

**1. SUMMARY IN CZECH
(ABSTRACT)**

Reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS) a volné radikály se staly v posledním desetiletí významným předmětem studia v mnoha oborech včetně medicínských. Stav, při němž je rovnováha mezi vznikem a odbouráváním volných radikálů v organismu posunuta ve prospěch jejich vzniku, se nazývá oxidační stres. Při nadbytku volných radikálů v organismu dochází k poškození biomolekul a tkání, což může vést až ke vzniku onemocnění. Oxidační stres se podílí na vzniku celé řady onemocnění, např. diabetu mellitu, aterosklerózy, revmatoidní artritidy, Alzheimerovy choroby a dalších, ale také na fyziologickém procesu stárnutí. Ve snaze pozastavit průběh stárnutí a odvrátit vznik onemocnění se začala používat různá potravní aditiva s obsahem vitamínů a antioxidantů přírodního původu.

Diabetes mellitus je onemocnění charakterizované hyperglykemií a je vždy provázeno oxidačním stresem. Glukóza a různé intracelulární cukry (fruktóza, ribóza, glyceraldehyd a další) se kovalentně váží na volné aminoskupiny proteinů a způsobují poškození jejich struktury. Tento proces se nazývá neenzymová glykace. Sledem následných reakcí vznikají pozdní produkty pokročilé glykace (AGEs), které se podílí na tvorbě kovalentních vazeb mezi sousedními molekulami proteinů (crosslinks). Mezi nejvýznamnější AGEs patří N-ε-karboxymetyllysin, pyrrolin, pentosidin a argpyrimidin. Během autooxidace glykujícího cukru a AGEs se tvoří volné radikály a různé reaktivní meziprodukty (např. α-dikarboxylové sloučeniny). Ty se dále podílejí na rozvoji neenzymové glykace. Protože je tato doprovázena oxidačními procesy, které jsou často katalyzované ionty přechodných kovů, lze celý proces označit jako glykoxidaci.

Jedním z cílů této práce, která navazuje na několik předešlých diplomových prací, bylo zavést a optimalizovat *in vitro* model glykace aspartátaminotransferasy (AST). Optimalizace začala zvolením vhodného, komerčně dostupného preparátu AST a pokračovala výběrem dostatečně účinného glykačního činidla ve vhodné koncentraci. Pro sledování průběhu glykace bylo vhodné rozšířit spektrum používaných metod o metody ke stanovení množství vznikajících produktů, např. fluorescenční. V zavedeném modelu glykace se sledovala jednak přímá interakce jednotlivých antioxidantů s molekulou proteinu a také vliv antioxidantů na glykaci proteinu.

Za použití spektroskopických a fluorimetrických metod byl jako nejvhodnější zdroj AST pro další experimenty zvolen preparát firmy Serva, který vykazoval všechny v literatuře popsané spektrální charakteristiky AST a měl také nejmenší počáteční koncentraci fluorescenčních AGEs. Ve prvním modelu glykace byla jako glykační agens použita 50 milimolární D-fruktóza, která patří mezi významné intracelulární cukry se značnou

reaktivitou. Ve snaze podpořit oxidační procesy byly do tohoto modelu přidány ještě ionty mědi a železa, které katalyzují radikálové reakce. Vhodnou koncentrací těchto iontů se zdá být 1 μM koncentrace. Kvůli dlouhému trvání jednoho experimentu (až 21 dnů) jsme postupně tento model opustili a v současné době provádíme optimalizaci modelu, kde je jako glykačního agens použito metylglyoxalu, což je vysoce reaktivní dikarboonylová sloučenina, která vzniká jako meziprodukt neenzymové glykace.

Pro stanovení množství vznikajících AGE produktů byla zavedena fluorescenční metoda k měření množství jak celkových fluorescenčních AGEs tak pouze pentosidinu. Měření probíhá při specifických vlnových délkách excitace a emise, které odpovídají celkovým AGEs ($\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ 370/440 nm) a pentosidinu ($\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ 335/385 nm). Metody pro stanovení parametrů oxidačního stresu u pacientů s revmatoidní artritidou by se daly s výhodou použít i ke sledování průběhu glykace v našem modelu.

Antioxidanty přírodního původu, které byly testovány v rámci této doktorské práce, vykazovaly jak pozitivní antiglykační účinky, tak negativní přímé účinky na aktivitu AST a to v různém rozsahu. Mezi látky, které měly jednak nejlepší antiglykační vlastnosti a také nejméně ovlivňovaly aktivitu samotného modelového proteinu, patřily kyseliny hydroxycitronová, *o*-kumarová a močová. Naopak látkami s celkovým negativním projevem byly flavonoid bajkalin a jeho aglykon bajkalein a metylarbutin. Tyto látky inhibovaly aktivitu AST a nikterak nezabránily její glykaci. Dalo by se říci, že antioxidanty rostlinného původu s výraznými zhášecími schopnostmi bývají také nejreaktivnějšími látkami, co se interakce s molekulou proteinu týče.