neexistuje metóda, ktorá by ochorenie bezpečne dokázala. Dôvodom je rada nejasností a neznalosť presných etiopatogenetických mechanizmov vedúcich k rozvoju choroby. Pochopenie významu a podielu oxidačného stresu v molekulárnej patológii Alzheimerovej demencie má nezastupiteľné postavenie a je motiváciou pre ďalšie skúmanie problematiky.

Nález potenciálnych markerov poškodeného metabolizmu mozgu by sa mohol stať nástrojom primárnej prevencie ochorenia a kľúčom k pochopeniu vyvolávajúcich príčin. Nemenej významný by bol prínos v kauzálnej terapii tejto momentálne nevyliciteľnej choroby zaťaženej vysokou mortalitou.

## Súhrn

Voľné radikály sú vysoko reaktívne častice s nespárovaným elektrónom v orbitale. Pre mechanizmus radikálových reakcií je charakteristická nekoordinovanosť a schopnosť reagovať s celou radou organických molekúl. Medzi biologicky významné molekuly radikálovej povahy patria reaktívne zlúčeniny kyslíka a dusíka. Kvantitatívne najvýznamnejším zdrojom reaktívnych foriem kyslíka sú mitochondrie. Vznik radikálov v živej bunke je súčasťou fyziologických procesov. Majú nezastupiteľnú úlohu v mechanizmoch nešpecifickej imunity, v signálnych dráhach a v biosyntetických pochodoch. Pre zachovanie homeostázy je dôležité, aby koncentrácia voľných radikálov bola udržiavaná na hladine pre bunky netoxickej. Jemnú rovnováhu udržiava antioxidantný systém. Medzi antioxidanty patria látky enzýmovej a neenzýmovej povahy (glutathion, bilirubin, kyselina močová, tokoferol, karotenoidy, kataláza..). Reaktívne častice majú schopnosť napadnúť celú radu biomolekúl (proteíny, lipidy, nukleové kyseliny..). Produkty radikálového poškodenia sa hromadia v bunkách intra i extracelulárne a vedú k tvorbe pigmentov podobných lipofuscínu. Lipofuscinoïdné pigmenty obsahujú fluorofory a sú preto vhodné pre fluorescenčnú analýzu.

Alzheimerova choroba predstavuje v súčasnosti významný ekonomický a sociálny problém. Príčina Alzheimerovej demencie nie je známa. Histologickým korelátom Alzheimerovej choroby je nález senilných plakov zložených z amyloidu  $\beta$ . Prítomnosť cudzorodého materiálu aktivuje makrofágy a stimuluje rozvoj zápalovej reakcie. ROS a RNS prenikajú hematoencefalickou bariérou do lumen mozgových kapilár a dostávajú sa do styku s erytrocytmi. Radikálové napadnutie krviniek vedie k intracelulárnemu zvýšeniu koncentrácie produktov oxidačného stresu v cytosole.

Pre analýzu fluorescenčných produktov bol použitý extrakt z červených krviniek pripravený od 30 pacientov a 8 zdravých kontrol. Vyhodnotenie emisných spektier zdravých kontrol ukázalo prítomnosť emisných maxím v oblasti 327-343nm. Patologické vzorky v oblasti nad 380nm vykazovali značnú spektrálnu heterogenitu v porovnaní so zdravými kontrolami.



Štúdium oxidačného poškodenia buniek sa preto zdá byť dôležité pre pochopenie patologických procesov, ktoré vedú k rozvoju a progresii ochorenia. Nález charakteristických markerov radikálového poškodenia neurónov v súvislosti s Alzheimerovou chorobou by mohol byť sľubným prínosom v diagnostike, prevencii a terapii tejto momentálne nevyliciteľnej a smrteľnej choroby.

## Summary

Free radicals are highly reactive species with one unpaired electron in orbital. The characteristics of the radical reaction mechanism is the randomness and the high ability to attack or react with a whole range of another molecules. Reactive oxygen and nitrogen species count among important biologic molecules of radical nature. The most important generator of the free radicals in cells are mitochondrions.

The inception of free radicals in a cell is part of physiological processes. They participate on non-specific immunity reactions, signal and metabolic pathways and biosynthetic processes. For preserving homeostatis is crucial to keep up the concentration of free radicals on the level for antitoxic cells. It is very important to fix a concentration of free radicals in cell on non-toxic limits. The balance is stabilised by antioxidative system. Antioxidants have enzymatic or non-enzymatic character (glutathione, bilirubine, uric acid, tocoferol, carotenoides, catalase..). Reactive species have a high ability to attack biomolecules like proteins, lipids and nucleic acids. Products of radical damage are cumulated extra or intracellularly and they are main components of lipofuscin-like pigments. Lipofuscin-like pigments contains in their molecular structure fluorofores, so they are good substrates for fluorescent analysis.

Alzheimer's disease is a very actual social and economical problem. Etiology of Alzheimer's disease is still unknown. Histologically, the characteristic presence of Alzheimer's disease is a senil plaques of amyloide  $\beta$ . Amyloide substance is attractor for macrophages and stimulate inflammation. ROS and RNS diffuse through hematoencephalic barrier in vessel's lumen and attacks red blood cells. Radical damage of erythrocytes is associated with an increase of concentration of oxidative stress products in cytosol.

Sample for fluorescent analysis has been prepared from a red-blood cell extract from 30 patients and 8 healthy controls. Fluorescent spectra of healthy controls have emission maxima in area 327-343nm. In compare with controls, spectra of patients were more heterogenous in area upon 380nm.

The study of oxidative cell damage is important for understanding of pathological processes that that lead to a further progress of the Alzheimer's disease. Medical finding of characteristic markers of radical neurons damage in connection with Alzheimer's disease could be an up-and-coming asset in diagnostic, prophylaxis and therapy of this currently incurable and terminal disease.

## Zoznam použitej literatúry

1. DEVÍNSKY, F. *Organická chémia pre farmaceutov*. 1.vyd. Martin: Osveta, 2001. 750 s. ISBN 80-8063-056-9.
2. KALOUSOVÁ, M.et al. *Patobiochemie ve schématech*. 1.vyd. Praha: Grada, 2006. 264 s. ISBN 80-247-1522-8.
3. ZIMA, Tomáš: *Laboratorní diagnostika*. 1. vyd. Praha: Galén, 2002. 728 s. ISBN 80-7262-201-3
4. MURRAY, K. et al. *Harperova biochemie*. 2. vyd. Jinočany: H+H, 2001. 872s. ISBN 80-7319-003-6.
5. KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
6. LAKOWICZ, J. *Principles of fluorescent spectroscopy*. 3. vyd. Singapore: Springer, 2006. 954 s. ISBN 10: 0-387-31278-1.
7. ŠTÍPEK, S. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. 1. vyd. Praha: Grada, 2000. 314 s. ISBN 80-7169-704-4.
8. VOET, J., VOET, J. *Biochemie*. 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995. 1362 s.
9. KONTUSH, A. et al. Antioxidant and prooxidant activity of  $\alpha$ -tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. *Journal of lipid research*, 1996, vol. 37, p. 1436 - 1448.
10. BERMAN, K., BRODATY, H. Tocopherol (vitamin E) in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *CNS Drugs*, 2004, vol. 18. no. 12, p.807-25.

11. MARKESBERT, W., LOVELL, A. DNA oxidation in Alzheimers disease. *Antioxid and redox journal*, 2006, vol. 8, p. 2039-45.
12. GABITTA, SP. Et al. Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, 1998 Nov;71(5):2034-40.
13. BUTTERFIELD, A., LAUDERBACK, CH. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimers disease brain : Potential causes and consequences involving amyloid b-peptide-associated free radical oxidative stress. *Free radical biology and medicine*, 2002, vol. 32, no.11, p. 1050-1060.
14. BUTTERFIELD, A. et al. Elevated protein-bound levels of the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal, in brain from persons with mild cognitive impairment. *Neuroscience letters*, 2006, vol. 397, no. 3,, p. 170-3.
15. MEŠKO, D. et al. *Vademékum klinickej biochémie*. 1. vyd. Martin: Osveta, 1998. 1647s. ISBN 80-8063-005-4.
16. BONDY, C. et al. Promotion of transition metal-induced reactive oxygen species formation by b-amyloid. *Brain research*, 1998, vol. 799, no. 1, p. 91-6.
17. YUMOTO, S. et al. Demonstration of aluminum in amyloid fibers in the cores of senile plaques in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Journal of inorganic biochemistry*, 2009, vol. 103, no. 11, p. 1579-84.
18. BHARATHI, V. et al. Molecular toxicity of aluminium in relation to neurodegeneration. *Indian J. Med. Res.*, 2008, vol. 128, no. 4, p. 545-56.

19. HUREAU, CH., FALLER, P. A $\beta$ -mediated ROS production by Cu ions: Structural insights, mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. *Biochimie*, 2009, vol. 91, no. 10, p. 1212-17.
20. WHO: MKN-10. *Duševní poruchy a poruchy chování*. 2.vyd. Praha: PCP, 2000. 305 s. ISBN 80-85121-44-1.
21. RABOCH, J., ZVOLSKÝ, P. *Psychiatrie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2001. 622 s. ISBN 80-7262-140-8.
22. DAVIS, R.E., MILLER, S., HERRNSTADT, C. Mutations in mitochondrial cytochrome c oxidase genes segregate with late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997. vol. 94, no. 9, p. 4526-31.94, 4526-4531.
23. CARPENTER, A.F., CARPENTER, P.W., MARKESBERY, W.R. Morphometric analysis of microglia in Alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1992, vol.52, no. 6, p. 601-8.
24. HOYER, S. Brain glucose and energy metabolism abnormalities in sporadic Alzheimer disease. Causes and consequences: an update. *Exp. Gerontol.*, 2000, vol. 35, no.9, p. 1363-72.
25. DURANY, N. et al.. Investigation on oxidative stress and therapeutical implications in dementia. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, 1999, vol. 249, no.III/68-III/73, p. 68-73.
26. SMITH, M.A. et al. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.*, 1997, vol. 17, no. 8, p. 2653-7.
27. TOGHI, H. et al. Alterations of 3-nitrotyrosine concentration in the cerebrospinal fluid during aging and in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci. Letters*, 1999, vol. 269, no. 14, p. 52-4.

28. HAGLUND, M. et al. Differential deposition of amyloid beta peptides in cerebral amyloid angiopathy associated with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Acta neurologica*, vol. 111, no.5, p.430-35.
29. CORNETT, C.R., MARKESBERY, W.R., EHMANN W.D. Imbalances of trace elements related to oxidative damage in Alzheimer`s disease brain. *Neurotoxicity* 1998, vol. 19, no. 3, p. 339-345.
30. LEDVINA, M., STOKLASOVÁ, A., CERMAN, J. *Biochemie pro studující medicíny II. díl*. 1.vyd. Praha: Nakl. Karolinum, 2005. 562 s. ISBN 80-246-0851-0.
31. HALLIWEL, B., GUTTERIDGE J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.*, 1984, vol. 219, no. 1, p. 1-14.
32. CHIO, K.S., TAPPEL, A.L. Synthesis and characterization of the fluorescent products derived from malonaldehyde and amino acids. *Biochemistry*, 1968, vol. 8, no. 7, p. 2821-26.
33. WILHELM, J., HERGET, J. Hypoxia induces free radical damage to rat erythrocytes and spleen: analysis of the flurorescent end-products of lipid peroxidation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1999, vol. 31, no. 6, p. 671-81. .
34. JAYAKUMAR, R. et al. Red cell perturbations by amyloid beta-protein. *Biochim. Biophys. Acta*, 2003, vol. 1622, no. 1, p. 20-28.
35. FIŠAR, Z. *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách* [online]. 2003. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfisar/fluorescence/Default.htm> .
36. TROMBLY, R. et al. Fluorescent products and polyunsaturated fatty acids of human testes. *Lipids* , 1975, vol. 10, no. 10, p. 591-96.

37. VO-DINH, T. Multicomponent analysis by synchronous luminiscence spectrometry. *Analytical chemistry*, 1978, vol. 50, no. 3, p. 396-401.
  
38. RUBIO, S., GOMEZ-HENS, A., VALCAREL, M. Analytical applications of synchronous fluorescence spectroscopy. *Talanta*, 1986, vol. 33, no.8, p. 633-40.



## **Zoznam obrázkov a tabuliek**

**Obrázok č. 1: Usporiadanie elektrónov v orbitaloch kyslíka**

**Obrázok č. 2: Redoxná rovnováha glutationu<sup>7</sup>**

**Obrázok č. 3: Redoxná rovnováha kyseliny askorbovej<sup>8</sup>**

**Obrázok č. 4: Redoxná rovnováha tokoferolu<sup>9</sup>**

**Obrázok č. 5: Jablonskéhoho diagram**

**Obrázok č. 6: Absorpčné spektrum tyrozínu, tryptofanu a fenylalanínu**

**Obrázok č. 7: Fluorescenčné a derivačné spektrum pacienta č. 1**

**Obrázok č. 8: Fluorescenčné a derivačné spektrum kontroly č. 3**

**Tabuľka č. 1: Reaktívne zlúčeniny kyslíka**

**Tabuľka č. 2: Reaktívne zlúčeniny dusíka**

**Tabuľka č. 3: Antioxidačné systémy v bunke**

**Tabuľka č. 4: Namerané spektrálne maximá a minimá vzoriek kontrol**

**Tabuľka č. 5: Namerané spektrálne maximá a minimá vzoriek pacientov**

---

<sup>7, 8, 9</sup> Obrázky č. 2, č. 3 a č. 4 boli vytvorené pomocou programu ACD/CHemSketch

## **ZOZNAM PRÍLOH**

**Príloha č. 1: Spojenie oxidačnej a antioxidačnej rovnováhy v bunke**

**Príloha č. 2: Vzťah medzi absorpčným a emisným spektrom**

**Príloha č. 3: Synchronne absorpčné spektrum aromatických uhl'ovodíkov**

**Príloha č. 4: Fluorescenčné spektrá vzoriek kontrol**

**Príloha č. 5: Fluorescenčné spektrá vzoriek pacientov**