

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

PLZEŇ 2017

Robin Klieber

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Robin Klieber

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**ANTIOXIDANTY A JEJICH VLIV
NA ORGANISMUS**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Václav Babuška, Ph.D.

PLZEŇ 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Antioxidanty a jejich vliv na organismus“ vypracoval pod vedením vedoucího bakalářské práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury.

V Plzni dne 24. 3. 2017

.....

vlastnoruční podpis

Poděkování

Rád bych touto cestou vyjádřil poděkování vedoucímu své bakalářské práce panu Ing. Václavu Babuškovi, Ph.D., za jeho cenné a odborné rady při vedení práce a paní laborantce Ivetě Jurek za pomoc při praktickém stanovení.

ANOTACE

Příjmení a jméno: Klieber Robin

Katedra: Teoretických oborů

Název práce: Antioxidanty a jejich vliv na organismus

Vedoucí práce: Ing. Václav Babuška, Ph.D.

Počet stran – číslované: 35

Počet stran – nečíslované: 16

Počet obrázků a příloh: 15

Počet titulů použité literatury: 23

Počet elektronických zdrojů: 9

Klíčová slova: antioxidanty, volné radikály, ROS, RNS, oxidační stres, celková antioxidační kapacita, FRAP, TEAC

Souhrn:

Tématem bakalářské práce jsou antioxidanty a jejich vliv na organismus. Práce se skládá z teoretické a praktické části. Teoretická část pojednává o vzniku, rozdělení a působení volných radikálů a antioxidantů na lidský organismus. Samostatnou kapitolu tvoří oxidační stres jako příčina mnohých onemocnění spojených především s vysokým věkem. Praktická část se skládá ze stanovení celkové antioxidační kapacity u devíti vybraných vzorků analytickými metodami TEAC a FRAP.

ANNOTATION

Surname and name: Klieber Robin

Department: of Theoretical disciplines

Title of thesis: Antioxidants and their influence on the organism

Consultant: Ing. Václav Babuška, Ph.D.

Number of pages – numbered: 35

Number of pages – unnumbered: 16

Number of pictures and appendices: 15

Number of literature items used: 23

Number of electronic resources: 9

Keywords: antioxidants, free radicals, ROS, RNS, oxidative stress, total antioxidant capacity, FRAP, TEAC

Summary:

The theme of this thesis are antioxidants and their influence on the organism. The thesis consists of theoretical and practical part. The theoretical part discusses the creation, distribution and effects of free radicals and antioxidants on the human body. A separate chapter is formed by oxidative stress as a cause of many diseases associated primarily with higher age. The practical part consists of determining the total antioxidant capacity of the nine selected samples by analytical methods TEAC and FRAP.

OBSAH

ÚVOD	10
TEORETICKÁ ČÁST	11
1 VOLNÉ RADIKÁLY	11
1.1 Vznik volného radikálu	12
1.2 Funkce volných radikálů v organismu	12
1.3 Reaktivní formy kyslíku	13
1.3.1 Superoxid	13
1.3.2 Peroxid vodíku	14
1.3.3 Hydroxylový radikál	14
1.4 Reaktivní formy dusíku	15
1.4.1 Oxid dusnatý	15
1.4.2 Peroxynitrit	16
2 OXIDAČNÍ STRES	17
2.1 Teorie volného radikálu	17
2.2 Následky oxidačního stresu	17
2.3 Oxidační poškození biologických struktur	18
2.3.1 Peroxidace lipidů	18
2.3.2 Poškození nukleových kyselin	19
2.3.3 Poškození proteinů	19
3 ANTIOXIDANTY	20
3.1 Endogenní antioxidanty	20
3.1.1 Superoxiddismutáza	20
3.1.2 Kataláza	21
3.1.3 Glutathion	21
3.1.3.1 Selen a Zinek	22
3.1.5 Kyselina močová	22
3.1.6 Bilirubin	23
3.1.7 Koenzym Q	23
3.1.8 Melatonin	24
3.1.9 Kyselina lipoová	25
3.2 Exogenní antioxidanty	25
3.2.1 Vitaminy	25

3.2.1.1 Vitamin C	26
3.2.1.2 Vitamin E	26
3.2.1.3 Vitamin A	27
3.2.2 Polyfenoly	27
3.2.3 Flavonoidy	28
PRAKTICKÁ ČÁST	29
4 CÍL PRÁCE	29
4.1 Metodika	29
4.2 Praktické otázky	30
5 ANALYTICKÉ VLASTNOSTI LABORATORNÍ METODY	31
5.1 Přesnost	31
5.2 Pravdivost	31
5.3 Citlivost	32
5.4 Specifičnost	32
6 METODY STANOVENÍ	33
6.1 TEAC	33
6.1.1 Postup provedení	33
6.2 FRAP	35
6.2.1 Postup provedení	35
6.3 Příprava vzorků	36
7 ANALÝZA VZORKŮ	38
7.1 Interpretace dat	40
ZÁVĚR	43
LITERATURA A PRAMENY	
SEZNAM UŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	
SEZNAM PŘÍLOH	

ÚVOD

Antioxidanty a volné radikály (VR) jsou součástí křehké bariéry často přirovnávané acidobazické rovnováze. Antioxidační systém lidského těla je uzpůsoben k eliminaci volných radikálů, které se tvoří během mnoha fyziologických procesů.

Avšak nastávají i takové stavy, kdy jejich koncentrace převáží množství přirozených antioxidantů obsažených jak v cirkulující krvi, tak ve vlastní buněčné výbavě. Za takovýchto okolností nastává oxidační stres, který je spolučinitelem především civilizačních chorob, jako jsou choroby kardiovaskulárního systému, diabetes mellitus nebo nádorová onemocnění. Chronická onemocnění plic a dýchacích cest, neurodegenerativní stavy či dokonce procesy známé jako stárnutí jsou také přisuzovány volným radikálům. Zánětlivé procesy, traumata nebo vliv okolního životního prostředí jsou také významnými zdroji VR. Každým nádechem se do těla dostává určité množství reaktivních forem kyslíku a dusíku, se kterými se antioxidanty musejí potýkat.

Aby nedocházelo k oxidačnímu stresu, k poškozování biomolekul a samotných buněk, je nezbytné přijímat esenciální antioxidanty obsažené především ve stravě. Pestrá strava bohatá především na ovoce a zeleninu je dobrým příkladem takzvaných exogenních antioxidačních látek, jejichž charakteristickou vlastností je zneškodňování vlivu VR.

Následující práce na téma „Antioxidanty a jejich vliv na organismus“ je mimo jiné zaměřena na samotný vznik, rozdělení a působení VR. Poznání a pochopení jejich účinků je stejně důležité, jako znalosti o antioxidantech samých. Praktická část se zabývá vlastním stanovením a interpretací celkové antioxidační kapacity vybraných látek pomocí dvou laboratorních metod.

TEORETICKÁ ČÁST

1 VOLNÉ RADIKÁLY

Jako pojem volného radikálu (VR) chápeme sloučeninu, (atom, molekulu nebo iont) která obsahuje jeden či více nepárových elektronů v důsledku přijmutí, nebo odevzdání jednoho elektronu. Konfigurace takové látky je charakteristická vysokou nestabilitou a reaktivitou. Aby byla konfigurace stabilní, snaží se tento VR doplnit chybějící elektron z okolních molekul, čímž je poškozuje a vyvolává tak řetězovou reakci ve tvorbě nových volných radikálů. Zanikají při styku s jinými reaktivními molekulami za vytvoření elektronového páru nebo s látkami označovanými jako antioxidanty, jejichž radikály jsou stabilní a mohou delší dobu přetrvávat. Ztráta elektronu je po chemické stránce označována jako oxidace. Mají tedy oxidační účinek. (RACEK, 2003)

Látky, které neobsahují nepárový elektron, ale mají podobné vlastnosti jako kyslíkové volné radikály, se označují společnou zkratkou ROS (reactive oxygen species). U dusíkatých látek je tomu obdobně a označují se jako RNS (reactive nitrogen species). Volných radikálů je mnoho a neexistuje jediný antioxidant, který by organismus uchránil před všemi. (HOLEČEK, 2009, online)

Tabulka č. 1 Reaktivní formy kyslíku a dusíku

REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU	
Volné radikály	Látky, které nejsou volnými radikály
Superoxid, $O_2^{\cdot-}$	Peroxid vodíku, H_2O_2
Hydroxylový radikál, $\cdot OH$	Singletový kyslík, 1O_2
Peroxy, $ROO\cdot$	Kyselina chlorná, $HOCl$
REAKTIVNÍ FORMY DUSÍKU	
Volné radikály	Látky, které nejsou volnými radikály
Oxid dusnatý, $NO\cdot$	Kyselina dusitá, HNO_2
Oxid dusičitý, $NO_2\cdot$	Nitrosyl, NO^+

(Štípek a kol., 2000)

1.1 Vznik volného radikálu

Z důvodu, že se VR vyskytují v lidském organismu jak z vnějšího prostředí, tak z vlastního metabolismu, můžeme jejich původ vzniku rozdělit na exogenní a endogenní volné radikály.

Exogenní příčiny:

- znečištěný vzduch
- kouření
- UV/ionizující záření
- intoxikace alkoholem
- špatná strava
- nadměra stresu

Endogenní příčiny:

- kyslíkový metabolismus
- záněty
- popáleniny
- rozpad fagocytů
- zvýšený metabolismus estrogenů a další (HOFERKOVÁ, 2015, online).

1.2 Funkce volných radikálů v organismu

Výskyt VR je pro lidský organismus nezbytný. Vznikají často záměrně a zúčastňují se mnoha biologických procesů. Například posledním enzymem dýchacího řetězce je cytochromoxidáza. Ta přijímá elektrony získané ze živin a předává je molekulárnímu kyslíku, který jej redukuje na molekuly vody. Tato přeměna kyslíku na vodu je doprovázena tvorbou energie ve formě adenosintrifosfátu a toxických produktů kyslíku, jako je peroxid vodíku a superoxid, které setrvávají ve vazbě na enzym, aby bylo zabráněno jejich oxidačnímu působení. Mimo něj by se okamžitě tvořily reaktivní metabolity, které by začaly poškozovat biomolekuly.

Rovněž řada hydroxylací probíhající v organismu využívá aktivace kyslíku ke tvorbě radikálů, například k syntéze cholesterolu a jeho přeměně na žlučové kyseliny, nebo hydroxylaci řady léků a endogenních látek, jako jsou steroidní hormony, aminy nebo aromatické uhlovodíky. Podobně jako u cytochromoxidázy, reaktivní forma kyslíku zůstává vázána na enzymy endoplazmatického retikula jater nebo v mitochondriích nadledvin. Neméně významným zdrojem především reaktivních forem kyslíku je proces nazývaný jako oxidační vzplanutí, které probíhá ve fagocytujících buňkách jako efektivní zbraň při ničení bakterií a cizích struktur. Při tomto procesu se ve fagocytech zvyšuje spotřeba kyslíku ke tvorbě superoxidu a hydroxylového radikálu, který nespecificky ničí pohlcené mikroorganismy. (ŠTÍPEK a kol., 2000)

1.3 Reaktivní formy kyslíku

Volné radikály jsou ve velkém množství nebezpečné pro žijící organismy a mohou poškodit všechny hlavní buněčné komponenty. V mírných hladinách však hrají důležitou regulační roli v udržení rovnováhy mezi oxidanty a antioxidanty. Reaktivní formy kyslíku (ROS) se také podílejí na signalizačních procesech v mnoha fyziologických funkcích, jako je řízení svalového tonu, sledování tlaku kyslíku při kontrole dýchání, napomáhají syntéze hormonů štítné žlázy, podílejí se na procesu oplodnění vajíčka spermií a podobně. (MANDELKER, 2009)

Hlavní sloučeninou u ROS, která zakládá vzniku VR a sloučenin jimi podobných je molekulární kyslík z kyslíkového metabolismu a dýchacího řetězce. Za normálních okolností jsou reaktivní meziprodukty dýchacího řetězce udržovány v aktivním centru enzymu cytochromoxidázy. (HAVELKOVÁ, 2006)

1.3.1 Superoxid

Nejčastější VR vznikající v organismu je superoxidový radikál ($O_2^{\cdot-}$). Vytváří se přidáním jednoho elektronu k molekule kyslíku a vzniká například při aktivaci granulocytárních leukocytů, biosyntéze kyseliny močové, metabolismu hormonů dřeně nadledvin, syntéze prostaglandinů a estrogenů. Stává se ještě reaktivnějším, pokud přijde do styku s jinými volnými radikály jako je oxid dusnatý, nebo s některými kovy

jako je železo nebo měď. Podléhá dismutaci za přítomnosti enzymu superoxiddismutázy. Za určitých podmínek může ze superoxidového radikálu vznikat radikál hydroxylový, který je považován za nejreaktivnější a tím pádem i nejnebezpečnější. (RACEK, EISELT, OPATRNÝ, 2002)

1.3.2 Peroxid vodíku

Superoxid spontánně, nebo za působení antioxidačního enzymu superoxiddismutázy přechází na peroxid vodíku H_2O_2 . Ten je sám o sobě stabilní, ale vyznačuje se vysokou reaktivitou s takzvanými tranzitními – přechodnými kovy, jako jsou typicky v těle atomy železa nebo mědi. (PLÁTENÍK, 2009)

Přechodné prvky se v lidském organismu vyskytují pouze jako ionty nebo ve vazbách na chelátech. Tyto prvky mají určité společné rysy: jsou neúplně obsazené elektrony v předposlední elektronové sféře, vyskytují se ve více mocenstvích a především mají charakter VR a významně se podílejí na jejich reakcích i vzniku. Mezi přechodné kovy patří mnoho esenciálních biogenních prvků. Především železo, měď, kobalt, chrom či mangan. Nejvíce zastoupeným přechodným prvkem je železo. V organismu se ho nachází přibližně 4 gramy a to v několika podobách. Nejčastěji je známé jako centrální atom hemu v hemoglobinu, myoglobinu a cytochromech, kde se vyskytuje ve svém dvoumocném stavu jako železnatý iont. Mimo jiné je také vázáno i na transportní a zásobní formu železa jako transferin nebo feritin. Zásoby mědi jsou oproti železu přibližně padesát krát menší, přestože v plasmě jsou jejich koncentrace srovnatelné. (RACEK, EISELT, OPATRNÝ, 2002)

Peroxid vodíku je sice substrátem pro mnohem reaktivnější VR, ale také je fyziologicky nezbytný například pro oxidaci jodidů k syntéze hormonů štítné žlázy a se superoxidovým radikálem hraje významnou roli při oplodnění vajíčka spermii. (RACEK, 2003)

1.3.3 Hydroxylový radikál

Reakcí peroxidu vodíku s nejčastěji dvojmocnými atomy železa nebo jednomocnými atomy mědi vzniká nejreaktivnější kyslíkový radikál, hydroxylový ($\cdot OH$). Reakce s přechodným kovem se označuje jako Fentonova reakce, při které se peroxid vodíku redukuje na hydroxidový aniont a hydroxylový radikál.



Obr. č. 1 Fentonova reakce (ŠTÍPEK a kol., 2000)

Kov se naopak oxiduje na mocenství vyšší: trojmocné nebo dvojmocné. Vzniklý hydroxidový iont není zdaleka tak nebezpečný a je rychle eliminován působením pufrů. Mimo jiné mechanismus oxidačního poškození molekul hydroxylovým radikálem vzniklým touto reakcí je totožný, jako při jeho vzniku ionizujícím zářením přímým rozkladem vody. (PLÁTENÍK, 2009)

1.4 Reaktivní formy dusíku

V lidském organismu se vyskytují i radikály, jejichž volný elektron nepatří jenom kyslíku, ale i jinému atomu, nejčastěji dusíku. Nejvýznamnějším představitelem je oxid dusnatý, který může poskytovat celou řadu sloučenin vlastnostmi podobnými volným radikálům, které nepárový elektron obsahovat nemusí. Tyto látky jsou souhrnně označovány, jako reaktivní formy dusíku (RNS). (RACEK, 2003)

1.4.1 Oxid dusnatý

Chemické vlastnosti oxidu dusnatého NO^\bullet a jeho metabolitů jako RNS výstižně naznačují, že se jedná o radikál. Molekula obsahuje 15 elektronů, čímž splňuje definici lichého a nepárového elektronu. Oxid dusnatý je vysoce reaktivní a ve vyšších koncentracích toxická molekula, i když má biologický poločas pouze několik sekund. Reaguje totiž pohotově a průběžně s erytrocyty a dvoumocným železem oxyhemoglobinu. Vzniká tak redukováná forma methemoglobinu a nitrát. Jde tak o jeden z nejúčinnějších způsobů inaktivace této molekuly v organismu. (ŠTÍPEK a kol., 2000)

V nízkých koncentracích má v organismu endogenní NO^\bullet regulační funkci, především v dýchacích cestách. Působí bronchodilatačně a vazodilatačně v cévním řečišti. Při imunitní reakci v dýchacích cestách se uplatňují makrofágy, které ničí organismy pomocí vysokých koncentrací cytotoxických látek doprovázené zvýšenou syntézou NO^\bullet . Oxid dusnatý a jeho metabolity nevedou pouze ke zničení mikroorganismů, ale způsobují také poškození zdravých buněk. Při reakci NO^\bullet

s reaktivními sloučeninami kyslíku dochází ke vzniku RNS a ty mohou při dalších interakcích narušit správnou funkci okolních molekul. Ke zvýšené koncentraci RNS může v dýchacích cestách dojít při infekčních, alergických a autoimunních onemocněních. Mezi chronická zánětlivá onemocnění patří například průduškové astma, chronická obstrukční plicní nemoc nebo cystická fibróza. (CHLÁDKOVÁ, CHLÁDEK, HOSPODKA, ČÁP, 2003)

1.4.2 Peroxynitrit

Peroxynitritový aniont (ONOO^-) není přímý volný radikál, ale je významné oxidační a nitrační činidlo. Je produktem reakce mezi superoxidem a oxidem dusnatým. Svým oxidačním působením poškozuje řadu biomolekul, včetně bílkovin a DNA. (MANDELKER, 2009)

Za fyziologického stavu pH se usuzuje, že je peroxynitrit rozkládán jako kyselina peroxydusitá na hydroxylový radikál a radikál oxidu dusičitého (NO_2^-). (ŠTÍPEK a kol., 2000)

2 OXIDAČNÍ STRES

Oxidační stres nastává při vzestupu volných radikálů v organismu, kde se hromadí a nepříznivě působí na fyziologický stav v důsledku nerovnováhy mezi oxidanty a antioxidanty. Nadměrné množství ROS/RNS může vést ke vzniku příčin zahrnujícím infekce, hypoxie, hyperglykemie, hyperlipidemie, onkologické procesy nebo zvýšené metabolické aktivity. Stárnutí je také dle teorie VR zapříčiněno neschopností mitochondrií vytvářet dostatečné množství ATP (energie) k udržení životaschopnosti buňky. Každá buňka podléhá dle všeho v některém svém stádiu života oxidačnímu stresu a jejich narušená funkce v orgánovém systému má přímý dopad na zdravotní stav. Patří sem poškození ledvin, kardiovaskulárního systému, jater, pankreatu, centrálního nervového systému, nervové tkáně, střev, nadledvin, plic, kostní dřeně a štítné žlázy. Oxidační stres nepůsobí jen tedy na jednotlivé buňky, ale i na orgánové soustavy, imunitní systém a stárnutí. (MANDELKER, 2009)

2.1 Teorie volného radikálu

V současné době existuje několik desítek teorií stárnutí. Mezi nejvýznamnější a nejvíce citovanou patří volně radikálová teorie z roku 1956. Stárnutí je multifaktoriální jev a proto je velice těžké ji beze zbytku vysvětlit jednou teorií. Tato je však založena na předpokladu, že jednoduchý proces, modifikovaný genetickými faktory a faktory zevního prostředí je zodpovědný za stárnutí a smrt. Stárnutí je vyvoláno VR, které poškozují buněčné molekuly a tkáně: zvláště bílkoviny, DNA a tuky, což zapříčiňuje vznik i různých chronických onemocnění. Stárnutí je především dáno schopností opravy DNA a antioxidační ochranou. (HOLEČEK, ROKYTA, 2005)

2.2 Následky oxidačního stresu

Buňky snášející déletrvající oxidační stres se pokoušejí dosáhnout přirozené rovnováhy mezi nebezpečnými oxidanty a antioxidační výbavou. Zesilují se obranné mechanismy zejména v zesílení genové exprese. Tyto adaptace ale vždy nepomáhají a vlivem oxidačního stresu mohou nastávat buněčné změny vedoucí k nevratnému poškození. Jestliže je stres nadměrný, buňky mohou zemřít dvěma mechanismy: nekrotickou a apoptotickou. (MANDELKER, 2009)

2.3 Oxidační poškození biologických struktur

Oxidoredukční reakce jsou nezbytnou součástí metabolismu každé buňky lidského těla. Volné radikály, které během těchto reakcí vznikají, mohou útočit na rozličné biologické složky a oxidačním působením narušují jejich strukturu, činnost nebo znemožňují vykonávat jejich funkci. Oxidační stres je stav, kdy tvorba VR převažuje nad antioxidační kapacitou organismu. Oxidační působení na makrobiomolekuly je příčinou, ale i následkem mnoha patofyziologických stavů, které jsou předmětem intenzivních výzkumů. Mezi makrobiomolekuly, které snadno podléhají oxidačnímu působení, patří především lipidy (tuky), nukleové kyseliny (DNA/RNA), ale i neméně důležité proteiny (bílkoviny) a sacharidové (cukerné) složky DNA. (ŠÍŠKOVÁ, 2015, online)

2.3.1 Peroxidace lipidů

Peroxidace lipidů nastává při interakci VR s buněčnou membránou. Jedná se o řetězovou reakci končící zpravidla účinkem membránového antioxidantu. Tento proces radikálně mění strukturu membrány, poškozuje semipermeabilitu (polopropustnost) a je také zdrojem vysoce toxických vedlejších produktů. V biologických systémech jsou náchylné na oxidaci zvláště tuky s obsahem více dvojných vazeb, takzvané polynenasycené mastné kyseliny, které jsou spolu s fosfolipidy součástí buněčné membrány. Takto poškozená bariéra buňky ztrácí svoji funkci, fluiditu a membránový potenciál, který na konec vede až k lýze buňky. Jedním z konečných produktů oxidace membránových lipidů je malondialdehyd (MDA), který reaguje s funkčními skupinami mnoha dalších molekul. Peroxidace zejména lipoproteinových částic LDL, které jsou přítomny ve stěnách cév, hraje zásadní roli při rozvoji aterosklerózy. (KOMRSKOVÁ, 2006, online)

2.3.2 Poškození nukleových kyselin

Poškození na úrovni především DNA se projevuje mutagenními a karcinogenními účinky, chromozomovými zlomy a poškození cukerné komponenty (deoxyribózy) vede k přerušení řetězce deoxyribonukleové kyseliny, při které se opět může tvořit toxický produkt MDA. Kromě deoxyribózy je možná oxidace i dusíkatých bází, nejčastěji guaninu. V moči je jeho oxidovaný metabolit rovněž stanovitelný. (RACEK, 2003)

2.3.3 Poškození proteinů

Při oxidačním stresu buňky zvýšeně stimulují expresi proteináz a tím zabezpečují rychlejší rozklad bílkovin určených k degradaci, přičemž zabraňují kumulaci poškozených polypeptidů a proteinů. Oxidace bílkovin vede k narušení rozličných funkcí, které v organismu zastávají roli receptorů, signálních molekul, transportních látek, protilátek a především enzymů. Mohou se oxidovat reaktivními formami kyslíku, dusíku i produkty peroxidace lipidů. Radikály atakují peptidické vazby a vytvářejí nové uhlíkaté radikály, které následně reagují s kyslíkem za vzniku intermediátů, jako je alkylperoxylový radikál (C-O-O \cdot), alkylperoxid (C-O-O-H) nebo alkoxylový radikál (C-O \cdot). Reakce bílkovin s aldehydy vznikajícími při peroxidaci lipidů vede ke vzniku karbonylovaných proteinů. Jejich zvýšená koncentrace byla dokázána u onemocnění, jako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, alkoholová steatóza, diabetes mellitus, revmatoidní artritida nebo ulcerózní kolitida. Koncentrace karbonylovaných bílkovin se zvyšuje i s narůstajícím věkem při stárnutí organismu. (ŠIŠKOVÁ, 2015, online)

3 ANTIOXIDANTY

Za antioxidanty jsou považovány všechny látky, které zabraňují volně radikálovým reakcím. V průběhu evoluce si všechny živé organismy vytvořily patřičné mechanismy, které zamezují negativním účinkům volných radikálů. I anaerobní bakterie, které takřka vůbec nepřicházejí do styku s kyslíkem. Jedná se především o enzymatickou bariéru, která se jakýmkoliv způsobem podílí na antioxidační aktivitě. Zbytek antioxidační kapacity organismu tvoří především nízkomolekulární látky neenzymového charakteru, jako je například kyselina močová, bilirubin, koenzym Q a podobně. Ještě větší skupinu však tvoří nízkomolekulární látky, které nejsou tvořeny vlastním metabolismem, a proto je nutné jejich příjem získat zvenčí nejčastěji z rostlinných zdrojů jako jsou vitaminy, polyfenoly nebo flavonoidy. Do této skupiny je možné zařadit i některé minerální prvky, které jsou spíše součástí výše zmíněného enzymatického systému, než aby samy vykazovaly antioxidační působení. (ŠIŠKOVÁ, 2015, online)

3.1 Endogenní antioxidanty

3.1.1 Superoxiddismutáza

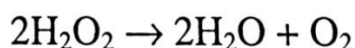
Mezi hlavní antioxidační enzymy patří superoxiddismutáza, která katalyzuje přeměnu superoxidu na molekulu kyslíku a peroxid vodíku, který může být dále přeměněn enzymem katalázou. Dle místa působení má několik forem a to cytoplazmatickou (SOD1), mitochondriální (SOD2) a extracelulární (SOD3). Superoxiddismutáza přispívá ke snižování oxidačního stresu a tím zabraňuje poškozování biomolekul, jako DNA, RNA nebo bílkoviny a lipidy. (MATOUŠKOVÁ, RUTTKAY-NEDECKÝ, KIZEK, 2014)



Obr. č. 2 Dismutace superoxidu (Štípek a kol., 2000)

3.1.2 Kataláza

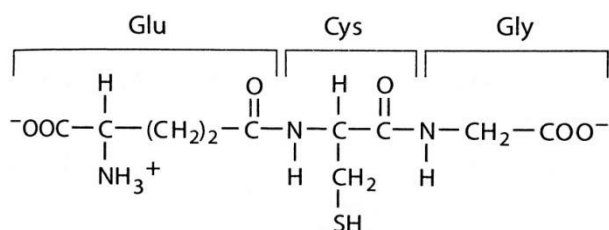
Kataláza je enzym, který zajišťuje přeměnu vysokých koncentrací peroxidu vodíku na vodu a molekulární kyslík. Její aktivita je nejvyšší v mitochondriích, peroxisomech jaterních buněk a v cytoplasmě červených krvinek. Navazuje na činnost superoxidodismutázy a chrání buňky před toxickým vlivem peroxidu vodíku. (RACEK, 2003)



Obr. č. 3 Rozklad peroxidu vodíku na vodu a kyslík (Štípek a kol., 2000)

3.1.3 Glutathion

Glutathion je peptid složený ze tří aminokyselin – kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu. Proces syntézy a katabolismu se nazývá gama-glutamylový cyklus. Je hlavním intracelulárním antioxidantem, jehož aktivní forma je v redukované podobě označována jako GSH, a za normálních podmínek tvoří přibližně 98% veškerého glutathionu. Tato redukovaná forma reaguje s intracelulárním peroxidem vodíku za přítomnosti enzymu glutathion peroxidázy. Příkladem může být ochrana erytrocytů před hemolýzou. Touto reakcí vzniká molekula vody a oxidovaná forma glutathionu označována jako GSSG. Aktivní formu GSH lze opět získat zpětnou redukcí GSSG za přítomnosti enzymu glutathion reduktázy a dostatku redukovaného koenzymu NADPH. Glutathion je také důležitý při udržování redukovaného askorbátu v buňkách a tím zajišťuje další ochranu vůči oxidačnímu stresu. (ODBORNÁ REDAKCE EDUKAFARM, 2013)



Obr. č. 4 Glutathion (KOOLMAN, RÖHM, 2012)

Glutathion zháší vznikající VR a inaktivuje tím nežádoucí oxidaci lipidů. Alkohol zhoršuje transport GSH do mitochondrií a snižují tím jeho obsah v jaterních buňkách. Ty se stávají citlivější na změnu prostředí, tvoří se nekontrolované množství

reaktivních forem kyslíku a nastává oxidační stres vedoucí až ke změnám genové exprese, poškození funkce či dokonce smrti buněk. Postižení jater následkem alkoholu je zapříčiněno sníženou aktivitou přirozených antioxidantů, jako je glutathion. Není divu, že hepatocyty, které obsahují ze všech buněk lidského těla nejvíce mitochondrií, jsou tak náchylné na udržení redoxní rovnováhy. (BRODANOVÁ, 2002)

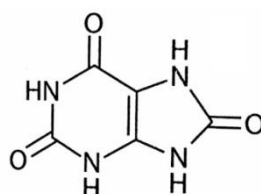
3.1.3.1 Selen a Zinek

Selen a zinek jsou často řazeny mezi antioxidanty, ačkoli samy o sobě antioxidační aktivitu nevykazují. Selen se řadí mezi nezbytný prvek pro správnou funkci některých enzymů, příkladem je glutathion peroxidáza a thioredoxin reduktáza. Zinek spolu s mědí jsou součástí i enzymu superoxiddismutázy. (BITTNER, CHOCHOLATÝ, ČECHOVÁ, ZIMA, GRILL, 2015)

Thioredoxin reduktáza, jak bylo zmíněno, patří mezi enzymy, jejichž funkce je závislá na přítomnosti selenu a která udržuje molekulu thioredoxinu v redukovaném stavu. Protože thioredoxin je látka vystupující v biologických procesech, je thioredoxin reduktáza významným regulačním enzymem který, jak se ukázalo, dokáže redukovat i malé intracelulární molekuly a podílí se na antioxidační ochraně. (VAŠKOVÁ, 2006, online)

3.1.5 Kyselina močová

Kyselina močová představuje konečný produkt metabolismu purinů. Mezi oxidační meziprodukty patří mimo jiné také xantin, který za přítomnosti enzymu xantinoxidázy uskutečňuje tvorbu kyseliny močové. Ta je ze 75% filtrována ledvinami, kde přechází do moče a zbylých 25% je vylučováno stolicí. Velká míra zpětné resorpce v proximálních tubulech ledvin souvisí s její funkcí na udržení osmotického tlaku a jako extracelulárního antioxidantu v krvi. (BERÁNEK, TICHÝ, 2013)



Obr. č. 5 Kyselina močová (KOOLMAN, RÖHM, 2012)

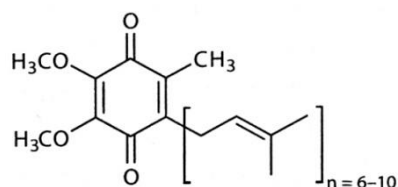
Degradace purinů je však také doprovázena tvorbou volných radikálů. Při reoxidaci redukované xantinoxidázy molekulárním kyslíkem dochází ke tvorbě superoxidových radikálů, které mohou spustit oxidační řetězovou reakci vedoucí k poškození okolních molekul. (MURRAY, 2002)

3.1.6 Bilirubin

Bilirubin je konečným produktem katabolismu hemu. Obecně je považován za nepříznivý ukazatel především jaterních onemocnění. Je nepochybné, že jeho vysoká hladina má za následky například poškození centrálního nervového systému u dětí, zejména v novorozeneckém období. Bilirubin je však také považován za jeden z neúčinnějších endogenních antioxidantů v lidském těle. Dokáže několikanásobně více uchránit lipoproteinové molekuly před oxidací, než vitamin E, a proto je hlavním antioxidantem podílejícím se na celkové antioxidační kapacitě krevní plasmy. Mírně zvýšené koncentrace bilirubinu ukazují, že má protektivní účinky u nemocí, v jejichž patogenezi hraje velkou roli oxidační stres. Jedná se o aterosklerózu, některá nádorová onemocnění, zánětlivé stavy a neurodegenerativní onemocnění. Má však také mnoho vedlejších účinků. Působí supresivně na imunitní systém, inhibuje činnost komplementu a blokuje protilátkovou odpověď. (VÍTEK, 2016)

3.1.7 Koenzym Q

Koenzym Q je v tucích rozpustná látka, která je běžnou součástí dýchacího řetězce a která také působí účinně proti volným radikálům v buněčných membránách. Existuje ve dvou podobách. Redukovaná forma je známa jako ubichinol a oxidovaná jako ubichinon. Bylo prokázáno, že tento poměr ubichinol/ubichinon v seminální plasmě je dobrým ukazatelem oxidačního stresu spermií a při suplementaci koenzymem Q v rámci kontrolovaných studií došlo k výraznému zlepšení motility spermií, aniž by došlo ke změnám jejich počtu či morfologie. (BITTNER, CHOCHOLATÝ, ČECHOVÁ, ZIMA, GRILL, 2015)



Obr. č. 6 Ubichinon (KOOLMAN, RÖHM, 2012)

Koenzym Q má schopnost regenerovat antioxidant α -tokoferol a pravděpodobně také inhibuje oxidace lipoproteinové částice o nízké hustotě (LDL) a má tam protektivní účinek v procesu aterosklerózy a vzniku kardiovaskulárních onemocnění. (ŠTÍPEK a kol., 2000)

3.1.8 Melatonin

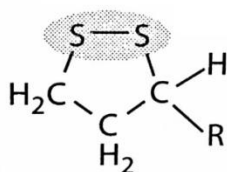
Melatonin je hormon produkovaný především v epifýze, navozuje spánek a je známý svým vysokým antioxidačním působením. V séru se nachází ve velmi nízkých koncentracích v řádech desítek až stovek pikomolů na mililitr. Sérová hladina je vyšší v noci než ve dne, neboť melatonin řídí spánkový cyklus a jeho koncentrace se během dne dynamicky mění. (KRAČMAROVÁ, POHANKA, 2014)

Díky svému složení je rozpustný ve vodě i tucích, a tak může volně procházet přes buněčné membrány. Vazba melatoninu na buněčné jádro chrání DNA před poškozením hydroxylovým radikálem, který dokáže jako jediný poškodit všechny dusíkaté báze. Při neutralizaci takových VR v blízkosti jádra je melatonin účinnějším antioxidantem, než redukovaný glutathion. (RACEK, 2003)

Účinky melatoninu se v poslední době velmi intenzivně zkoumají, neboť mimo jiné snižuje výskyt vedlejších účinků chemoterapie a stimuluje aktivitu makrofágů. Hlavní terapeutická indikace melatoninu ovšem spočívá v úpravě spánku. (ŠTÍPEK a kol., 2000)

3.1.9 Kyselina lipoová

Kyselina α -lipoová má funkci jako chelatační činidlo přechodných prvků, kofaktor transferáz a také jako antioxidant. U lidí se kyselina lipoová syntetizuje vlastním metabolismem, ale je možné ji i přijímat potravou. Je rozpustná ve vodě i tucích a nachází se v krevní plasmě i uvnitř buněk. Redukcí její cyklické struktury obsahující disulfid (S-S) vzniká dihydrolipoová kyselina. Tato forma kyseliny je ještě účinnějším antioxidantem, protože dokáže zhaset peroxylové i hydroxylové radikály a zabraňuje peroxidaci komponent buněčných membrán. Kyselina lipoová i dihydrolipoová jsou považovány za účinnější antioxidanty, než je glutathion, neboť dokáží eliminovat i vliv peroxidu vodíku nebo singletového kyslíku. Vitamin C se podílí s redukovanou lipoovou kyselinou na regeneraci GSH z jeho oxidované formy. (ŠIŠKOVÁ, 2015, online)



Obr. č. 7 Kyselina lipoová (KOOLMAN, RÖHM, 2012)

3.2 Exogenní antioxidanty

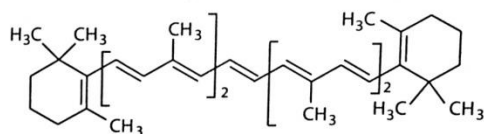
3.2.1 Vitaminy

Vitaminy jsou organické sloučeniny, které se podílejí na mnoha biologických procesech lidského organismu. Jsou součástí vývoje a správné funkce celého těla, účastní se mnoha enzymatických procesů nebo vstupují přímo do metabolických procesů. V posledních letech se vitaminům věnuje pozornost díky jejich antioxidantním účinkům a schopnosti předcházet tak civilizačním chorobám. (FAJFROVÁ, PAVLÍK, 2013, online)

Protože je vitamínu E v buněčné membráně omezené množství, je velice důležitá redukce tokoferylového radikálu zpět na neradikálovou formu. K tomu obvykle slouží vitamin C. (RACEK, 2003)

3.2.1.3 Vitamin A

Nejznámějším ze skupiny karotenoidů a karotenů je takzvaný β -karoten, provitamin A. Jeho antioxidační působení je nejpravděpodobnější v kůži, kde zcháší aktivovaný singletový kyslík ($^1\text{O}_2$) vzniklý po UV ozáření a který je také považován za vysoce reaktivní. β -karoten slouží v těle jako prekurzor pro dvě biologicky aktivní látky: jednak retinal nezbytný pro fotoreceptory sítnice a kyselinu retinovou, která je účinným transkripčním faktorem ovlivňujícím genovou expresi, diferenciaci a buněčný růst. Se znepokojujícím závěrem přišly studie ATBC a CARET, že suplementace β -karotenem u kuřáků zvyšuje riziko rozvoje rakoviny plic. (PLÁTENÍK, 2009)



Obr. č. 10 β -karoten (KOOLMAN, RÖHM, 2012)

Dalším ze skupiny potravinových karotenoidů je lykopen. Jeho nejbohatším zdrojem je rajčatová šťáva, dále melouny a guava. V rámci studií se prokázalo signifikantní snížení rizika vzniku rakoviny prostaty a infarktu myokardu při zvýšené konzumaci stravy bohaté na tento karotenoid. (PASSWATER, 2002)

3.2.2 Polyfenoly

Jedná se o širokou skupinu přírodních látek, které jsou svojí strukturou podobné vitaminům skupiny B. Jsou rozpustné jak ve vodě, tak v tucích a jejich antioxidační působení je často mnohonásobně vyšší než u antioxidačních vitaminů nebo minerálů. Svými protektivními účinky zabraňují vzniku aterosklerotických plátů, mají protizánětlivé účinky, snižují zvýšenou srážlivost krve a podporují využití vitamínu C. Zajišťují prevenci vzniku některých civilizačních chorob, jako je diabetes mellitus, rakovina nebo ateroskleróza.

K nejdůležitějším zdrojům polyfenolů patří:

- barevná zelenina, která obsahuje látku kvercetin působící jako antiastmatikum
- ovoce, především citrusy
- červené víno s látkou zvanou resveratrol, která působí až 50x silněji než vitamin E a 20x účinněji než vitamin C
- byliny, a to především ginkgo biloba, olivovník, šalvěj, tymián a bazalka
- zelené čaje, některé druhy mimo jiné obsahují i selen

Hlavní podskupinou polyfenolových sloučenin jsou takzvané bioflavonoidy. (HANÁK, 2014)

3.2.3 Flavonoidy

Přírodní antioxidanty přijaté potravou mohou chránit lidské buňky a tkáně před působením vznikajících VR, jako je peroxidace lipidů, denaturace proteinů, nebo poškození nukleových kyselin. Flavonoidy tvoří rozsáhlou skupinu organických sloučenin, které mají několik substituovaných benzenových kruhů obsahujících navázané hydroxylové (-OH) skupiny, které poskytují vlastní elektrony VR a tím nedochází k poškození ostatních biomolekul. Klasifikace flavonoidů spočívá na stupni jejich přirozené oxidace. Můžeme je rozdělovat na flavony, flavanoly, flavany, antokyaniny, flavonony nebo kumariny. Kromě antioxidačních vlastností mají flavonoidy také pozitivní schopnost vázat – chelátovat železnaté a měďnaté ionty, které mohou iniciovat vznik nebezpečného hydroxylového radikálu Fentonovou reakcí.

Flavonoidy se nacházejí v plodech, listech i květech rostlin. Jsou účinné jak samy, tak i v interakci s vitamínem C a vitamínem E. Konkrétním zdrojem především antokyaninů je považováno červené víno, které má příznivý vliv na prevenci kardiovaskulárních onemocnění, agregaci krevních destiček, či výše zmíněnou oxidaci lipidů. (VOLF, 2002)

PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem praktické části této bakalářské práce bylo měření celkové antioxidační kapacity vybraných vzorků pomocí metody „Trolox Equivalent Antioxidant Capacity“ (dále jen TEAC) a „Ferric Reduction Antioxidant Power“ (dále jen FRAP). Ke stanovení bylo vybráno 9 vzorků zastupujících rozličné nápoje, doplňkové preparáty stravy a biologický materiál.

Dalším cílem bylo porovnat zmíněné analytické metody a adekvátně interpretovat výsledky vybraných vzorků.

4.1 Metodika

Stanovení bylo prováděno v chemické laboratoři Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni. Prováděla se kalibrace, úprava vybraných vzorků a jejich následná analýza metodami TEAC a FRAP.

Tyto metody jsou založeny na změně absorbance při fotometrickém stanovení, intenzity monochromatického záření prošlého kyvetou s měřenou látkou. Reakce mezi zkoumaným vzorkem a činidlem se nejčastěji projevuje barevnou změnou. Absorbance je úměrná koncentraci stanovované látky dle takzvaného Lambert – Beerova zákona. (MALÁT, 1973)

$$A = \varepsilon \times l \times c$$

Obr. č. 11 Lambert – Beerův zákon (MALÁT, 1973)

Kde **A** je zjištěná absorbance, **ε** molární absorpční koeficient, **l** tloušťka kyvety a **c** je hledaná koncentrace. V praxi se však výsledná koncentrace vzorku stanoví buď porovnáním se známým standardem, nebo odečtením z kalibrační křivky.

Získané hodnoty sloužily k porovnání obou metod a vybraných vzorků v rámci jejich celkové antioxidační kapacity.

4.2 Praktické otázky

1. Jak se od sebe liší použité metody z hlediska praktického provedení?
2. Jak se od sebe liší použité metody z hlediska analytických vlastností a jaké jsou možnosti využití v klinické praxi?

5 ANALYTICKÉ VLASTNOSTI LABORATORNÍ METODY

Každá metoda má své určité vlastnosti, které rozhodují o jejím aplikačním rozsahu, uvažované aplikaci a stupni správnosti a specifičnosti. Jejich správné pochopení je důležité nejen pro lékaře, ale i laboratoř samotnou, která poskytuje získané informace a data o vzorcích a pacientech.

5.1 Přesnost

Přesnost neboli preciznost metody je dána jako míra shody mezi výsledky získanými opakovatelnou analýzou téhož vzorku za předem stanovených podmínek. Dle těchto podmínek rozlišujeme:

Opakovatelnost, kdy se všechny analýzy provádějí najednou, na stejném přístroji a se stejnou obsluhou.

Reprodukovatelnost, kdy se analýza provádí například jednou denně, na stejném přístroji a případně různou obsluhou.

Mezilaboratorní reprodukovatelnost, kdy se měření provádí na různých místech, různou obsluhou i na různém přístrojovém vybavení laboratoře.

Přesnost je statickým výsledkem náhodných chyb, u kterých je míra nepřesnosti dána směrodatnou odchylkou (SD). Nižší hodnoty SD ukazují na vyšší přesnost metody a naopak. Směrodatná odchylka se vyjadřuje ve stejných jednotkách, jako měřená veličina, proto se obvykle vypočítává ještě variační koeficient (CV), vyjadřovaný v procentech.

5.2 Pravdivost

Pravdivost metody je definována jako těsnost souhlasu mezi průměrem velkého počtu výsledků získaných měřeními a dohodnutou referenční hodnotou, kde mírou pravdivosti je Bias – velikost odchylky. Pravdivost je dána velikostí systematických chyb.

5.3 Citlivost

Chceme-li znát rozsah koncentrací, které lze danou metodou stanovit, je důležitým parametrem citlivost laboratorní metody. Analytická citlivost je dána směrnicí kalibrační křivky. Čím je křivka strmější, tím je metoda citlivější, protože je odezva měřené veličiny náchylnější na změnu koncentrace analytu. Je dána jako nejmenší rozdíl koncentrací, které lze ještě s přípustnou nejistotou rozlišit.

5.4 Specifičnost

Za vysoce specifické metody pokládáme takové, které jsou schopny reagovat pouze se stanovovanou látkou s minimální interferencí okolních složek v reakční směsi. Analytická specifičnost vyjadřuje, do jaké míry je výsledek ovlivněn jinými látkami ve stanovovaném materiálu. Příliš specifické metody jsou často drahé a náročné, proto se volí takové, u kterých možná interference není z klinického hlediska významná. (RACEK at al., 2006)

6 METODY STANOVENÍ

6.1 TEAC

Analytická metoda TEAC, z anglického výrazu „Trolox Equivalent Antioxidant Capacity“, využívá měření celkové antioxidační kapacity, která je vztahována ke standardní látce Troloxu. Trolox je po chemické stránce syntetický, ve vodě rozpustný derivát vitamínu E. Princip metody spočívá ve zhášení uměle vytvořeného stabilního radikálu ABTS \cdot [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonová kyselina)], který vzniká působením peroxodisíranu draselného na tuto molekulu. Takto vzniklý radikál má tyrkysově modrou barvu. Po přidání Troloxu, nebo vzorku obsahující látku s antioxidační schopností dochází ke konverzi radikálu ABTS \cdot zpět na bezbarvou, neradikálovou formu a tato barevná změna je detekována fotometricky při vlnové délce absorpčního maxima 734 nm. (PAULOVÁ, BOCHOŘÁKOVÁ, TÁBORSKÁ, 2004, online)

6.1.1 Postup provedení

Prvotním úkolem bylo vytvořit deseti bodovou kalibraci pomocí standardního roztoku Troloxu o koncentraci 2 mmol/l a sestavení kalibrační křivky v závislosti na absorbanci.

Kalibrační roztoky byly připraveny ředěním standardního roztoku Troloxu o koncentraci 2 mmol/l destilovanou vodou do objemu 500 μ l po vzrůstající koncentraci 0,2 mmol/l.

Do deseti označených zkumavek bylo pipetováno po 2 ml činidla ABTS, ke kterému se v intervalech přesně po třiceti sekundách přidávalo 50 μ l kalibračního roztoku. Jako slepý vzorek bylo použito 2 ml ABTS a 50 μ l destilované vody. Přesně po deseti minutové inkubaci při laboratorní teplotě byly všechny kalibrační vzorky měřeny na poloautomatickém fotometru NOVASPEC PLUS N při vlnové délce 734 nm.

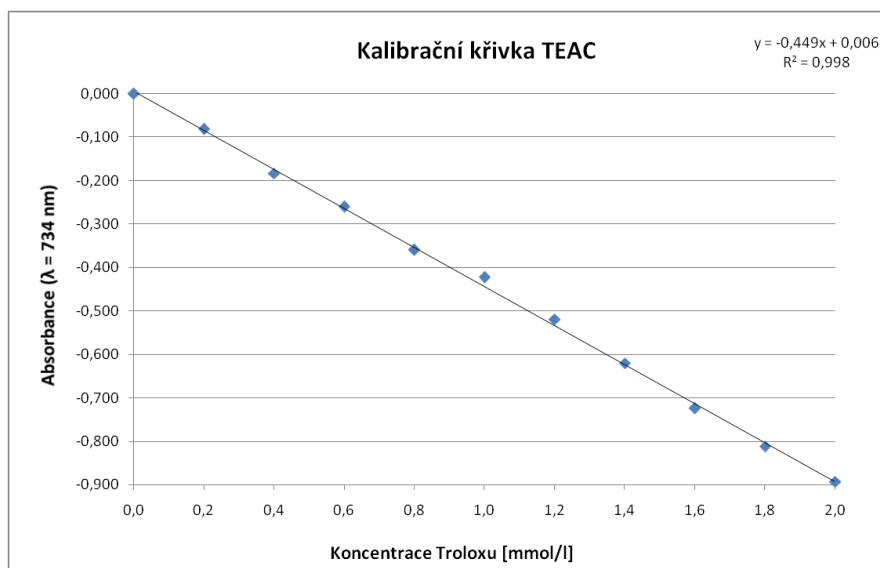
Tabulka č. 2 Příprava a hodnoty absorbancí kalibračních roztoků Troloxu

Č. zkumavky	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Trolox(2mmol/l) [μ l]	0	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500
Dest. voda [μ l]	500	450	400	350	300	250	200	150	100	50	0
c (trolox) [mmol/l]		0,20	0,40	0,60	0,80	1,00	1,20	1,40	1,60	1,80	2,00
A ($\lambda = 734$ nm)		-0,081	-0,183	-0,260	-0,359	-0,422	-0,519	-0,620	-0,724	-0,812	-0,893

Výsledné absorbance kalibračních roztoků jsou v záporných hodnotách. To je zapříčiněno vlivem odbarvování barevného výchozího činidla ABTS, které se působením Troloxu vracelo do své původní, bezbarvé a neradikálové formy.

Grafem kalibrační křivky je tedy nepřímá úměra.

Graf č. 1 Desetibodová kalibrační křivka roztoků Troloxu v závislosti na absorbanci



Lineární rovnice uvedená v pravém horním rohu grafu byla poté použita k výpočtu antioxidační kapacity vzorků, vztažené ke koncentraci Troloxu z kalibrační křivky. Hodnota R^2 značí hodnotu spolehlivosti křivky.

6.2 FRAP

Metoda FRAP, z anglického výrazu „Ferric Reduction Antioxidant Power“ slouží k popisu celkové antioxidační kapacity vyšetřovaného vzorku na základě schopnosti redukovat železité ionty Fe^{3+} v komplexu TPTZ [2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazin] na železnaté ionty Fe^{2+} , které jsou prokazatelné barevnou změnou bezbarvého roztoku až na intenzivně fialovou. Tato změna je měřitelná fotometricky při vlnové délce absorpčního maxima 593 nm a výsledek se vyjadřuje jako ekvivalentní množství vzniklých železnatých iontů Fe^{2+} . (KOPŘIVA a kol., 2012, online).

6.2.1 Postup provedení

Podobně jako u předchozí metody TEAC se i zde musela prvotně připravit desetibodová kalibrace a sestrojít kalibrační křivka v závislosti na měřené veličině. Jako standardní roztok byl zde použit síran železnatý o koncentraci 1 mmol/l. Kalibrační roztoky byly připraveny ředěním standardního roztoku destilovanou vodou do objemu 500 μl .

Do deseti označených zkumavek bylo pipetováno po 2 ml činidla FRAP, ke kterému se v intervalech přesně po třiceti sekundách přidávalo 50 μl kalibračního roztoku síranu železnatého. Jako slepý vzorek bylo připraveno 2 ml činidla FRAP a 50 μl vody. Přesně po deseti minutové inkubaci při laboratorní teplotě byly všechny kalibrační vzorky měřeny na poloautomatickém fotometru NOVASPEC PLUS N při vlnové délce 593 nm.

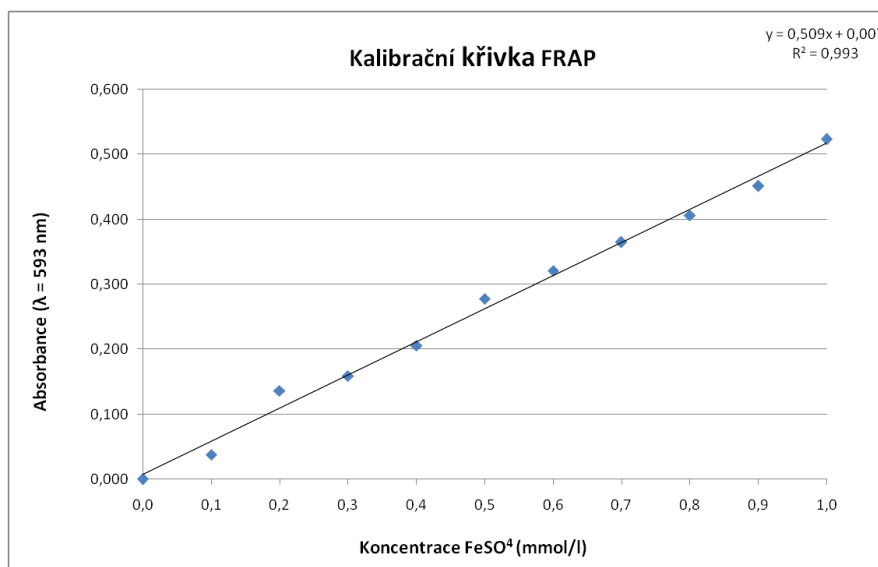
Tabulka č. 3 Příprava a hodnoty absorbancí kalibračních roztoků síranu železnatého

Č. zkumavky	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$\text{FeSO}_4(1\text{mmol/l})$ [μl]	0	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500
Dest. voda [μl]	500	450	400	350	300	250	200	150	100	50	0
$c(\text{FeSO}_4)$ [mmol/l]	0,00	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	0,60	0,70	0,80	0,90	1,00
$A(\lambda = 593 \text{ nm})$	0,000	0,038	0,136	0,159	0,206	0,278	0,321	0,365	0,406	0,451	0,523

Příčinou vzrůstající absorpance jednotlivých kalibračních roztoků je nárůst fialového zabarvení nastávající při redukcí Fe^{3+} na Fe^{2+} .

Grafem kalibrační křivky je tedy přímá úměra.

Graf č. 2 Desetibodová kalibrační křivka roztoků síranu železnatého v závislosti na absorbanci



I v tomto případě byla lineární rovnice z grafu použita k výpočtu antioxidační kapacity, vztažené ke koncentraci standardu síranu železnatého. Hodnota R^2 značí hodnotu spolehlivosti křivky.

6.3 Příprava vzorků

Dalším nezbytným úkolem byla příprava vybraných vzorků.

Zástupci prvních dvou vzorků byly čaje, zelený a černý čaj. Ty se prvotně louhovaly ve 200 ml horké vody a poté se ředily v poměru 1:50 s destilovanou vodou. Stejným poměrem ředění byly připraveny vzorky jablečného džusu a červeného vína.

U vybraných antioxidačních doplňků stravy „Tablety Antioxidačního komplexu“ a „Antioxidantu 21“ byla vždy jedna tableta rozdrcena pomocí třecí misky s tloučkem, poté obsah smísen s 5 ml destilované vody a vzniklá suspenze následně přefiltrována přes filtrační papír. Z filtrátu byl přepipetován 1 ml do nové kádinky, do které se přidalo 99 ml destilované vody. Výsledný vzorek připravený k analýze byl naředěn opět vodou v poměru 1:3 u obou vzorků. Výsledný poměr ředění u antioxidačních preparátů činil 1:300.

Vodný roztok vitamínu C byl poskytnut laboratoří o koncentraci 1 mmol/l. Tato koncentrace byla však pro stanovení nevyhovující, proto se ředil v poměru 1:3 s destilovanou vodou.

Posledními zástupci byl biologický materiál: sliny a sérum. Vzorek slin se připravil mírným žvýkáním sacího buničínového válečku po dobu jedné minuty a následnou dvouminutovou centrifugací při 2500 otáček za minutu ve speciální plastové zkumavce Salivette. Vzorek séra a slin byl přímo připraven k použití. Sérum bylo poskytnuto laboratoří, kde bylo prováděno stanovení.

Tabulka č. 4 Přehled a příprava vybraných vzorků

Číslo vzorku	Vzorek	Ředění
1	Zelený čaj	1:50
2	Černý čaj	1:50
3	Jablečný džus	1:50
4	Červené víno	1:50
5	Tableta Antioxidační komplex	1:300
6	Antioxidant 21	1:300
7	Vitamin C	1:3
8	Sérum	
9	Sliny	

7 ANALÝZA VZORKŮ

Takto připravené vzorky uvedené v tabulce č. 3 byly měřeny uvedenými dvěma metodami. U obou metod se vzorek připravil smícháním 2 ml reakčního činidla a 50 μ l vzorku. Po inkubaci přesně deseti minut při laboratorní teplotě se vzorek změřil při příslušné vlnové délce pro danou metodu a hodnoty absorbancí se zaznamenaly pro výpočet koncentrace.

Tabulka č. 5 Hodnoty naměřených absorbancí fotometrem NOVASPEC PLUS N

Číslo vzorku	Vzorek	Absorbance TEAC	Absorbance FRAP
1	Zelený čaj	-0,192	0,167
2	Černý čaj	-0,154	0,137
3	Jablečný džus	-0,045	0,008
4	Červené víno	-0,150	0,171
5	Tableta Antioxidační komplex	-0,194	0,287
6	Antioxidant 21	-0,181	0,278
7	Vitamin C	-0,188	0,282
8	Sérum	-0,164	0,216
9	Sliny	-0,290	0,401

Koncentrace dle změřených absorbancí se počítala pomocí získaných lineárních rovnic z kalibračních křivek.

Pro metodu TEAC se jednalo o rovnici $y = -0,449x + 0,006$.

Pro metodu FRAP rovnice $y = 0,509x + 0,007$.

Po dosazení naměřené hodnoty absorbance za hodnotu „y“ v rovnici se získala koncentrace odpovídající celkové antioxidační kapacitě.

Tabulka č. 6 Antioxidační kapacita ředěných vzorků vztažená ke standardním látkám

Číslo vzorku	Vzorek	Koncentrace Troloxu [mmol/l]	Koncentrace FeSO ₄ [mmol/l]
1	Zelený čaj	0,44	0,31
2	Černý čaj	0,36	0,26
3	Jablečný džus	0,11	0,00
4	Červené víno	0,35	0,32
5	Tableta Antioxidační komplex	0,45	0,55
6	Antioxidant 21	0,42	0,53
7	Vitamin C	0,43	0,54
8	Sérum	0,38	0,41
9	Sliny	0,65	0,77

Při interpretaci těchto hodnot si bylo nutno uvědomit, že takto zjištěné hodnoty odpovídají pouze naředěným vzorkům a nikoliv jejich skutečné hodnotě celkové antioxidační kapacity. Skutečných koncentrací se dalo docílit násobením vypočtených hodnot číslem ředění, jakým byly vzorky připraveny a které jsou také výše uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka č. 7 Přepočtená antioxidační kapacita pro neředěné vzorky

Číslo vzorku	Vzorek	Koncentrace Troloxu [mmol/l]	Koncentrace FeSO ₄ [mmol/l]
1	Zelený čaj	22,05	15,72
2	Černý čaj	17,82	12,77
3	Jablečný džus	5,68	0,10
4	Červené víno	17,37	16,11
5	Tableta Antioxidační komplex	133,62	165,03
6	Antioxidant 21	124,95	159,72
7	Vitamin C	1,30	1,62
8	Sérum	0,38	0,41
9	Sliny	0,65	0,77

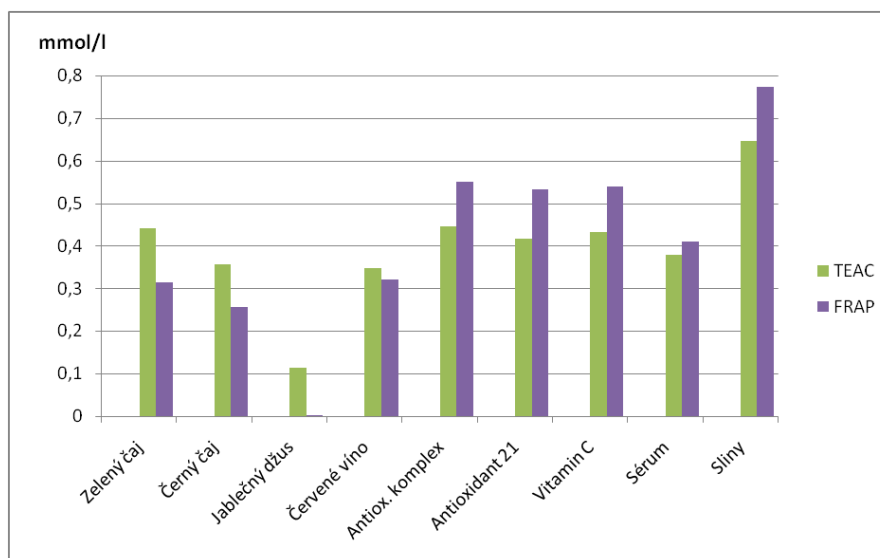
Z výše uvedených dvou tabulek je patrné, jak se od sebe skutečné hodnoty v rámci vybraných vzorků liší. K následující interpretaci bylo využito hodnot jak vzorků řaděných, tak neřaděných.

7.1 Interpretace dat

Obě metody používají k vyjádření celkové antioxidační kapacity vlastní standardní látku. V případě metody TEAC se jedná o synteticky vytvořený derivát vitamínu E – Trolox a u metody FRAP se jedná o ekvivalentní množství železnatých iontů síranu železnatého.

Výsledné koncentrace antioxidační kapacity vzorků byly pro lepší orientaci umístěny do sloupcových grafů, které znázorňují rozdíly mezi zjištěnými daty a použitými metodami.

Graf č. 3 Porovnání hodnot řaděných vzorků mezi metodami TEAC a FRAP



Z tohoto grafu, sestrojeného dle tabulky č. 6 není zcela zřejmé, jaké vzorky disponovaly nejvyšší antioxidační kapacitou, ale je dobrým ukazatelem k porovnání zvolených analytických metod.

Jak je z grafu patrné, posledních pět vzorků vykazuje vyšší antioxidační kapacitu naměřenou metodou FRAP než TEAC. Jak bylo výše u jednotlivých metod zmíněno, metoda FRAP je založena na schopnosti redukovat železité ionty a tím pádem bylo

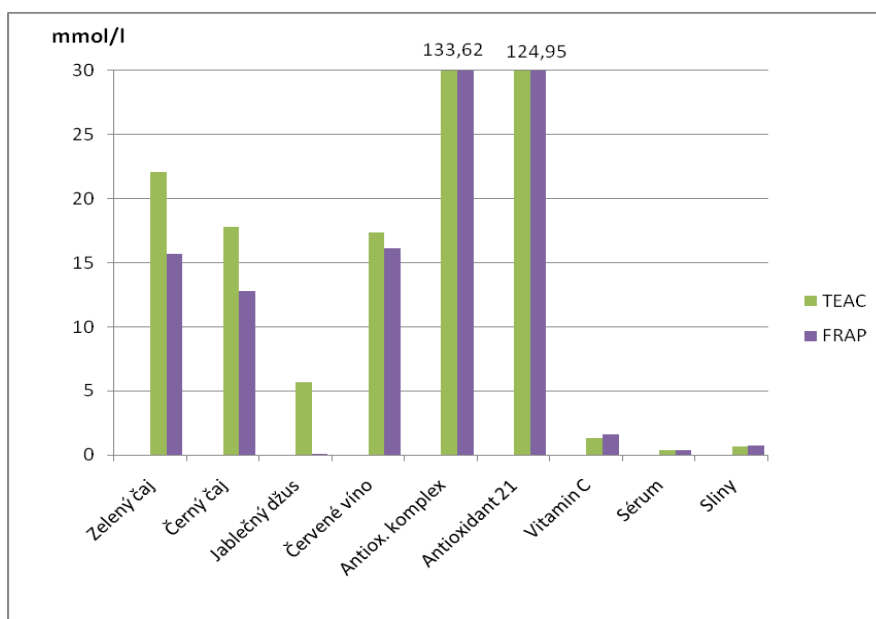
měření ovlivněno řadou látek redukujícího charakteru, které samy o sobě nemusí vykazovat antioxidační vlastnosti.

FRAP metoda probíhá za snížené hodnoty pH, která není zcela fyziologická, což má za následek sníženou reaktivitu komplexu se zejména polyfenolovými sloučeninami (obsaženými ve vzorcích čaje a červeného vína). (PAULOVÁ, BOCHOŘÁKOVÁ, TÁBORSKÁ, 2004, online)

U obou antioxidačních preparátů, ve kterých byl obsažen vitamin C, není překvapující, že hodnoty u metody FRAP převažují nad hodnotami druhé použité metody. Je známé, že kyselina askorbová má silné redukující účinky. Rozdíl je patrný i v případě séra a slin. Především sérum je směsí velikého množství organických, ale i anorganických látek, které mohou vykazovat redukující povahu a následně reagovat nespecificky s FRAP činidlem. A proto je zřejmé, že co se týče schopnosti vzorku eliminovat volný radikál, je metoda TEAC lepší volbou. Zatímco chceme-li analyzovat antioxidační schopnost směsi zahrnující spíše látky redukující povahy, může být metoda FRAP pro praktické účely taktéž využita.

Nejvyšší koncentrace ze všech vzorků dle grafu číslo 3 měly sliny. Zatímco nejnižší koncentraci měl jablečný džus jak u metody TEAC, tak u metody FRAP, která zaznamenala při měření velice nízkou až nulovou hodnotu absorbance. U vzorku zeleného a černého čaje je rovněž patrné, že vyšší antioxidační kapacitu měl čaj zelený. Z tohoto grafu lze také vypočítat i fakt, že oba použité antioxidační preparáty „Tableta Antioxidační komplex“ a „Antioxidant 21“ disponují velice podobnou kapacitou, jak lze vypočítat i v grafu č. 4. Je třeba však upozornit, že v grafu č. 3 mají jednotlivé vzorky různá ředění, a tedy není možno porovnávat jejich absolutní hodnoty antioxidační kapacity nebo redukčního potenciálu.

Graf č. 4 Porovnání hodnot neředěných vzorků mezi metodami TEAC a FRAP



U toho sloupcového grafu, který byl sestaven dle tabulky č. 7, lze již přesně určit skutečné hodnoty antioxidantní kapacity analyzovaných vzorků. Zde lze vypočítat nejpatrnější rozdíl s předchozím grafem, a to mezi antioxidantními preparáty a vitaminem C, neboť tabletové preparáty byly ředěny tři sta krát a vitamin C pouze tři krát na koncentraci přibližných 0,33 mmol/l. Nejvyšší kapacitu po tabletových preparátech zaujímá zelený čaj, černý čaj a červené víno.

Biologický materiál antioxidantní kapacitu skutečně vykazuje, avšak tak malou, že v měřítku s ostatními zvolenými vzorky je jejich kapacita velice nízká. O tom, že lidské sérum vykazuje antioxidantní kapacitu, není sporu. Zajišťuje ji především kyselina močová, bilirubin a antioxidantní enzymy.

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo v teoretické části sjednotit základní informace o rozdělení, vzniku a působení volných radikálů a antioxidantů na lidský organismus. Samotnou kapitolu tvoří odborníky stále velice diskutovaný a probíraný oxidační stres, jakožto činitel mnoha závažných zdravotních stavů.

Antioxidanty tvoří důmyslně spolupracující systém ochranné a komplexní bariéry eliminující vliv VR na okolní buněčné struktury a tkáně. Mohou účinkovat specifickými mechanismy jako dárci elektronů, nebo nespecificky pomocí svých redukčních účinků a schopností také předcházet jejich vzniku. Existuje jich nepřeberné množství. Tato práce rozčlenila antioxidanty do dvou podskupin: na endogenní, vznikající v organismu a exogenní, kam spadají především vitaminy a další rostlinné zdroje. VR neznamenají však vždy jen riziko, jsou nezbytnou součástí signalizačních drah, imunitního systému, regulačních a metabolických drah.

„Denne sa objavujú správy o nových, zatiaľ menej známych látkach zo skupiny nízkomolekulárnych neenzýmových antioxidantov a benefitoch ich užívania pri rôznych ochoreniach.“ (ŠIŠKOVÁ, 2015, online)

Tento výrok stvrzuje, že stále vycházející ohromné množství nových odborných výzkumů po celém světě, které pojednávají o vlivu antioxidantů a volných radikálů na lidské zdraví, je aktuálním tématem současné doby. Rovnováha antioxidantů a VR je součástí uceleného lidského zdraví a převaha jedné, nebo druhé strany nepřináší vždy jen dobré nebo špatné.

Dodnes zůstává nejrozumnějším doporučením zdravý životní styl a příjem vyvážené a pestré stravy bohaté zejména na ovoce a zeleninu jako zdroj antioxidantů, které předcházejí vzniku oxidačního stresu a které mají nepochybně příznivý i protektivní účinek na organismus. (HLÚBIK, STRÍTECKÁ, FAJFROVÁ, 2006)

Praktická část se skládala z měření celkové antioxidační kapacity pomocí dvou rozdílných metod: TEAC a FRAP. Principy analytického stanovení a samotné provedení bylo velice shodné. Principem jsou to fotometrické metody, které zaznamenávaly intenzitu změny zabarvení činidla ovlivněného obsaženými antioxidanty ve vzorku.

Stanovení antioxidační kapacity se v dnešní době stále používá u dvou typů vzorků. Jedním jsou potraviny a potravinové doplňky, jako jeden z ukazatelů nutričních hodnot. Druhým typem jsou vzorky tkání a tělních tekutin pacientů, u kterých změněná celková antioxidační kapacita odráží reakci na upravenou stravu, nebo nasazených preparátů z důvodu sledování některých patologických stavů. (TURKOVÁ, 2013, online)

LITERATURA A PRAMENY

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

BERÁNEK, Martin a Miloš TICHÝ. *Vybrané kapitoly z klinické biochemie: pro studijní program Zdravotnická bioanalytika*. Praha: Karolinum, 2013, 197 s. ISBN 978-80-246-2186-9.

BITTNER, Lukáš, Matuš CHOCHOLATÝ, Marcela ČECHOVÁ, Tomáš ZIMA a Robert GRILL. Vliv volných radikálů na fertilitu muže a možnosti léčby. *Česká urologie*. 2015, ročník 19, č. 1, s. 11-18. ISSN 1211-8729.

BRODANOVÁ, Marie. Toxické poškození jater - I. díl. *Interní medicína pro praxi*. 2002, ročník 4, č. 12, s. 590-594. ISSN 1212-7299.

HANÁK, Libor. Antioxidanty - staří známí. *Meduňka: Alternativní cesty ke zdraví*. 2014, ročník 10, č. 1, s. 28-29. ISSN 1214-4932.

HAVELKOVÁ, Alžběta. Oxidační stres, lidské choroby a biomarkery. *Bioprospect : bulletin biotechnologických společností v České republice a Slovenské republice*. 2006, ročník 16, číslo 3-4, s. 24-25. ISSN 1210-1737.

HLÚBIK, Pavol, Hana STRÍTECKÁ a Jana FAJFROVÁ. Antioxidanty v klinické praxi. *Interní medicína pro praxi*. 2006, ročník 8, č. 2, s. 79-81. ISSN 1212-7299.

HOLEČEK, Václav a Richard ROKYTA. Volně radikálová teorie stárnutí. *Česká geriatrická revue*. 2005, ročník 3, č. 1, s. 27-33. ISSN 1214-0732.

CHLÁDKOVÁ, Jiřina, Jaroslav CHLÁDEK, Martin HOSPODKA a Petr ČÁP. Oxid dusnatý a jiné reaktivní dusíkaté látky v dýchacích cestách: metody a význam jejich stanovení při monitorování zánětu. *Alergie*. Hradec Králové, 2003, ročník 5, č. 4, s. 298-302. ISSN 1212-3536.

KOOLMAN, Jan a Klas-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Překlad 4. vyd. Praha: Grada, 2012, 498 s. ISBN 978-80-247-2977-0.

KRAČMAROVÁ, Alžběta a Miroslav POHANKA. Elektrochemické stanovení nízkomolekulárních antioxidantů v séru. *Chemické listy*. 2014, ročník 108, č. 1, s. 64-69. ISSN 1213-7103.

MALÁT, Miroslav. *Absorpční anorganická fotometrie*. 1. vyd. Praha: Academia, 1973, s. 27-30.

MANDELKER, Lester, ed. *Oxidační stres: role mitochondrií, volných radikálů a antioxidantů*. 2., přeprac. vyd. Praha: Pierot, 2009. Veterinary clinics of North America. 220 s. ISBN 978-80-7353-135-5.

MATOUŠKOVÁ, Martina, Branislav RUTTKAY-NEDECKÝ a René KIZEK. Antioxidační enzymy - biochemické markery oxidačního stresu. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*. Brno, 2014, ročník 1, č. 3, s. 53-56. ISSN 2336-3940.

MURRAY, Robert K. *Harperova Biochemie*. 23. vyd., (4. české vyd.). Jinočany: H&H, 2002, 872 s. Lange medical book. ISBN 80-731-9013-3.

ODBORNÁ REDAKCE EDUKAFARM. Glutathion známý, neznámý. *Biotherapeutics*. 2013, ročník 3, č. 2, s. 32-35. ISSN 1805-1057.

PASSWATER, Richard A. a Jana NOVOTNÁ. *All about antioxidants/O antioxidantech*. Praha: Pragma, c2002. Otázky a odpovědi (Pragma). 94 s. ISBN 80-720-5897-5.

PLÁTENÍK, Jan. Volné radikály, antioxidanty a stárnutí. *Interní medicína pro praxi*. 2009, ročník 11, číslo 1, s. 30-33. ISSN 1212-7299.

RACEK, Jaroslav. *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění*. 1. vyd. Praha: Galén, c2003, 89 s. Repetitorium. ISBN 80-7262-231-5.

RACEK, Jaroslav et al. *Klinická biochemie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Galén, c2006. 329 s. ISBN 80-726-2324-9.

RACEK, Jaroslav, Jaromír EISELT a Karel OPATRŇÝ. Přechodné prvky a volné radikály. *Časopis lékařů českých*. 2002, ročník 141, č. 15, s. 479-482. ISSN 0008-7335.

ŠTÍPEK, Stanislav a kol. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. 1. vyd. Praha: Grada, 2000, 314 s. ISBN 80-7169-704-4.

VÍTEK, Libor. Úloha bilirubinu v prevenci kardiovaskulárních a nádorových onemocnění. *Časopis lékařů českých*. 2016, ročník 155, č. 2, s. 10-14. ISSN 0008-7335.

VOLF, Karel. Flavonoidy jako antioxidanty. *Praktický lékař : časopis pro další vzdělávání lékařů*. 2002, ročník 82, č. 7, s. 379-384. ISSN 0032-6739.

SEZNAM ELEKTRONICKÝCH ZDROJŮ

FAJFROVÁ, Jana a Vladimír PAVLÍK. Vitaminy, jejich funkce a využití. *Medicína pro praxi* [online]. 2013, č. 2, s. 81-84 [cit. 2017-02-11]. Dostupné z: <http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2013/02/09.pdf>

HOFERKOVÁ, Adéla. *Vliv antioxidantů na zdraví člověka* [online]. Brno, 2015 [cit. 2017-03-06]. Dostupné z: http://theses.cz/id/fm7ywh/zaverecna_prace.pdf. Bakalářská práce. Mendelova univerzita v Brně. Vedoucí práce Prof. RNDr. Bořivoj Klejdus, Ph.D.

HOLEČEK, Václav. *Volné radikály, antioxidanty, jejich účinky a možnost jejich sledování metodami Fort a Ford* [online]. 2009 [cit. 2017-02-11]. Dostupné z: http://dotdiag.cz/img/prednasky/O2_radik_ly_u_diabetu_CR3000.pdf

KOMRSKOVÁ, Daniela. *Antioxidační mechanismy v prevenci oxidativního poškození* [online]. Brno, 2006 [cit. 2017-03-02]. Dostupné z: http://is.muni.cz/th/20107/prif_d/Komrskova2006.pdf. Disertační práce. Masarykova univerzita v Brně. Vedoucí práce RNDr. Milan Číž, Ph.D.

KOPŘIVA, Vladimír a kol. *Vybrané instrumentální metody v biochemických cvičeních* [online]. Brno, 2012 [cit. 2017-01-14]. Dostupné z: <http://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2011/07/kopriva-skripta-ii-web.pdf>

PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. *Metody stanovení antioxidační kapacity přírodních látek in vitro*. [online]. *Chemické listy*, 2004, č. 98, s. 174-179 [cit. 2017-01-17]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf

ŠÍŠKOVÁ, Katarína. *Volné radikály a oxidačný stres* [online]. Lékařská fakulta v Plzni Univerzity Karlovy. 2015 [cit. 2017-03-01]. ISBN 978-80-88120-08-7. Dostupné z: <http://ceva-edu.cz/mod/wiki/view.php?id=4241>

TURKOVÁ, Kteřina. *Metody zjišťování látek antioxidačního charakteru* [online]. České Budějovice, 2013 [cit. 2017-03-08]. Dostupné z: <http://theses.cz/id/59myxa/TurkovaDiplomovaprace3.pdf>. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Vedoucí práce Mgr. Jan Schuster, Ph.D.

VAŠKOVÁ, Pavla. *Selen v lidské výživě* [online]. Brno, 2006 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/101218/lf_b/selen_v_lidske_vyzive.txt. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně. Vedoucí práce RNDr. Jiří Totušek, CSc.

SEZNAM UŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	absorbance
ABTS	[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonová kyselina)]
ATBC	α -tocoferol/ β -caroten
ATP	adenosintrifosfát
c	koncentrace
CARET	β -caroten and retinol efficacy trial
CV	variační koeficient
č.	číslo
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FRAP	ferric reduction antioxidant power
GSH	redukováný glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion
λ	vlnová délka
LDL	lipoprotein o nízké hustotě
μ l	mikrolitr
MDA	malondialdehyd
ml	mililitr
mmol/l	milimol na litr
NADPH	redukováný koenzym nikotinamidadenindinukleotidfosfát
nm	nanometr
RNA	ribonukleová kyselina
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
SD	směrodatná odchylka
SOD	superoxiddismutáza
TEAC	trolox equivalent antioxidant capacity
TPTZ	[2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazin]
UV	ultrafialové (záření)
VR	volný radikál

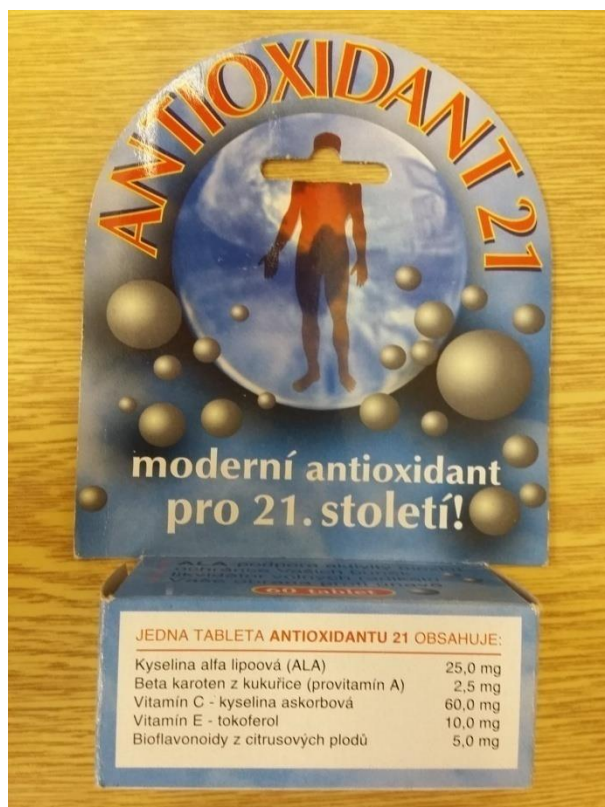
SEZNAM PŘÍLOH



Příloha č. 1 Poloautomatický fotometr NOVASPEC PLUS N



Příloha č. 2 Destilovaná voda, zásobní roztok síranu železnatého, reakční činidla pro metody TEAC a FRAP



Příloha č. 3 Antioxidační preparát „Antioxidant 21“ a jeho složení



Příloha č. 4 Antioxidační doplněk stravy „Antioxidační komplex“ a jeho složení