

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Adéla Kešnerová

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví (B5345)

Adéla Kešnerová

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví (B0914P360004)

**LAKTÁTDEHYDROGENÁZA JAKO MARKER INTEGRITY
BUNĚČNÉ MEMBRÁNY**

Bakalářská práce

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

Plzeň 2024

Místo tohoto listu bude vloženo zadání bakalářské práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 31. 3. 2024.

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Kešnerová Adéla

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Laktátdehydrogenáza jako marker integrity buněčné membrány

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

Počet stran – číslované: 38

Počet stran – nečíslované: 16

Počet příloh: 0

Počet titulů použité literatury: 24

Klíčová slova: laktátdehydrogenáza, cytotoxicita, oxidační stres, flavonoidy, baicalein

Souhrn:

Oxidační stres je stav, kdy v těle převažují reaktivní kyslíkové radikály (ROS) nad schopností organismu je neutralizovat pomocí antioxidantů. Tento stav může být spojen s různými nemocemi a patologickými procesy. Změny životního stylu a stravovacích návyků mohou být klíčovými faktory při prevenci oxidačního stresu a ochraně zdraví.

V této bakalářské práci jsme se věnovali testování antioxidační schopnosti baicaleinu, hlavního flavonoidu v rostlině *Scutellaria Baicalensis*, na modelu lidských osteosarkomových buněk MG-63, u kterých jsme simulovali oxidační stres pomocí peroxidu vodíku.

Zjistili jsme, že čím je větší koncentrace peroxidu, tím je vyšší poškození buněk, a že použití baicaleinu snižuje poškození buněk při koncentraci peroxidu 10 mM a 1 mM. Koncentrace peroxidu 0,1 mM již buňky tolik nepoškozuje, ale projevuje se cytotoxicita baicaleinu. U samotného baicaleinu se oproti kontrole (pouze samotné buňky v kultivačním médiu) projevuje také určitá cytotoxicita.

Dále jsme při mikroskopickém zhodnocení vzhledu buněk zjistili, že nejpoškozenější buňky jsou ty, které byly ošetřeny peroxidem vodíku o koncentraci 10 mM bez přídavku i s přídavkem baicaleinu, a dále buňky ošetřené peroxidem vodíku o koncentraci 1 mM bez přídavku baicaleinu.

Abstract

Surname and name: Kešnerová Adéla

Department: Department of Paramedical Science, Medical Diagnostics Studies and Public Health

Title of thesis: Lactate dehydrogenase as a marker of cell membrane integrity

Consultant: doc. Ing. Václav Babuška, Ph.D.

Number of pages – numbered: 38

Number of pages – unnumbered: 16

Number of appendices: 0

Number of literature items used: 24

Keywords: lactate dehydrogenase, cytotoxicity, oxidative stress, flavonoids, baicalein

Summary:

Oxidative stress is a condition in which reactive oxygen species (ROS) in the body outnumber the organism's ability to neutralize them with antioxidants. This condition may be associated with various diseases and pathological processes. Lifestyle and dietary changes can be key factors in preventing oxidative stress and protecting health.

In this bachelor thesis, we focused on testing the antioxidant capacity of baicalein, the main flavonoid in the *Scutellaria Baicalensis* plant, on the model of human osteosarcoma cells MG-63, where we simulated oxidative stress using hydrogen peroxide.

We found that the higher the concentration of peroxide, the greater the cell damage, and that the use of baicalein reduces cell damage at concentrations of 10 mM and 1 mM peroxide. A peroxide concentration of 0.1 mM already damages cells less, but baicalein's cytotoxicity is evident. Baicalein itself also exhibits some cytotoxicity compared to the control (only the cells themselves in the culture medium).

Furthermore, upon microscopic evaluation of cell appearance, we found that the most damaged cells are those treated with 10 mM hydrogen peroxide without the addition of baicalein, as well as cells treated with 1 mM hydrogen peroxide without the addition of baicalein.

Předmluva

Pro téma této bakalářské práce jsem se rozhodla na základě mého velkého zájmu o biochemii. Společně se svým vedoucím práce jsem zvolila téma, které je pro mě velmi zajímavé, a to „Laktátdehydrogenáza jako marker integrity buněčné membrány“. Tato bakalářská práce je rozdělena na teoretickou a praktickou část. Hlavním cílem této práce bylo otestovat antioxidační schopnosti baicaleinu na modelu lidských osteosarkomových buněk MG-63, u kterých jsme simulovali oxidační stres. Naše výsledky by mohly být užitečné pro další výzkum biologických aktivit baicaleinu.

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala doc. Ing. Václavu Babuškovi, Ph.D za odborné vedení mé práce, poskytování cenných rad a materiálních podkladů. Dále děkuji Mgr. Janě Dvořákové, Ph.D. a Ing. Lucii Wiesnerové, Ph.D. za poskytování odborných rad, za věnovaný čas a za pomoc se zrealizováním a vypracováním praktické části.

Ráda bych také poděkovala své rodině a přátelům za velikou podporu po celou dobu psaní bakalářské práce.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ	11
SEZNAM OBRÁZKŮ	12
SEZNAM TABULEK	13
SEZNAM ZKRATEK	14
ÚVOD.....	15
TEORETICKÁ ČÁST	16
1 FYZIOLOGIE BUŇKY	16
1.1 Obecná stavba buněk	17
1.2 Extracelulární hmota.....	18
1.3 Cytoplazmatická membrána	19
1.3.1 Proteiny cytoplazmatické membrány	21
1.4 Transport látek přes membránu a jeho význam.....	22
1.4.1 Membránové kanály	23
1.4.2 Membránový potenciál	24
2 PATOFYZIOLOGIE BUŇKY	26
2.1 Buněčná smrt	26
2.1.1 Příčiny a mechanismy poškození buněk.....	27
3 LDH A JEJÍ UPLATNĚNÍ PŘI GLYKOLÝZE	28
3.1 Glykolýza.....	28
3.1.1 Aerobní glykolýza	29
3.1.2 Anaerobní glykolýza.....	29
3.2 Enzymy katalyzující reakce navazující na glykolýzu.....	30
3.2.1 Pyruvátdehydrogenáza.....	30
3.2.2 Laktátdehydrogenáza	30
3.2.3 Pyruvátkarboxyláza	31
3.3 Oxidační stres a patologické stavy, které způsobuje	31
3.3.1 Teorie volných radikálů.....	32
4 FLAVONOIDY	34
4.1 Baicalein	34
5 CÍL A ÚKOLY PRÁCE	38
5.1 Hlavní cíl	38
5.2 Dílčí cíle	38
6 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY	39
7 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	40
8 METODIKA PRÁCE	41
8.1 Použité chemikálie a kity.....	41

8.1.1	Baicalein, 98% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).....	41
8.1.2	Peroxid vodíku, 30% (Penta, Praha, ČR)	41
8.1.3	CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA)	41
8.1.4	Buněčná kultura	42
8.2	Určení optimálního počtu buněk pro test LDH cytotoxicity	43
8.3	Sledování antioxidačních schopností baicaleinu u buněk ošetřených peroxidem vodíku	44
8.4	Morfologie buněk po ošetření baicaleinem a peroxidem	45
8.5	Statistické zpracování	45
9	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	46
9.1	Určení optimálního počtu buněk pro test LDH cytotoxicity	46
9.2	Sledování antioxidačních schopností baicaleinu u buněk ošetřených peroxidem vodíku	46
9.3	Morfologie buněk po ošetření baicaleinem a peroxidem vodíku	47
	DISKUZE	50
	ZÁVĚR	52
10	CITOVANÁ LITERATURA	53

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Určení optimálního počtu buněk pro test LDH cytotoxicity.....	46
Graf 2: Aktivita LDH naměřená ve vzorcích	46

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Anatomie lidské buňky	18
Obrázek 2: Struktura cytoplazmatické membrány	20
Obrázek 3: Transport látek přes membránu	23
Obrázek 4: <i>Scutellaria baicalensis</i>	36
Obrázek 5: Chemická struktura baicaleinu.....	37
Obrázek 6: CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay Kit.....	41
Obrázek 7: Schéma mechanismu CyQUANT™ LDH Cytotoxicity.....	42
Obrázek 8: Buňky MG-63 na kultivační lahvi	43
Obrázek 9: Morfologie buněk po ošetření baicaleinem a peroxidem.....	48

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Varianty vzorků.....	44
---------------------------------	----

SEZNAM ZKRATEK

ATP.....	Adenosintrifosfát
ADP	Adenosindifosfát
AMP.....	Adenosinmonofosfát
NAD ⁺ , NADH.....	Nikotinamidadenindinukleotid
LDH	Laktátdehydrogenáza
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
ROS.....	Reaktivní kyslíkové radikály

ÚVOD

Tato bakalářská práce je zaměřena na téma „Laktátdehydrogenáza jako marker integrity buněčné membrány“. LDH se nachází prakticky v každé buňce lidského těla. LDH je cytoplazmatický enzym, který katalyzuje poslední krok anaerobní glykolýzy a pomáhá udržovat rovnováhu mezi energetickými potřebami a dodávkou energie v buňkách. Umožňuje tak buňkám přežít a udržovat produkci energie v podmínkách, kdy není k dispozici dostatek kyslíku pro aerobní oxidaci pyruvátu. Při buněčné smrti dochází k uvolnění LDH z buněk, jak při apoptóze, tak při nekróze. Laboratorní stanovení LDH v séru proto slouží jako obecný indikátor poškození buněk.

Cytotoxicita měřená pomocí enzymu LDH je často používanou metodou pro určení úrovně buněčného poškození a buněčné smrti v experimentech *in vitro*. Tohoto měření jsme využili při plnění hlavního cíle této bakalářské práce, kterým bylo otestovat antioxidační schopnosti baicaleinu na modelu lidských osteosarkomových buněk MG-63, u kterých jsme simulovali oxidační stres pomocí různých koncentrací peroxidu vodíku.

TEORETICKÁ ČÁST

Na začátku teoretické části je popsána fyziologie buňky se zaměřením na cytoplazmatickou membránu. Následuje část o patofyziologii buňky a buněčné smrti. V další části práce je popsána úloha laktátdehydrogenázy při glykolýze, co je to oxidační stres a jaké nemoci způsobuje. Závěrečná kapitola teoretické části je věnována antioxidačním schopnostem flavonoidů a baicaleinu.

1 FYZIOLOGIE BUŇKY

Buněčná teorie se v 19. století (T. Schwann, J. E. Purkyně) stala důležitou představou pro chápání života na zemi. Buněčná teorie vychází z představy, že veškerý život je založen na existenci buněk a na jejich funkcích. *Buňku lze definovat jako nejmenší jednotku živého organismu schopnou samostatné existence.* V dnešní době můžeme diskutovat o nebuněčných formách života, ale některá část jejich životního cyklu (např. u virů) je nakonec po každé vztažena k buňkám. Buňka, jakožto základní strukturální a funkční jednotka, dokáže přijímat potřebné živiny z okolního prostředí, odvádět odpadní látky svého metabolismu, reagovat na vnější i vnitřní vlivy, a tak udržovat svou strukturu i specifické funkce. Buněčný život je časově omezený, jako u každého živého organismu. Nová buňka vzniká prostřednictvím buněčného dělení a zaniká při dalším dělení, nebo také smrtí. Délka života jednotlivých buněk se od sebe velmi odlišuje. (1; 2)

Mnohobuněčné organismy jsou složeny z vody, buněk a jejich produktů. Buňky se v něm nachází ve skupinách, které se v průběhu evoluce specializovaly na určitou funkci. Přítomnost organel v jednotlivých skupinách buněk se tak liší dle funkce. Lidské tělo obsahuje přibližně 75×10^{18} somatických buněk. Jsou proti okolí ohraničeny bariérami, které od sebe oddělují vnitřní a vnější prostředí buňky. Bariéry dále rozčleňují vnitřní prostředí na jednotlivé prostory. Pojem „bariéra“ v této souvislosti může označovat jak cévní stěnu, tak i povrchovou membránu buňky nebo jejího jádra. Dalšími příklady mohou být běžně známé pojmy jako hematoencefalická nebo placentární bariéra, které také označují prostory, které jsou jak morfologicky, tak i funkčně odděleny od ostatních prostor těla. (1; 2; 3; 4)

Ve většině prostorů se zpravidla objevují další podprostory. Příkladem může být právě buňka, v níž jsou samostatnými oddělenými prostory např. mitochondrie nebo endoplazmatické retikulum. Z pohledu buněčné teorie je nejjednodušší rozdělovat tělesný prostor na extracelulární a intracelulární. Oba tyto prostory jsou vyplněny vodnými roztoky anorganických a organických látek. Prostor mezi buňkami je vyplněn specifickými

makromolekulami, které jsou označovány jako matrix. Pojem „matrix“ je však využíván i pro jiné gelovité struktury, jako je např. mitochondriální matrix. Tato hmota je velmi důležitá jak pro funkci buněk, tak i pro funkci celých tkání. Mezi prostory se často objevují elektrochemické gradienty (rozdíly koncentrací a nábojů látek). Prosazují se i další rozdíly, jako např. v teplotě, hydrostatických a osmotických tlacích, pH apod. Přesuny látek podél těchto gradientů jsou významnými životními pochody, stejně jako děje, které gradienty zachovávají. Vnitřní prostředí je tudíž i přes svou dynamiku konstantní. Stálost vnitřního prostředí těla, a tudíž i zevního prostředí jeho buněk se nazývá homeostáza. V rozšířeném slova smyslu homeostáza může znamenat i zachování existence organismu. (1; 3)

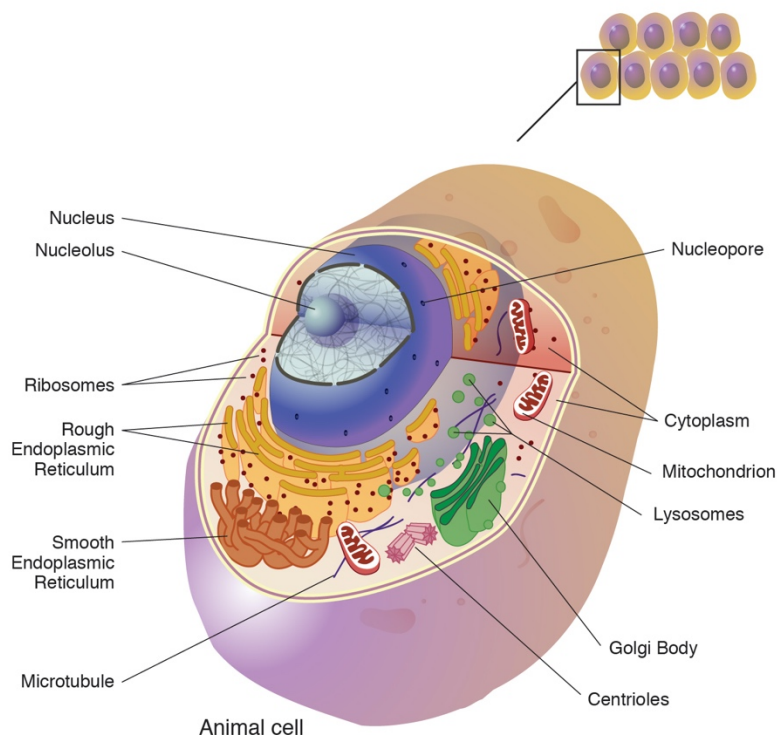
1.1 Obecná stavba buněk

Obecná stavba buněk různých tkání a funkce jejich součástí jsou si navzájem podobné. Na povrchu buňky se nachází membrána ze dvou vrstev fosfolipidů. Jsou v ní obsaženy i další molekuly, jako je cholesterol a bílkoviny. Tato membrána se označuje také jako buněčná membrána, plazmatická membrána, plazmalema, nebo povrchová membrána. Prostor, který takto vzniká, označujeme jako nitrobuněčný prostor. V něm se nachází cytoplazma, v níž jsou buněčné organely, které zajišťují velkou část základních funkcí buňky. Tekutá část cytoplazmy se nazývá cytosol. Jedná se o směs látek, které jsou rozpuštěny ve vodě, a probíhá zde významné množství chemických reakcí. V intracelulárním prostoru se také nachází cytoskelet. Jde o systém mikrovláken a mikrotubulů, které napomáhají udržování tvaru buňky. (1; 3; 2)

Mezi buněčné organely řadíme jádro (genetická informace, buněčné dělení), jadérko (součást jádra, chromatin), centrioly (v blízkosti jádra, buněčné dělení), ribozomy (syntéza aminokyselin), endoplazmatické retikulum (metabolické děje, syntéza proteinů), Golgiho aparát (syntéza polysacharidů a glykoproteinů), lysozomy (likvidační organely), peroxizomy (oxidativní reakce, redukce H_2O_2) a mitochondrie (tvorba ATP, glykolýza, citrátový cyklus). Kolem organel se většinou nachází membrána, která je podobná membráně, jaká je na povrchu buněk. Buněčné organely tak můžeme rozdělovat na membranózní (s membránou) a nonmembranózní (bez membrány). Povrchové i nitrobuněčné membrány jsou významné nejen jako ohraničení různých struktur, ale obstarávají i mnohé buněčné funkce. Tyto funkce jsou založeny hlavně na vlastnostech bílkovin, které jsou v membránách přítomny. (1; 3; 2)

Spoustu vlastností buněčného povrchu, ale i vlastních buněčných funkcí, je založeno na proteinech zasahujících z povrchové membrány do extracelulárního prostředí. Tyto proteiny jsou často propojeny s polysacharidy a jsou označovány jako glykokalyx. Glykokalyx

se také podílí na připevnění k dalším buňkám. Je totiž součástí extracelulární matrix, která je s cytoplazmatickou membránou propojena buněčnými adhezními molekulami. Tato spojení jsou významná pro funkce buněk jako součástí tkání. Integrita tkání také závisí na propojení pomocí adhezních molekul, a to jak ve formě buňka : extracelulární matrix, tak i buňka : buňka. (1)



Obrázek 1: Anatomie lidské buňky, převzato z (5)

1.2 Extracelulární hmota

Až na několik výjimek jsou buňky obklopeny extracelulární tekutinou. Tato tekutina má odlišné složení než intracelulární tekutina. Nejedná se jen o prostou mechanickou oporu tvořenou vzájemným propojením buněk, ale společně s glykokalyxem tvoří i biochemickou bariéru okolo buňky. U živočichů převažuje část matrix, která je tvořena vlákny. Tato vlákna tvoří i bazální membrány, které jsou zásadní pro epitely. Správná funkce bazálních membrán zajišťuje difúzní a filtrační děje, a správnou regeneraci. Matrix představuje jakýsi zásobní mechanismus pro importy a exporty z buňky a do buňky. Je také prostředím, kterým prochází chemická signalizace. Existují i informace, že molekuly sacharidů v extracelulární matrix mohou mít důležitou úlohu v biologii nádorů (1; 3)

Extracelulární hmota mimo vody obsahuje hlavně bílkoviny a polysacharidy, glykoproteiny (např. fibronectin, laminin a trombospondin) a vysoce viskózní proteoglykany. Také jsou v ní rozpuštěny elektrolyty a nízkomolekulární organické látky, jako je např. močovina nebo glukóza. Uvnitř matrix se také nachází různé typy strukturních a nerozpustných vláken kolagenu a také ohebná a pružná vlákna elastinu. Prakticky všechny buňky jsou schopny produkovat mezibuněčnou hmotu. (1; 3)

Extracelulární matrix rovněž funguje jako vodič při přemísťování buněk během vývoje a při hojení ran. Zajišťuje hydraulickou ochranu mnoha typů buněk, pevnost v tahu (šlachy), v tlaku (chrupavky) a také elasticitu cévních stěn. Matrix může být v některých případech fyziologicky kalcifikována (kosti, zuby; existují však i patologické kalcifikace). K extracelulární hmotě patří sama organická mezibuněčná hmota, bazální membrány epitelii a do jisté míry i glykokalyx. (1)

1.3 Cytoplazmatická membrána

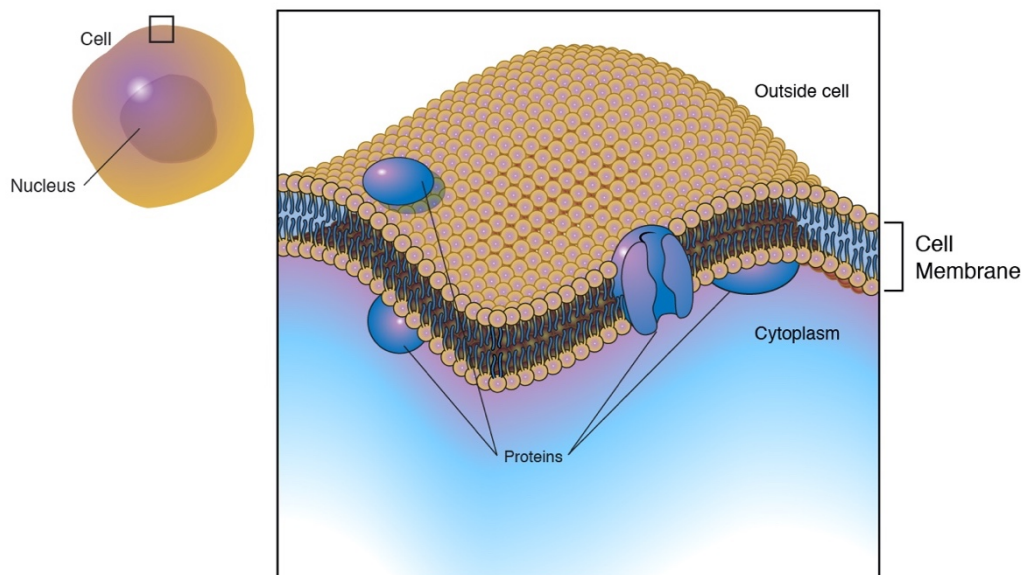
Cytoplazmatická membrána je struktura, která odděluje buňku od zevního prostředí. Je jednou z nejdůležitějších buněčných organel jak z funkčního, tak i morfologického hlediska. Ohraničuje tělo buňky a chrání ji před vnějšími vlivy. Aktivně se podílí na buněčném metabolismu, regulaci poměrů mezi intracelulárním a extracelulárním prostředím a také přispívá k morfologické stabilitě buňky. Je semipermeabilní (polopropustná) a její propustnost závisí na hodnotě membránového potenciálu. (2)

Cytoplazmatická membrána je složena z dvojvrstvy fosfolipidů, která je dotovaná proteiny (mnohdy jsou spojeny s cukry – glykoproteiny) a cholesterolem, a je široká 7-10 nm. Fosfolipidy jsou molekuly, jejichž jeden konec je rozpustný ve vodě (hydrofilní – fosfátový) a druhý v lipidech (hydrofobní – zbytek mastné kyseliny). Vrstvy fosfolipidů jsou orientovány tak, že části molekul rozpustné v tucích leží proti sobě. To je z fyzikálního hlediska příznivé, protože taková struktura má nejnižší volnou energii. Membrána je tak z obou vnějších stran hydrofilní, což je výhodné, protože membrány oddělují dvě vodná prostředí – např. nitrobuněčnou a mimobuněčnou tekutinu. Pokud se integrita membrány poruší, membrána má pak tendenci se rychle uzavřít, protože kontakt s vodou je pro hydrofobní část energeticky nevýhodný. (1; 2; 3)

Membrána není strukturou rigidní, je naopak vysoce dynamická. Dynamitu membrány určují proteiny, glykoproteiny a cholesterol v ní obsažený. Molekuly uložené ve vnitřní i povrchové vrstvě i transmembránově mohou v rovině membrány měnit své umístění. Přesuny molekul, především fosfolipidů, mezi vnitřní a vnější vrstvou (flip-flop) jsou

vzácné. Jedná se o fluidně-mozaikový model membrány. Součástí povrchové membrány, především proteinové, bývají spojeny s bílkovinami, které je ukotvují do vnitřního prostředí na vláknité bílkovinné struktury cytoskeletu. Tyto bílkoviny se též mohou napojovat na extracelulární matrix nebo povrchové součásti sousedních buněk, což zajišťuje funkční asymetrii různých míst povrchu buňky. Buňky jsou polární, což je charakteristické pro epitel, kde se liší funkce membrány obrácené do lumen od funkce membrány obrácené do tkáně, což je extrémně důležité pro jejich funkci (např. trávicí trakt, ledviny, játra, žlázy se zevní sekrecí apod.). (1; 3)

Cytoplazmatická membrána vykonává pro buňku mnoho významných funkcí, především transportních. Pomocí povrchových receptorů dokáže přijímat signály z okolí (antigeny, hormony, neurotransmitery atd.). Zajišťuje také integritu vnitřního prostředí buňky. Některé glykoproteiny přítomné na vnějším povrchu membrány vytvářejí kolem buňky širší vrstvu – glykokalyx, který disociuje jako anionty, a povrch glykokalyxu je tak záporně nabit. To však nic nemění na tom, že sama buněčná membrána je polarizována tak, že na jejím povrchu je kladný náboj. Záporný náboj glykokalyxu zajišťuje odpuzování buněk od sebe, což je důležité např. pro suspenzní stabilitu krve, která umožňuje normální sedimentaci erytrocytů. Když se tento náboj sníží, sedimentace se zrychluje. Děje se tak např. při vzestupu hladin imunoglobulinů v souvislosti s infekčním onemocněním. (1; 2)



Obrázek 2: Struktura cytoplazmatické membrány, převzato z (6)

1.3.1 Proteiny cytoplazmatické membrány

Proteiny obecně tvoří 55% hmotnosti cytoplazmatické membrány a podobně je možné uvádět i zastoupení dalších komponent. Zastoupení jednotlivých složek a molekul se však liší podle typu buněk a jejich funkcí. Dokonce bývají i rozdíly mezi fosfolipidy obsaženými ve vnější a vnitřní vrstvě. Funkce proteinů je velmi rozmanitá, tvoří buněčné receptory, transportní a iontové kanály, a také sídla enzymů potřebných pro aktivní transport. Integrální proteiny pronikají lipidovou dvojvrstvou, mnohdy i opakovaně, zatímco periferní proteiny jsou vždy na jedné straně membrány. (1; 2; 3)

Některé látky jsou přenášeny aktivně, za přímé spotřeby chemické energie většinou uložené v makroergních (vysoce energetických) vazbách. Je to především sloučenina adenosintrifosfát (ATP). Energie bývá často spotřebována na fosforylaci. Ta probíhá tak, že se fosfát naváže na příslušnou molekulu proteinu a vznikne tak adenosindifosfát (ADP). Mění se tím charakteristiky proteinu, které jsou spojeny s transportováním iontů z jedné strany na druhou proti gradientům. Tyto proteiny se označují jako iontová pumpa. Složitější molekuly jsou přenášeny jinými typy integrálních proteinů. Transportéry a pumpy jsou si blízké spíše nomenklaturně (H^+ pumpy mohou katalyzovat i reverzní reakci $ADP + P_i \rightarrow ATP$; závisí to na gradientu transportované látky). Procesy, které transportují elektrony, jsou největšími producenty ATP. (1)

Dalšími důležitými proteiny povrchové membrány jsou receptory. Jsou to integrální proteiny, které se vyskytují i v cytoplazmě, jádře a v membránách organel. Receptory jsou struktury, které mění svou konformaci a ovlivňují intracelulární děje poté, co se na ně naváže určitý mediátor. Povrchové receptory se z hlediska funkce dělí na dvě skupiny – ionotropní a metabotropní. Ionotropní receptory po připojení signální molekuly (ligandu) ze zevního prostředí přímo otevírají nějaký iontový kanál. Metabotropní receptory po aktivaci spouští metabolické děje, jako např. přímou aktivaci nitrobuněčných enzymatických kaskád, nebo aktivují G-proteiny, a tak z nich uvolní alfa-podjednotku, která spouští další membránové děje, jako např. ovládní iontových kanálů nebo aktivaci enzymů. Receptory se podílejí i na přesunu větších molekul do buněk. Jedná se o receptorově aktivovanou endocytózu (např. inzulin a některé další hormony, lipoproteiny atd.). Mezi povrchové receptory patří také „toll like“ receptory, které v imunitním systému rozeznávají cizorodé molekuly, a také integriny, což jsou receptory, které umožňují vazbu na mezibuněčnou hmotu a sousední buňky. Tyto receptory jsou významné v embryogenezi a v imunitních dějích a do nitra buněk přenášejí také důležité signály pro jiné buněčné procesy, jako např. procesy spojené se zánětem. (1; 3)

Extracelulární prostředí je stálým zdrojem ligandů (specifických molekul), které jsou schopny aktivovat povrchové receptory. Pokud se množství těchto signálů z nějakých důvodů zvýší či sníží, pak buňka pro udržení stálosti signálu (homeostázy) reaguje snížením či zvýšením počtu receptorů, takže se zvýší (syntetizace) či sníží (desyntetizace) počet aktivovaných receptorů na předpokládanou úroveň. Většina buněk reaguje podobně. (1)

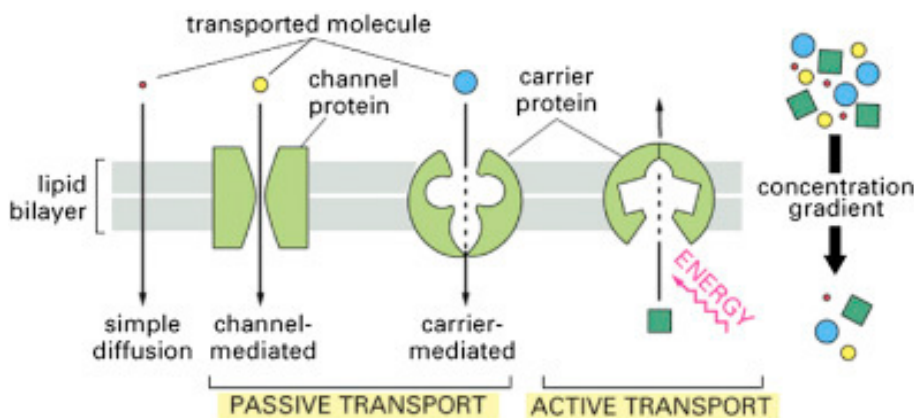
1.4 Transport látek přes membránu a jeho význam

Membrány představují bariéru mezi dvěma kapalnými prostředími, ale jejich rozhodující vlastností je prostupnost pro různé látky. Mimo informací, které se přes membránu dostávají pomocí receptorů, mohou být přes membránu (dovnitř i ven) také přenášeny různé substance. Při klasifikaci transmembránového transportu rozlišujeme tyto základní transportní mechanismy: prostá difuze, usnadněná difuze, transport přes iontové kanály, aktivní a spřažený transport, endocytóza a exocytóza. Sama fosfolipidová dvojvrstva je propustná pro látky rozpustné v tucích a neprostupná pro vodu. Volně procházejí i kyslík a oxid uhlíčitý, které jsou fyzikálně rozpuštěny ve vodě. Voda a ostatní látky potřebují pro přestup různé s membránou asociované proteiny nebo bílkoviny membrány jako transportéry, pumpy či kanály. Pomocí nich se látky mohou pohybovat z jednoho prostředí do druhého, nejčastěji na základě elektrochemických gradientů, tedy rozdílu nábojů nebo koncentrací na obou stranách membrány. Přenos látek, který probíhá po koncentračním gradientu, se označuje jako pasivní transport a nespotřebovává se při něm energie. Přenos látek, který probíhá proti koncentračnímu gradientu, se označuje jako aktivní transport a energie se při něm spotřebovává. (1; 3; 2)

Endocytóza je vedle prosté difuze a aktivního transportu další způsob přenosu látek z extracelulárního do intracelulárního prostoru. Dělí se na dva typy – pinocytóza a fagocytóza. Pinocytóza je vtahování nejdrobnějších částic společně s extracelulární tekutinou a částí povrchové membrány do buňky, v které tak vznikají váčky kryté membránou. Tímto způsobem se do buňky dostávají např. tukové kapénky. Pinocytóza je velmi častá téměř u všech buněk a je založena na receptorově indukované endocytóze. Aktivace receptoru je schopná měnit funkce bílkovin spojených s proteiny na vnitřní straně cytoplazmatické membrány. Tyto proteiny pak vtáhnou membránu s receptorem a ligandem s částí extracelulární tekutiny dovnitř buňky a vedou je k dalšímu zpracování. Tento celý proces vyžaduje energii. Při fagocytóze se do buněk dostávají naopak celé částice, jako jsou bakterie, buňky nebo jejich části (např. zanikající erytrocyty), nebo také části degradovaných tkání. Základní

mechanismy jsou dost podobné jako u pinocytózy, ale schopnost fagocytovat mají jen některé buňky. (1; 3)

Dalším způsobem přenosu látek přes membránu je exocytóza. Takto se transportují látky směrem do extracelulárního prostředí. Golgiho aparát tvoří z buněčných produktů, hlavně z endoplazmatického retikula, váčky. Po tom, co přijmou určitý signál, se posunují k povrchové membráně. Pak se membrána váčku, která je tvořena dvojrůstvou fosfolipidů, spojí s povrchovou membránou, která se následně v místě spojení rozdělí. Obsah váčku se poté vylíje do zevního prostředí a membrána váčku se stane součástí povrchové membrány. Podobně se vkládají do povrchové membrány také části váčků, které ve své membráně obsahují nově vytvořené receptory a další proteiny. Zvětšení povrchu buňky při exocytóze je kompenzováno endocytózou, která umožňuje, že se mohou zpět do buňky dostávat také poškozené receptory a další membránové proteiny. (1; 3)



Obrázek 3: Transport látek přes membránu, převzato z (7)

1.4.1 Membránové kanály

Iontové kanály tvoří speciální integrální membránové proteiny, které jednou nebo i vícekrát procházejí fosfolipidovou dvojrůstvou cytoplazmatické membrány a umožňují průchod iontů přes membránu. Takto přes membránu procházejí hlavně anorganické ionty, jako jsou Na^+ , K^+ , Cl^- , a voda. Ionty totiž s ohledem na svůj náboj nemohou volně procházet skrz lipidickou dvojrůstvu membrány. Iontové kanály jsou selektivně permeabilní, což závisí na rozměru průchodu pro ionty nebo nábojích vnitřního povrchu – iontové pasti. Vlastní přenos se odehrává formou zjednodušené difuze a přímo nespotřebovává energii. (1; 3; 2)

Kanály mohou být podle mechanismu vrátkování (uzavírání a otevírání) rozdělovány na následující typy: napětově řízené (spouštěcím podnětem je vlna šířící se depolarizace), chemicky řízené (iniciátorem je navázání ligandu nebo působení G proteinu), mechanicky

řízené (spouštěcím impulsem je změna napětí cytoskeletu), teplem řízené (spouštěcím podnětem je teplo či chlad), pH řízené (iniciátorem je zvýšení extracelulární koncentrace H^+) a stále otevřené kanály. Stále otevřené kanály jsou zvláštním druhem kanálů, které v menších množstvích propouštějí ionty. Ve skutečnosti však ani tyto kanály nejsou stále otevřeny, oscilují s vysokou frekvencí mezi stavy otevřeno a uzavřeno, protože jejich konformace je tak nestabilní, že neustále mění svůj tvar. Tyto kanály se mohou dále dělit podle jejich selektivity k jednotlivým iontům. (1; 3)

Iontové kanály bývají tedy buď otevřené, nebo uzavřené. Protože jimi procházejí ionty – nabitě částice, jde o transmembránový iontový proud. Přesuny nabitých částic hyperpolarizují nebo depolarizují povrchovou membránu. Když je na jedné straně membrány náboj změněn, na opačné straně se změní na stejnou velikost, ale s opačným znaménkem. Tyto změny jsou označovány jako kapacitní proud. Membrána je elektricky nevodivá a funguje jako kondenzátor. (1)

Kanály pro přestup vody tvoří několik typů specifických proteinů, které se nazývají akvaporiny. Mají velmi malý průměr (0,2 nm) a propouštějí selektivně pouze vodu. Pokud voda prostupuje přes tyto kanály, prostupuje tak rychleji, než pokud prostupuje volnou difuzí. Různé akvaporiny tvoří v různých tkáních vodní kanály s odlišnými vlastnostmi. Vyskytují se např. na konci distálních tubulů v ledvinách. (1; 3; 2)

1.4.2 Membránový potenciál

Cytoplazmatická membrána je semipermeabilní. Anorganické ionty jsou nerovnoměrně rozptýleny mezi intracelulárním a extracelulárním prostředím. Proto u všech buněk existuje mezi vnitřní a zevní membránou rozdíl napětí. Tento rozdíl se nazývá membránový potenciál. Někdy se také označuje jako klidový potenciál, protože je měřen v klidu, aniž by na buňku působil nějaký podnět. Podstata membránového potenciálu je založena na vlastnostech membrány. Nabitě částice mohou přes membránu prostupovat jen pomocí iontových kanálů. Aby kanálem nabitě částice mohly procházet, musí být kanál otevřený a otvor v něm musí být dostatečně veliký. Membránový potenciál můžeme chápat jako výsledek rovnováhy, která se vytvoří na základě elektrického a koncentračního gradientu jednotlivých iontů. V intracelulárním prostředí je významné množství bílkovin, které nesou záporný náboj a nemohou procházet skrz membránu. Poté jsou kationty elektricky nuceny k transportu do nitra buňky, anionty jsou naopak intracelulárním prostředím odpuzovány. Transport do nitra buňky je prakticky možný jen pro K^+ ionty. Ionty Na^+ vzhledem k velikosti svého hydratačního obalu procházet „stále otevřenými“ iontovými kanály nemohou. Koncentrační gradient

naopak žene K^+ z nitra ven z buňky. Na^+ je aktivně čerpán ven a K^+ dovnitř buňky pomocí Na/K-ATPázy, což elektronegativitu membrány teoreticky zvyšuje. Konečný klidový potenciál tak můžeme chápat jako výsledek souhlasného či protichůdného působení výše uvedených sil. (3; 1)

2 PATOFYZIOLOGIE BUŇKY

V polovině 19. století byl pojem „nemoc“ poprvé pojat jako porucha fyziologických procesů buňky (Rudolf Virchow). Buňka by měla splňovat základní funkce organismu, jako je látková výměna, pohyb, růst, rozmnožování a dědičnost. Když vnitřní prostředí přestává plnit životní potřeby buněk, jde o negativní podnět, na který buňka reaguje prostřednictvím adaptivní odpovědi. Jedná se buď o zmenšení buněk nebo snížení jejich počtu – atrofii, nebo zvětšení buněk – hypertrofii, či zvýšení počtu buněk – hyperplazii. Hypertrofie spolu s hyperplazií jsou většinou spojeny s většími nároky na tkáň. Je nutné je rozlišovat například proto, že hypertrofie prodlužuje difuzní dráhu pro živiny a kyslík do centrálních částí buněk. Patologickým signálem z extracelulárního prostředí může být omezení přísunu kyslíku a živin, nebo také změny důležitých podnětů i poruchy odvádění produktů buněčného metabolismu. (1; 8)

2.1 Buněčná smrt

Závažnější poškození buňky, většinou ze zevních příčin, může být vratné – reverzibilní, nebo nevratné – ireverzibilní. Pokud je poškození ireverzibilní, nastává buněčná smrt. K buněčné smrti může buňka dospět nekrózou, apoptózou nebo autofagií. (1)

Nekróza je definována jako intravitální odúmrtí tkáně. Je způsobena poškozením, které zapříčiní rychlý zánik buněk. Příčiny vzniku nekrózy mohou být fyzikální, chemické, ischemické či hypoxické, imunitní a infekční. Nejvýznamnější příčinou nekrózy je náhlý nedostatek energetických zdrojů, po kterém následuje porucha aktivních transportů, především iontů, přes membrány. Příkladem může být nedostatečná tvorba ATP při ischemii. To zapříčiní edém buněk a jejich organel (mitochondrie, endoplazmatické retikulum). Potom jsou nekoordinovaně aktivovány různé intracelulární enzymy – hydrolázy, fosfolipázy, proteázy, RNázy a DNázy. Nekoordinovaně aktivovány jsou také RNA, DNA a buněčné membrány. To urychluje rozrušení celistvosti (dezintegraci) buňky i jádra. Intracelulární edém a rozklad látek ve vnitřním prostředí způsobuje navíc i morfologické poškození membrán. Takovému poškození následuje smísení obsahů jednotlivých kompartmentů. Nakonec buněčný obsah vytéká ven, kde vyvolá zánět okolní tkáně se všemi doprovodnými jevy včetně oxidativních atak (NO) aktivovaných makrofágů. (1; 3)

Apoptóza je programovaná smrt buněk, smrt sebezničením. Nastává tehdy, pokud už buňka překročila limit své existence a mohla by se stát hrozbou pro organismus. Zahájení apoptózy je charakterizováno smrštěním buněk, které je spojeno se vznikem vakovitých výběžků povrchové membrány. Objevuje se také porucha mitochondrií, z kterých se uvolňuje

cytochrom C, degraduje chromatin a dochází k rozpadu DNA (deoxyribonukleové kyseliny). Nakonec se oddělují apoptosomy – malé, membránou kryté částice. Apoptóza se od nekrózy liší tím, že dochází k šetrnému odstranění zbytků odumřelé buňky, aniž by probíhal zánětlivý proces. (1; 3)

2.1.1 Příčiny a mechanismy poškození buněk

Mezi hlavní příčiny poškození buněk patří hypoxie, ischemie, chemické látky, léky, mikroorganismy, imunitní reakce, genetické vady, nutriční nerovnováha a fyzikální příčiny. Při poškození buněk se uplatňují některé společné a některé specifické mechanismy. Patří mezi ně tvorba reaktivních kyslíkových radikálů, které se ve větších množstvích objevují při ozáření, zánětu, působení chemických látek nebo reperfuzi – obnově oběhu po ischemii. (1) Poškození volnými radikály je popsáno v kapitole 3.3.

3 LDH A JEJÍ UPLATNĚNÍ PŘI GLYKOLÝZE

3.1 Glykolýza

Glykolýza je jedním z hlavních kroků nezbytných pro tvorbu ATP a syntézu triacylglycerolů. Glykolýzu tak můžeme považovat za řadu reakcí amfibolického charakteru, u kterých teprve konkrétní situace rozhodne, jestli bude součástí reakcí katabolické (tvorba ATP), či anabolické (tvorba lipidů) povahy. K aktivaci glykolýzy jako součásti anabolických reakcí, při kterých je glukóza zužitkovávána pro syntézu triacylglycerolů v tukové tkáni a v játrech, dochází po příjmu potravy. Příkladem aktivace glykolýzy jako součásti katabolických reakcí je fyzická zátěž, při které glykolýza představuje hlavní zdroj energie pro kosterní sval. Glykolýza je esenciálním zdrojem ATP pro erythrocyty a mozek. Probíhá v cytoplazmě prakticky každé buňky lidského organismu. (9; 10)

Glykolýza je sled reakcí přeměny glukózy přes řadu hexózafosfátů a triózafosfátů na pyruvát. Osud pyruvátu a také množství vytvořeného ATP závisí na tom, jestli glykolýza probíhá za aerobních či anaerobních podmínek. Za aerobních podmínek je většina pyruvátu přeměněna na acetyl-CoA, který pak vstupuje do reakcí citrátového cyklu. Za anaerobních podmínek je pyruvát přeměněn na laktát. (9)

Enzymy glykolýzy se nacházejí v cytoplazmě bez vazby na buněčné struktury, a proto jsou lehce přístupné účinku řady regulačních faktorů. Podstatný význam pro regulaci mají enzymy, které katalyzují nevratné (exergonní) reakce. (9; 10)

- Hexokináza – katalyzuje přeměnu glukózy na glukóza-6-fosfát, která je aktivována inzulínem a inhibována glukagonem. Alostericky ji inhibuje glukóza-6-fosfát. V játrech je exprimována hexokináza typu IV - glukokináza, na kterou evidentně nemá vliv koncentrace glukóza-6-fosfátu ani inzulin. Glukokináza je induktivní enzym, jehož aktivita se zvyšuje při příjmu vysokosacharidové stravy a katalyzuje tutéž reakci, jako hexokináza. (9; 11)
- Fosfofruktokináza – katalyzuje přeměnu fruktóza-6-P na fruktóza-1,6-P₂ a je zásadním enzymem celé glykolýzy. Je aktivována vzestupem koncentrace fruktóza-1,6-P₂, poklesem koncentrace citrátu a poměru ATP/ADP. (9)
- Pyruvátkináza – katalyzuje přeměnu fosfoenolpyruvátu na pyruvát. Reguluje ji inzulin (aktivace defosforylací) a glukagon (inhibice fosforylací) prostřednictvím proteinkinázy A. Pak je alostericky aktivována pomocí fruktóza-1,6-P₂ (aktivita pyruvátkinázy je vysoká, pokud probíhá glykolýza). V játrech ji inhibují ATP a alanin. Reakce pyruvátkinázy je zde nevratná ve směru syntézy ATP. (9; 11)

3.1.1 Aerobní glykolýza

Za aerobních podmínek vstupuje pyruvát cestou acetyl-CoA do citrátového cyklu za vzniku NADH a H^+ . NADH je v dýchacím řetězci mitochondrií základním substrátem při syntéze ATP. Pro tvorbu ATP se nepoužívá jen NADH, které vzniká v citrátovém cyklu, ale i NADH, které vzniká v cytoplazmě při oxidaci glycerinaldehyd-3-P, který se do mitochondriální matrix dostává pomocí malátového nebo glycerol-3-fosfátového člunku. (9; 10)

Aerobní glykolýza je důležitým zdrojem ATP pro řadu tkání a nezastupitelným zdrojem ATP pro nervovou soustavu. Celkový energetický výtěžek aerobní glykolýzy se rovná 38 molům ATP na jeden mol glukózy. (9)

Oxidace pyruvátu na acetyl-CoA je ireverzibilní, a protože lidské buňky nejsou schopny syntetizovat glukózu z acetyl-CoA, jde i o ztrátu části sacharidových rezerv. Proto je tato reakce velmi důkladně regulována pomocí pyruvátdehydrogenázy. Příznačně je aerobní oxidace glukózy inhibována v játrech při poklesu inzulinu, dále také při zvýšené tvorbě acetyl-CoA z mastných kyselin (hladovění, fyzická zátěž). Aerobní oxidace je naopak aktivována v pracujícím kosterním svalu (vzestup koncentrace Ca^{2+}). (9)

3.1.2 Anaerobní glykolýza

Za anaerobních podmínek se finální produkt glykolýzy, pyruvát, v reakci katalyzované laktátdehydrogenázou se spoluúčastí koenzymu NADH, přeměňuje na laktát. Při nedostatku kyslíku je oxidace NADH na NAD^+ snížena a hromadění NADH inhibuje přeměnu pyruvátu na acetyl-CoA. Záložní možností využití pyruvátu a regenerace NAD^+ je jeho přeměna na laktát. Takto vytvořený NAD^+ umožňuje plynulý průběh glykolýzy za anaerobních podmínek. Porušení anaerobiózy, tedy přístup kyslíku, glykolýzu brzdí, a to znamená, že se sníží spotřeba glukózy a produkce laktátu se zcela zastaví. Velké množství laktátu, který se vytvoří při glykolýze v buňkách pracujícího kosterního svalu, postupuje do cirkulace, a následně do jater a ledvin. V těchto orgánech se pak laktát prostřednictvím glukoneogeneze přeměňuje postupně až na glukóza-6-fosfát, který může být následně při energetickém dostatku vestavěn do molekuly glykogenu, a při energetickém nedostatku opět poskytne glukózu a doplní tím její nabídku v cirkulaci. Tento děj se označuje jako Coriho cyklus. (9; 10)

Čistý zisk anaerobní glykolýzy je však jen 2 moly ATP na 1 mol glukózy. 4 moly ATP se získají při přeměně 2 molů glycerinaldehyd-3-P na pyruvát, po 1 molu ATP se spotřebuje při fosforylaci glukózy na glukóza-6-P a fruktóza-6-P na fruktóza-1,6-P₂. NADH, které

se vytvoří při dehydrogenaci glycerinaldehyd-3-P je spotřebované při hydrogenaci laktátu a nemůže být využito pro tvorbu ATP v mitochondrii. (9)

Anaerobní glykolýza je typická pro červené krvinky, nádorovou tkáň a kosterní sval při fyzické zátěži. Laktát, který se vytvoří při anaerobní glykolýze, je uvolněn do krevního oběhu a zužitkován v řadě tkání. V myokardu je využit jako zdroj energie, v ledvinách a játrech může být využit pro opětovnou syntézu glukózy. Když nabídka laktátu přesáhne kapacitu organismu jej zužitkovat, stoupá jeho hladina v tělních tekutinách a vyvíjí se tak laktátová acidóza. (9)

3.2 Enzymy katalyzující reakce navazující na glykolýzu

3.2.1 Pyruvátdehydrogenáza

Pyruvátdehydrogenáza je součástí enzymového komplexu, který se nachází v mitochondriální matrix. Tento komplex je složený z mnoha proteinů a několika koenzymů. Katalyzuje nevratnou oxidační dekarboxylaci pyruvátu na acetyl-CoA, která představuje hlavní spoj mezi glykolýzou a citrátovým cyklem. Pyruvátdehydrogenáza existuje v inaktivní (fosforylované) a aktivní (defosforylované) formě. Poměr mezi nimi je regulován pomocí specifické fosfatázy (aktivace) a kinázy (inhibice). Fosfatázu aktivují inzulin, pyruvát, HS-CoA, NAD^+ , vzestup Ca^{2+} a pokles poměru $\text{ATP}/(\text{ADP}+\text{AMP})$. Kinázu aktivují acetyl-CoA, NADH, neesterifikované mastné kyseliny a vzestup poměru $\text{ATP}/(\text{ADP}+\text{AMP})$. (9; 11)

3.2.2 Laktátdehydrogenáza

Laktátdehydrogenáza katalyzuje důležitou reakci anaerobní glykolýzy, a tou je reverzibilní redukce pyruvátu na laktát. Jedná se o poslední reakci anaerobní glykolýzy. LDH se nachází prakticky ve všech tkáních. LDH k této redukci používá koenzym NADH, který se regeneruje na NAD^+ . Obnova NAD^+ umožňuje pokračování glykolýzy a generování ATP, a to i za anaerobních podmínek. (12; 11; 13)

LDH je obsažena v cytoplazmě buněk prakticky ve všech tkáních lidského organismu, především v játrech, ledvinách, srdečních a kosterních svalech, nádorových buňkách a v krevních elementech. Strukturou je LDH tetramer, který je tvořený podjednotkami dvou typů: H (heart) a M (muscle). Tkáně pracující převážně aerobně, např. srdce, obsahují více H podjednotek a preferují laktát jako substrát. Naopak tkáně s převážně anaerobním typem metabolismu, např. játra a kosterní svalstvo, obsahují více M podjednotek a upřednostňují jako substrát pyruvát. Izoenzymy LDH se značí jako LD1 - LD5, podle zastoupení podjednotek H a M. (12; 9; 13)

Elektroforéza umožňuje dokonalé rozlišení všech izoenzymů v krevním séru. V klinické praxi se však měří celková aktivita LDH pomocí enzymové metody se spektrofotometrickou detekcí, která je adaptována k provedení na automatických analyzátoch. Principem metody je reakce laktátu s NAD^+ katalyzovaná LDH. Fotometricky se detekuje nárůst koncentrace NADH při 340 nm. Hemolytické vzorky jsou nepoužitelné, vzhledem k vysoké aktivitě LDH v erytrocytech a ostatních krevních elementech. Zvýšená aktivita LDH v séru je obecným ukazatelem lýzy buněk a zvyšuje se při celé řadě onemocnění, není orgánově specifická. Biologický poločas se u různých izoenzymů liší, např. LD1 má poločas asi 3 dny, LD5 přibližně 10 hodin. Použití v diagnostice onemocnění jater, akutního infarktu myokardu nebo kosterních svalů a dalších onemocnění je již zastaralé. V kombinaci s nízkou až neměřitelnou koncentrací haptoglobinu může vysoká aktivita LDH sloužit jako dobrý marker intravaskulární hemolýzy. Měření LDH má však prognostický a klasifikační význam u mnoha maligních nádorů, u kterých je zvýšen zejména izoenzym LD5. Nádory si tak zajišťují produkci energie vyšší glykolytickou aktivitou i v anaerobních podmínkách. Nejčastěji se jedná o invazivní hypoxické nádory, které jsou rezistentní na chemoterapii a radioterapii – LDH je začleněna do prognostických skóre a stagingu u high-grade lymfomů, karcinomu ledvin, kolorektálního karcinomu, melanomu a u nádorů ze zárodečných buněk. U metastatického karcinomu prostaty pomáhá identifikovat pacienty, kteří jsou vhodní pro časnou chemoterapii. Vysoká aktivita LDH ve výpotku (např. pleurálním) vzbuzuje podezření na jeho maligní původ. (12; 13)

3.2.3 Pyruvátkarboxyláza

Pyruvátkarboxyláza je mitochondriální enzym, který katalyzuje karboxylaci pyruvátu na oxalacetát (součást citrátového cyklu). Obsahuje koenzym biotin, na kterém je pomocí ATP aktivován CO_2 , ten je dále předán jako karboxylová skupina na další substrát, kterým je v tomto případě pyruvát. Jeho aktivita vzrůstá při zvýšeném odčerpávání meziproductů citrátového cyklu (například při syntéze aminokyselin) a následném nedostatku oxalacetátu, který je důležitý pro vstup acetyl-CoA do citrátového cyklu. Je alostericky aktivován při vzestupu koncentrace acetyl-CoA v mitochondriální matrix. Také má významné postavení v regulaci glukoneogeneze. (9; 11)

3.3 Oxidační stres a patologické stavy, které způsobuje

Kyslíkové radikály a reaktivní částice kyslíku vznikají při využití kyslíku mitochondriemi při tvorbě ATP. Podílejí se na důležitých funkcích, jako je likvidace fagocytovaného materiálu v granulocytech, průnik spermie do vajíčka apod. Kyslíkové radikály

porušují různé makromolekuly obsažené v buněčné i extracelulární hmotě. Odhaduje se, že z 1 až 2% spotřebovaného kyslíku vzniká superoxid, což je kyslíkový radikál s jedním volným elektronem (O_2^-). Superoxid přechází na peroxid vodíku (H_2O_2), který je méně reaktivní. Tato dismutace je značně urychlována enzymem superoxiddismutázou, který se nachází prakticky ve všech buňkách. H_2O_2 se dále mění („detoxikuje“) na vodu a kyslík pomocí enzymů katalázy a glutathion-peroxidázy. (14; 4)

Kyslíkové radikály jsou vysoce reaktivní sloučeniny s krátkým biologickým poločasem a buňky mají antioxidační mechanismy, kterými lze tvorbu kyslíkových radikálů snížit. Rovnováha mezi vznikem a zánikem kyslíkových radikálů stanovuje jejich aktuální koncentraci. *Zvýšení jejich koncentrace je označováno jako oxidační stres.* Zvýšená spotřeba kyslíku mitochondriemi v důsledku nashromáždění ADP je významným zdrojem kyslíkových radikálů. Obzvláště při poškození mitochondrií při ischemii v nich dochází po obnovení přívodu kyslíku k tvorbě značného množství kyslíkových radikálů. Ty pak mohou být původcem sekundárního poškození tkáně, včetně její mikrocirkulace. Tato situace se označuje jako reperfuční poškození. (14; 4)

Radikály jsou jedním z patogenetických mechanismů škodlivých účinků kouření, nadměrného příjmu alkoholu, radiace, znečištěného prostředí a ionizujícího záření. Mechanismus účinku těchto radikálů spočívá v reakci s okolními molekulami a poškozením jejich funkce v buňce a organismu. Reaktivní radikály oxidují lipidy v cytoplazmatických membránách, proteiny, nebo nukleové kyseliny. U těchto molekul rozsáhlejší oxidace narušuje dědičné informace, strukturu a funkci buněk apod. K antioxidačním mechanismům se řadí enzymy superoxiddismutáza, glutathion-peroxidáza a kataláza, dále i jejich kofaktory, některé vitaminy a flavonoidy společně s dalšími látkami obsaženými v ovoci a zelenině, které volné radikály neutralizují. (4; 15)

3.3.1 Teorie volných radikálů

Předpokládá se, že oxidativní stres se podílí na vzniku takových onemocnění, jako je diabetes, ateroskleróza, nádorové bujení, šedý zákal, zánět, a neurodegenerativních onemocnění, kam řadíme např. Parkinsonovu chorobu, mrtvici, amyotrofickou laterální sklerózu a Alzheimerovu chorobu. Předpokládá se i působení volných radikálů na samotný proces stárnutí. Gliové buňky hrají hlavní roli v udržování funkcí neuronů v mozku a několik studií ukázalo, že akumulace reaktivních forem kyslíku v gliových buňkách vede k apoptóze a dysfunkci okolních neuronů. Proto činidla se schopností chránit gliové buňky před buněčnou

smrtí závislou na reaktivních formách kyslíku mohou mít potenciál k léčbě neurodegenerativních onemocnění. (4; 16)

4 FLAVONOIDY

Flavonoidy tvoří velmi početnou skupinu přírodních látek obsažených v různých částech vyšších rostlin, především v plodech, květech a listech. Jsou to barevné pigmenty rozpuštěné v buněčné šťávě. Mají často protizánětlivé působení a jsou schopny vázat reaktivní molekuly kyslíku. Mimo to také chrání rostlinu před napadením plísněmi a hmyzem. Jejich vysoká rozšířenost v rostlinné říši je známa rostlinným fyziologům a botanikům po dobu několika století. Objev jejich chemické identity se datuje do první poloviny 19. století. K vědeckému poznání jejich farmakologických účinků se však dospělo mnohem později, než ke znalosti funkce a významu v rostlinném organismu. To mělo své zajímavé a dramatické zvraty a svérázný vývoj, který doposud nebyl ukončen. V 90. letech minulého století byl zájem o flavonoidy znovu obnoven ve spojitosti s rozšířením hypotézy oxidačního stresu, oxidačního poškození lidského organismu vedoucího ke vzniku a rozvoji závažných a velmi rozšířených nemocí a antioxidační ochrany zprostředkované enzymovými systémy, endogenními antioxidačními sloučeninami i exogenními antioxidanty získanými z potravin. Flavonoidy, obzvláště ty, co mají charakteristické strukturní znaky (flavony, flavonoly, substituované hydroxylovými skupinami), byly mnohokrát aplikovány v pokusech se zvířaty, v klinických studiích a v intervenčních epidemiologických projektech se záměrem prověřit jejich předpokládanou biologickou aktivitu a schopnost příznivě ovlivňovat zdravotní stav. (17; 18)

Efekt těchto látek na zdraví byl spontánně využíván po staletí v podobě bylinných čajů a dalšími praktikami lidového léčitelství. Flavonoidy jsou z přírodních sloučenin nejrozšířenější, nejpočetnější a vyskytují se ve všech rostlinách, tudíž hrají mezi účinnými látkami významnou roli. (17)

4.1 Baicalein

Baicalein je jedním z hlavních flavonoidů obsažených v šišáku bajkalském (*Scutellaria baicalensis*). Šišák bajkalský je vytrvalá bylina z čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*). Je mrazuvzdorná a je možno ji na vhodných lokalitách pěstovat i v České republice. V některých lokalitách se již po tisíciletí využívá v tradiční medicíně, zejména v Číně, v Koreji a na jihovýchodní Sibiři. Šišák se vyskytuje takřka globálně ve více než 350 odrůdách. Průzkum ostatních druhů byl však velmi nepatrný ve srovnání se studiem druhu *Scutellaria baicalensis*. Fytochemický výzkum prokázal přes 200 látek typu flavonoidů (zejména methoxyflavonů a tetrahydroxyflavonů), iridoidů, diterpenových klerodanolidů, triterpenů aj. Předpokládá se, že k nejdůležitějším látkám patří právě baicalein, dále wogonin, oroxylin A,

baicalin, wogonosid a oroxylin-A 7-0-glukuronid. Všechny tyto látky se charakterizují silně protizánětlivou, antivirovou, antibakteriální, antihepatotoxickou a protinádorovou aktivitou, a také jsou schopny vychytávat volné radikály. K dalším významným látkám se řadí také scutellarin, naringenin, apigenin, luteolin, melatonin a serotonin. Všechny se vyznačují silnou biologickou aktivitou a jsou vzájemně synergické. (16; 19; 20; 21)

Existuje řada studií o šišáku bajkalském a baicaleinu. Většina aktivit baicaleinu je připisována jeho antioxidačním a prooxidačním schopnostem. Objevuje se stále více důkazů o tom, že baicalein má schopnost chránit buňky před poškozením vyvolaným reaktivními formami kyslíku a chemotoxickými látkami. Baicalein a baicalin mají silný eliminační vliv na produkci volných radikálů prostřednictvím potlačení aktivity xanthinoxidázy (Shieh et al., 2000). V přítomnosti lipopolysacharidové léčby baicalein zabraňuje degeneraci dopaminergních neuronů, kterou lipopolysacharidy způsobují. (16)

Studie *in vitro* zjistily, že baicalein silně inhibuje agregaci neuronálních amyloidogenních bílkovin a je schopen vyvolat rozpouštění amyloidních depozit. Také zmírňuje programovanou buněčnou smrt mozkových mikroglíí v mikroglíálních buňkách u myši a potkanů pomocí silné inhibice NO potlačením iNOS (indukovatelné syntázy oxidu dusnatého), a rovněž inhibuje aktivitu NF- κ B (nukleární faktor kappa B) v buňkách. Látky obsažené v šišáku bajkalském inhibují proliferaci buněk rakoviny prostaty, specificky baicalein inhibuje IL-1 β - (interleukin 1 beta) a TNF- α - (faktor nádorové nekrózy alfa) -indukovanou produkci zánětových cytokinů z žírných buněk u lidí pomocí regulace dráhy NF- κ B a také inhibuje fosforylaci NF- κ B a I κ B α (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha). (20)

Studie *in vivo* dokazují, že baicalein má antikonvulzivní, anxiolytický, antidepressivní a sedativní účinek na potkany. Jiné studie zjistily, že baicalein chrání myši hipokampální neuronové buňky před poškozením indukovaným thapsigarginem (TG) a brefeldinem A (BFA). Baicalein redukuje TG- a BFA-indukovanou apoptózu hipokampálních buněk, snižuje indukovanou expresi bílkovin spojovaných se stresem endoplazmatického retikula a silně snižuje hladiny MAP (mitogenem aktivované proteinkinázy) kináz, jako jsou např. p38, JNK a ERK. Snižuje hromadění ROS (reaktivních kyslíkových radikálů) a hladinu MMP (matrixových metaloproteináz), a silně chrání mitochondrie před oxidačním poškozením. Řada studií *in vivo* zjistila, že baicalein snižuje edém i intrakraniální hypertenzi během infekce mozku vyvolanou bakterií *pertussis*. Také inhibuje neurotoxické působení kyseliny kainové v potkaním mozku. Další pokus na myších, které byly podrobeny přechodné globální ischemii po dobu 20 minut, zjistil, že po ošetření baicaleinem (200 mg/kg jednou

denně) je poškození neuronů minimální ve srovnání s kontrolními exempláři a je inhibována aktivita MMP-9 (metaloproteázy 9) v hippocampu. Předběžné ošetření baicaleinem účinkuje jako prevence poškození. Ačkoli bylo popsáno několik biologických aktivit baicaleinu, mechanismus, kterým baicalein zabraňuje buněčné smrti v gliomových buňkách vyvolané oxidativním stresem, je stále nejasný. (20; 16; 21)

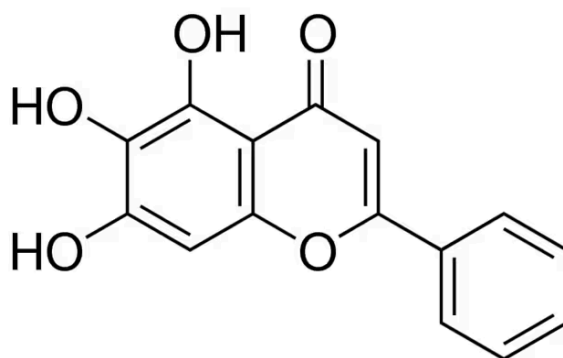
Podle výsledků testování na zvířatech by látky obsažené v šišáku mohly být užitečné při léčbě neurodegenerativních onemocnění, jako je Parkinsonova choroba a Alzheimerova nemoc, ale je potřeba další výzkum. Působení baicaleinu proti ischemickému poškození nervových buněk potvrdily četné studie, a tak by šišák mohl být užitečný např. v terapii poškození mozku po cévních mozkových příhodách. *Šišák bajkalský vykazuje pouze nízkou toxicitu*. Baicalein je dobře snášen a při testování na zdravých dobrovolnících se u nich nevyklytly žádné změny v hematologických a biochemických parametrech, které by indikovaly poškození funkce ledvin či jater. (21)



Obrázek 4: *Scutellaria baicalensis*, převzato z (22)

Strukturní modifikace flavonoidů se v rostlinách vyskytuje ve velké míře a glykosylace, jeden typ strukturální modifikace, se běžně objevuje v metabolismu flavonoidů. Několik předchozích studií ukázalo, že glykosylace flavonoidů zvyšuje jejich hydrofilitu a indukuje rezistenci vůči oxidaci enzymů v rostlinách. Důkazy týkající se účinků přidání glykosidů k biologické aktivitě flavonoidů stále chybí. Předchozí studie ukázala, že aglykonové flavonoidy, jako je kvercetin, vykazují významnější inhibiční aktivitu NO a aktivitu

indukující apoptózu než jeho glykosidy, rutin a kvercitrin, v makrofázích RAW264.7 a lidských leukemických HL-60 buňkách. Navíc aglykony, hesperidin a naringenin, ale ne jejich příslušné glykosidy, hesperidin a naringenin, inhibují produkci NO v makrofázích prostřednictvím indukce exprese proteinu hemoxygenázy 1 (HO-1), stejně jako indukce apoptózy v leukemických buňkách. Tyto údaje naznačují, že glykosidy mohou hrát jako negativní složka v biologickém působení flavonoidů. Účinek glykosidu v baicaleinu jako prevence před oxidačním stresem indukované buněčné smrti v gliomových buňkách však musí být ještě prozkoumán. (16)



Obrázek 5: Chemická struktura baicaleinu, převzato z (23)

PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

5.1 Hlavní cíl

Hlavním cílem bylo otestovat antioxidační schopnosti baicaleinu na modelu lidských osteosarkomových buněk MG-63 ošetřených peroxidem vodíku simulujícího oxidační stres.

5.2 Dílčí cíle

1. Určení optimálního množství buněk pro test LDH cytotoxicity
2. Testování antioxidačních schopností baicaleinu
3. Sledování morfologie buněk po ošetření baicaleinem a peroxidem vodíku

6 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY

1. K čemu slouží laboratorní stanovování laktátdehydrogenázy v séru?
2. Lze pomocí baicaleinu snížit oxidační stres buněk ošetřených peroxidem vodíku?
3. Má ošetření peroxidem vodíku a baicaleinem vliv i na morfologii buněk?

7 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Pokus byl proveden na zakoupené lidské osteosarkomové buněčné linii MG-63, viz kapitola 8.1.4., na Ústavu lékařské chemie a biochemie na LF UK v Plzni.

8 METODIKA PRÁCE

8.1 Použité chemikálie a kity

8.1.1 Baicalein, 98% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

Ze zakoupeného práškového baicaleinu jsme připravili rozpuštěním v dimethylsulfoxidu (DMSO) zásobní roztok o koncentraci 10 mM. Přidáním 1 μ l zásobního roztoku baicaleinu do 100 μ l média vznikl roztok $c = 100 \mu\text{M}$, který jsme používali pro pokus.

8.1.2 Peroxid vodíku, 30% (Penta, Praha, ČR)

Příprava koncentrační řady peroxidu vodíku:

- 1) Připravili jsme si 4x15 ml zkumavky.
- 2) Do zkumavky č. 1 jsme ze zásobní lahve odebrali 1 ml 30% H_2O_2 .
- 3) Ze zkumavky č. 1 jsme do zkumavky č. 2 přenesli 100 μ l 30% H_2O_2 a přidali 900 μ l vody. Z toho jsme použili 1 μ l na jamku, tj. $c = 10 \text{ mM}$
- 4) Ze zkumavky č. 2 jsme do zkumavky č. 3 přenesli 100 μ l H_2O_2 a přidali 900 μ l vody. Z toho jsme použili 1 μ l na jamku, tj. $c = 1 \text{ mM}$
- 5) Ze zkumavky č. 3 jsme do zkumavky č. 4 přenesli 100 μ l H_2O_2 a přidali 900 μ l vody. Z toho jsme použili 1 μ l na jamku, tj. $c = 0,1 \text{ mM}$

8.1.3 CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA)

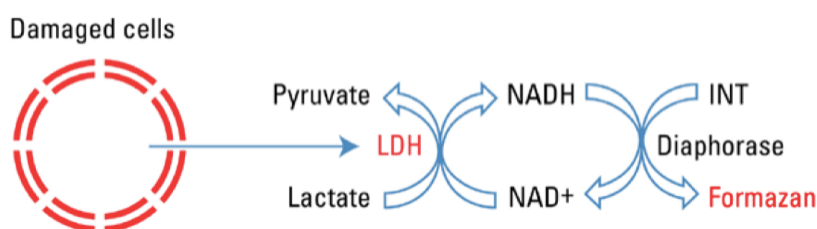


Obrázek 6: CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay Kit, zdroj vlastní

Invitrogen™ CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay Kit obsahuje činidla pro jednoduché a spolehlivé stanovení buněčné cytotoxicity kolorimetrickou metodou. Soupravu lze použít s různými typy savčích buněk, včetně 3D modelů, pro měření cytotoxicity zprostředkované chemickými sloučeninami a testování buněčně zprostředkované cytotoxicity. Protože koncentrace LDH v médiu je indikátorem buněčné cytotoxicity, může být test použit

k monitorování cytotoxicity ze stejného vzorku v průběhu času. K provedení testu se alikvotní část média buněčné kultury přeneše na novou destičku a přidá se reakční směs CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay Kit. Po 30 minutách inkubace při pokojové teplotě se testy zastaví přidáním zastavovacího roztoku (stop solution) a poté se změří absorbance pomocí čtečky mikrodětiček.

Laktátdehydrogenáza (LDH) je cytosolový enzym přítomný v mnoha různých typech buněk a je dobře definovaným a spolehlivým indikátorem cytotoxicity. Poškození plazmatické membrány uvolňuje LDH do okolního buněčného kultivačního média. Extracelulární LDH v médiu lze stanovit sdruženou enzymatickou reakcí, ve které LDH katalyzuje přeměnu laktátu na pyruvát prostřednictvím redukce NAD⁺ na NADH. Oxidace NADH diaphorázou vede k redukci tetrazoliové soli (INT) na červený formazanový produkt, který lze měřit spektrofotometricky při 490 nm (obrázek č. 7). Úroveň tvorby formazanu je přímo úměrná množství LDH uvolněného do média, což svědčí o cytotoxicitě.

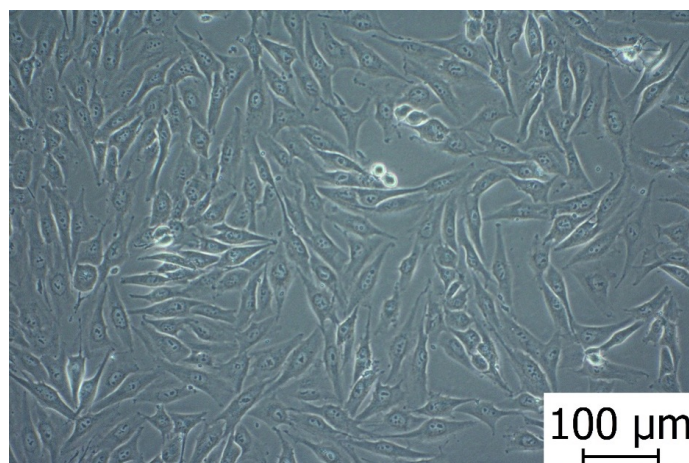


Obrázek 7: Schéma mechanismu CyQUANT™ LDH Cytotoxicity, převzato z (24)

8.1.4 Buněčná kultura

Pro pokus byla použita lidská osteosarkomová buněčná linie MG-63 (ECACC 86051601) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), získaná z osteosarkomu 14-letého chlapce.

Buňky byly kultivovány v médiu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Biosera Europe, Nuaille, France) suplementovaném 10% (v/v) fetálním bovinním sérem (FBS, Biosera Europe, Nuaille, France), 100 U/mL penicilinem a 100 mg/mL streptomycinem (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) a 2,5 mM stabilním glutaminem (Diagnovum GmbH, Ebsdorfergrund, Germany). Buňky MG-63 byly udržovány v inkubátoru ve 37 °C v 5% vlhčené atmosféře CO₂. Kultivační médium bylo měněno dle potřeby, 2 – 3x týdně.



Obrázek 8: Buňky MG-63 na kultivační lahvi, zdroj vlastní
Vyfoceno na mikroskopu Olympus CKX41, objektiv 20x

8.2 Určení optimálního počtu buněk pro test LDH cytotoxicity

Pro laboratorní stanovení aktivity LDH byl použit CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA) a bylo postupováno podle manuálu.

- 1) Připravili jsme si sériové ředění buněk 2000 – 4000 – 6000 – 8000 – 10000 – 12000 – 14000 – 16000 – 18000 – 20000 buněk ve 100 μl média na 96-jamkové destičce pro tkáňové kultury ve dvou sadách v triplikátech. Jednu sadu jsme používali ke stanovení spontánní aktivity LDH a druhou sadu jsme používali ke stanovení maximální aktivity LDH.
- 2) Buňky jsme nechali přes noc inkubovat při 37 °C v 5% CO₂, aby adherovaly.
- 3) Do jedné sady triplikátů obsahujících buňky jsme přidali 10 μl sterilní, ultračisté vody a promíchali jemným poklepáním. Buňky ošetřené vodou sloužily ke stanovení spontánní aktivity LDH.
- 4) Do druhé sady triplikátů jsme přidali 10 μl 10X Lysis Buffer a promíchali jemným poklepáním. Buňky ošetřené 10X Lysis Buffer sloužily ke stanovení maximální aktivity LDH.
- 5) Obě sady jsme inkubovali po dobu 45 minut při 37 °C v 5% CO₂.
- 6) Přenesli jsme 50 μl každého vzorku média (stanovení spontánní aktivity LDH, stanovení maximální aktivity LDH a pozitivní kontrolu 1X LDH) do 96-well destičky s plochým dnem.

- 7) Přenesli jsme 50 μ l Reaction Mixture do každé jamky se vzorkem a promíchali jemným poklepáním.
- 8) Destičku jsme inkubovali při pokojové teplotě po dobu 30 minut a chránili ji před světlem.
- 9) Ke každému vzorku jsme přidali 50 μ l Stop Solution a promíchali jemným poklepáním.
- 10) Změřili jsme absorbanci při 490 nm a 680 nm. Pro stanovení aktivity LDH jsme pak odečetli absorbanci při 680 nm (signál pozadí přístroje) od absorbance při 490 nm. Absorbanci jsme měřili na destičkovém readeru Synergy H1 (Biotek, Winooski, VT, USA).
- 11) Vytvořili jsme graf k určení lineárního rozsahu testu cytotoxicity LDH a optimálního počtu buněk.

8.3 Sledování antioxidačních schopností baicaleinu u buněk ošetřených peroxidem vodíku

Baicalein byl použit k ošetření buněk před působením peroxidu vodíku jako látka snižující oxidační stres. Pro stanovení aktivity LDH při sledování jeho antioxidačních vlastností byl použit CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA) a bylo postupováno podle manuálu.

- 1) Přenesli jsme optimální počet buněk (10000 b./ 1 jamka, jak bylo stanoveno v předběžném experimentu) ve 100 μ l média v triplicátech do 96-well destičky pro tkáňové kultury.
- 2) Buňky jsme nechali přes noc inkubovat při 37 °C v 5% CO₂, aby adherovaly.
- 3) Pro stanovení antioxidačních vlastností baicaleinu jsme připravili tyto varianty vzorků v tripletech:

100 mM baicalein + 10 mM H ₂ O ₂	Buňky na 30 minut ošetřeny baicaleinem, poté inkubace 6 h s H ₂ O ₂
10 mM H ₂ O ₂ (bez baicaleinu)	Inkubace 6 h s H ₂ O ₂
100 mM baicalein + 1 mM H ₂ O ₂	Buňky na 30 minut ošetřeny baicaleinem, poté inkubace 6 h s H ₂ O ₂
1 mM H ₂ O ₂ (bez baicaleinu)	Inkubace 6 h s H ₂ O ₂
100 mM baicalein + 0,1 mM H ₂ O ₂	Buňky na 30 minut ošetřeny baicaleinem, poté inkubace 6 h s H ₂ O ₂
100 mM baicalein (bez H ₂ O ₂)	Kontrola účinku samotného baicaleinu
Čisté kultivační médium	Kontrola

Tabulka 1: Varianty vzorků, zdroj vlastní

- 4) Destičku jsme inkubovali při 37 °C v 5% CO₂.
- 5) Každý vzorek jsme přenesli na 96-well destičku s plochým dnem v triplicátech.
- 6) Do každé jamky se vzorkem jsme alikvotovali 50 µl Reaction Mixture a dobře promíchali.
- 7) Destičku jsme po dobu 30 minut inkubovali při pokojové teplotě a chránili ji před světlem.
- 8) Do každé jamky se vzorkem jsme přidali 50 µl Stop Solution a promíchali jemným poklepáním.
- 9) Změřili jsme absorbanci při 490 nm a 680 nm. Pro stanovení aktivity LDH jsme pak odečetli absorbanci při 680 nm (signál pozadí přístroje) od absorbance při 490 nm. Absorbanci jsme měřili na destičkovém readeru Synergy H1 (Biotek, Winooski, VT, USA).

8.4 Morfologie buněk po ošetření baicaleinem a peroxidem

Buňky MG-63 byly kultivovány na 12-jamkové destičce ve stejných variantách médií, ve kterých jsme měřili aktivitu LDH (viz tabulka 1). Po 30-minutové inkubaci příslušných vzorků s baicaleinem a 6-hodinové inkubaci s H₂O₂ byly jamky s buňkami promyty PBS (Phosphate Buffer Saline). Poté bylo přidáno médium Live Cell Imaging Solution (LCIS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA) a buňky byly vyfoceny na invertovaném mikroskopu Olympus CKX41 (Olympus, Hamburg, Německo) s objektivem 10x.

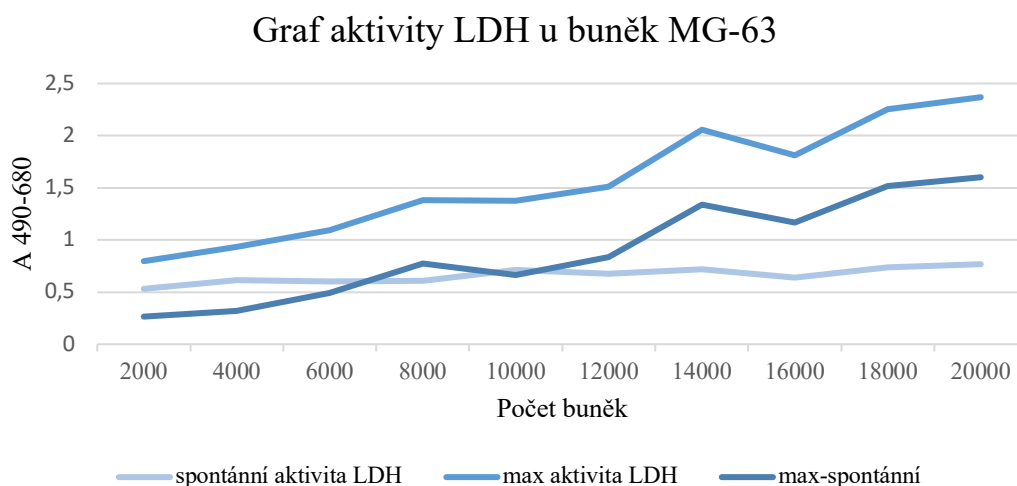
8.5 Statistické zpracování

Ke statistickému vyhodnocení byl použit Studentův t-test ($p \leq 0,05$).

9 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

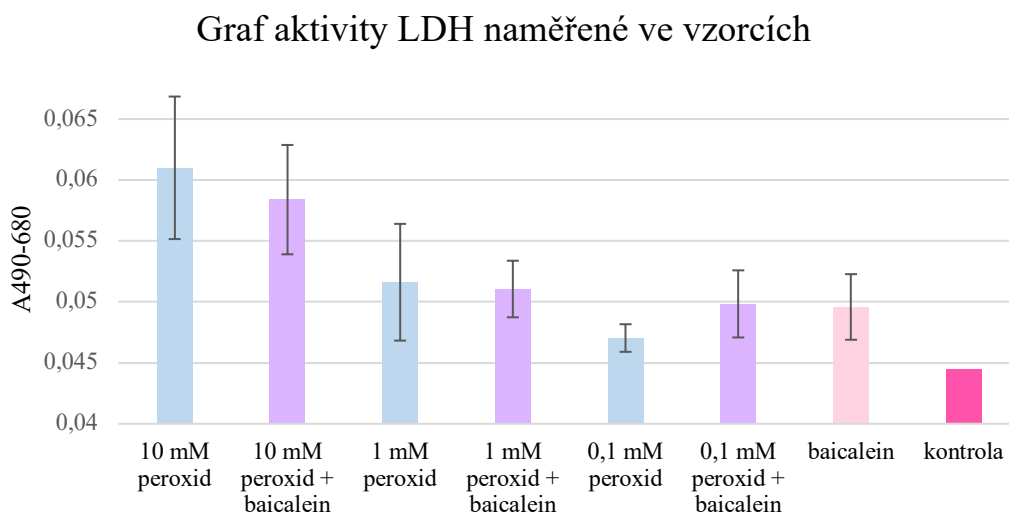
9.1 Určení optimálního počtu buněk pro test LDH cytotoxicity

Do grafu jsme vynesli hodnotu absorbance kontroly maximální aktivity LDH mínus hodnotu absorbance kontroly spontánní aktivity LDH proti počtu buněk, abychom určili lineární rozsah testu cytotoxicity LDH a optimální počet buněk. Optimální počet buněk na jamce 96-well na tento pokus je cca 10000 až 12000. Pro následný pokus s baicaleinem a peroxidem vodíku jsme tedy použili 10000 buněk na jamku.



Graf 1: Určení optimálního počtu buněk pro test LDH cytotoxicity, zdroj vlastní

9.2 Sledování antioxidačních schopností baicaleinu u buněk ošetřených peroxidem vodíku



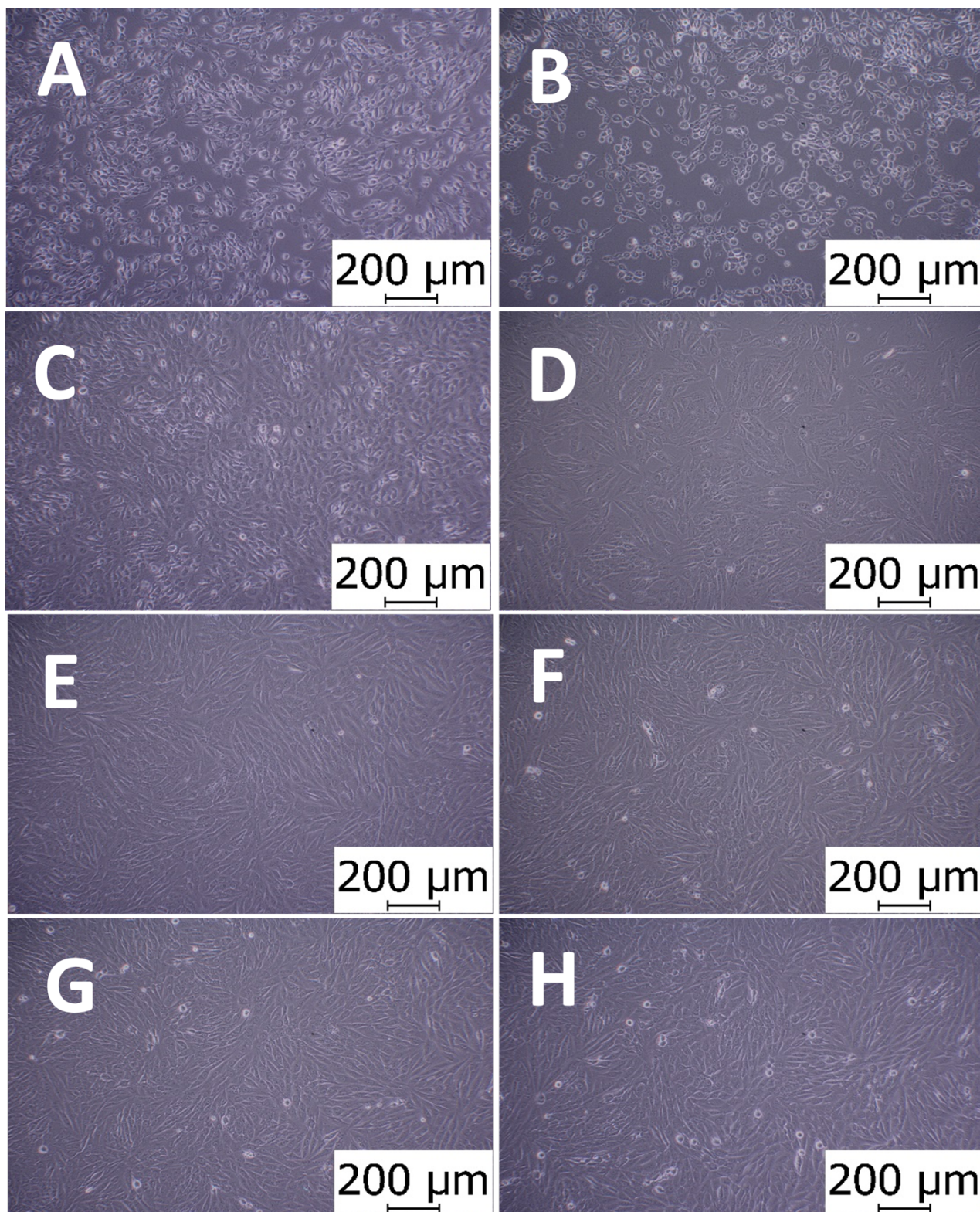
Graf 2: Aktivita LDH naměřená ve vzorcích, zdroj vlastní

Výsledek:

- čím větší koncentrace peroxidu, tím vyšší poškození buněk a hodnota LDH (absorbance)
- použití baicaleinu snižuje poškození buněk při koncentraci peroxidu 10 mM a 1 mM
- koncentrace peroxidu 0,1 mM již buňky tolik nepoškozuje, projevuje se cytotoxicita baicaleinu
- u samotného baicaleinu se oproti kontrole (pouze samotné buňky) projevuje také určitá cytotoxicita

9.3 Morfologie buněk po ošetření baicaleinem a peroxidem vodíku

Při mikroskopickém zhodnocení vzhledu buněk bylo zjištěno, že nejpoškozenější buňky jsou ty, které byly ošetřeny peroxidem vodíku o koncentraci 10 mM bez přídavku i s přídavkem baicaleinu, a dále buňky ošetřené peroxidem vodíku o koncentraci 1 mM bez přídavku baicaleinu. Poškozené buňky nebo buňky ve stresu mají zakulacený tvar na rozdíl od buněk nepoškozených, které mají protáhlý tvar fibroblastu, viz obrázek č. 9.



Obrázek 9: Morfologie buněk po ošetření baicaleinem a peroxidem, zdroj vlastní

Legenda:

A = MG-63 peroxid 10 mM bez baicaleinu

B = MG-63 peroxid 10 mM + baicalein 100 uM

C = MG-63 peroxid 1 mM bez baicaleinu

D = MG-63 peroxid 1 mM + baicalein 100 uM

E = MG-63 peroxid 0,1 mM bez baicaleinu

F = MG-63 peroxid 0,1 mM + baicalein 100 uM

G = MG-63 kontrola bez peroxidu, baicalein 100 uM

H = MG-63 kontrola bez peroxidu bez baicaleinu

Vyfoceno na mikroskopu Olympus CKX41, objektiv 10x

DISKUZE

1. K čemu slouží laboratorní stanovování laktátdehydrogenázy v séru?

Laktátdehydrogenáza v séru je obecným ukazatelem lýzy buněk. Ke zvýšení aktivity LDH dochází při celé řadě onemocnění. Aktivita LDH v séru není orgánově specifická, ale může sloužit jako vodítko při diagnostice onemocnění jater, perniciózní a hemolytické anémie, a akutního infarktu myokardu nebo kosterních svalů. V kombinaci s velmi nízkou koncentrací haptoglobinu slouží jako dobrý marker intravaskulární hemolýzy. Dále má měření LDH v séru také klasifikační a prognostický význam u mnoha maligních nádorů, u kterých je zvýšená koncentrace zejména izoenzymu LD5. Izoenzymy lze dokonale rozlišit pomocí elektroforézy. Stanovení LDH v séru má také význam při určování prognostického skóre a stagingu u různých druhů nádorů. (12; 10)

V našem pokusu jsme využili měření cytotoxicity pomocí LDH.

2. Lze pomocí baicaleinu snížit oxidační stres buněk ošetřených peroxidem vodíku?

Několik předchozích studií ukázalo, že ochranné účinky flavonoidů jsou odvozeny od jejich aktivit pohlcujících volné radikály, zatímco antioxidační vlastnosti jsou nedostatečné k vysvětlení ochranného mechanismu flavonoidů. Bylo prokázáno, že baicalein brání poškození buněk vyvolanému ROS tím, že působí jako zachycovač volných radikálů díky své TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) a aktivitě vychytávání volných radikálů DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl). V této studii baicalein inhiboval apoptózu indukovanou H_2O_2 se snížením hladin intracelulárního peroxidu. To naznačuje, že antioxidační aktivita baicaleinu se může podílet na ochraně buněk C6 proti cytotoxickým událostem vyvolaným H_2O_2 . (16)

V naší studii jsme zjistili, že použití baicaleinu snižuje poškození buněk MG-63 při koncentraci peroxidu 10 mM a 1 mM.

3. Má ošetření peroxidem vodíku a baicaleinem vliv i na morfologii buněk?

Předchozí studie ukázaly, že baicalein může chránit buněčnou morfologii a integritu před oxidativním stresem, který peroxid vodíku způsobuje. To může zahrnovat udržení normálního tvaru buněk, snížení poškození buněčných membrán a dalších buněčných struktur.

Bylo zjištěno, že baicalein chrání buňky gliomu C6 před cytotoxicitou indukovanou H_2O_2 .
(16)

Při našem mikroskopickém zhodnocení vzhledu buněk bylo zjištěno, že nejpoškozenější buňky jsou ty, které byly ošetřeny peroxidem vodíku o koncentraci 10 mM bez přídatku i s přídatkem baicaleinu, a dále buňky ošetřené peroxidem vodíku o koncentraci 1 mM bez přídatku baicaleinu. Poškozené buňky nebo buňky ve stresu mají zakulacený tvar na rozdíl od buněk nepoškozených, které mají protáhlý tvar fibroblastu.

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce s názvem „Laktátdehydrogenáza jako marker integrity buněčné membrány“ je rozdělena na teoretickou a praktickou část.

V teoretické části je popsána fyziologie buňky se zaměřením na cytoplazmatickou membránu a patofyziologie buňky, konkrétně buněčná smrt. Dále je v ní popsán mechanismus glykolýzy, na který navazuje oxidační stres a patologické stavy, které způsobuje. Poslední kapitola teoretické části je věnována flavonoidům, konkrétně baicaleinu a jeho možným příznivým účinkům na naše zdraví.

V praktické části jsme testovali naše teoretické úvahy o možnosti baicaleinu zabránit oxidačnímu stresu. Podrobnou analýzou výsledků jsme zjistili, že použití baicaleinu snižuje poškození buněk při koncentraci peroxidu 10 mM a 1 mM.

Zjistili jsme ale také, že u samotného baicaleinu se oproti kontrole (pouze samotné buňky v kultivačním médiu) projevuje také určitá cytotoxicita, což podporuje známé rčení, že každá látka může být potenciálně toxická, záleží jen na její koncentraci.

10 CITOVANÁ LITERATURA

1. **Rokyta, Richard et. al.** *Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi*. Praha : Grada Publishing, 2015. ISBN 978-80-247-4867-2.
2. —. *Fyziologie: pro bakalářská studia v medicíně, ošetrovatelství, přírodovědných, pedagogických a tělovýchovných oborech*. Praha : ISV, 2008. ISBN 80-86642-47-X.
3. **Myslivoček, Jaromír a Riljak, Vladimír.** *Fyziologie: repetitorium*. Praha : Stanislav Juhaňák - Triton, 2020. ISBN 978-80-7553-818-5.
4. **Vokurka, Martin a kol.** *Patofyziologie pro nelékařské směry*. Praha : Karolinum, 2018. ISBN 978-80-246-3563-7.
5. Cell. *National Human Genome Research Institute*. [Online] 2024. [Citace: 8. 3. 2024.] <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Cell>.
6. Cell Membrane (Plasma Membrane). *National Human Genome Research Institute*. [Online] 2024. [Citace: 8. 3. 2024.] <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Cell-Membrane>.
7. **Stillwell, William.** An Introduction to Biological Membranes, Membrane Transport. *National Library of Medicine*. [Online] Epub, 2016. [Citace: 8. 3. 2024.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7182109/>. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63772-7.00019-1>.
8. **Silbenagl, Stefan a Lang, Florian.** *Atlas patofyziologie*. Praha : Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3555-9.
9. **Holeček, Milan.** *Regulace metabolismu základních živin u člověka*. Praha : Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-2976-6.
10. **Štern, Petr a kol.** *Obecná a klinická biochemie: pro bakalářské obory studia*. Praha : Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-1979-8.
11. **Matouš, Bohuslav et al.** *Základy lékařské chemie a biochemie*. Praha : Galén, 2010. ISBN 978-80-7262-702-8.
12. **Racek, Jaroslav a Rajdl, Daniel et. al.** *Klinická biochemie*. Praha : Galén, 2021. ISBN 978-80-7492-545-0.
13. **Dastych, Milan a Breinek Petr a kol.** *Klinická biochemie: bakalářský obor Zdravotní laborant*. Brno : Masarykova univerzita, 2015. ISBN 978-80-210-7788-1.
14. **Nečas, Emanuel a kol.** *Obecná patologická fyziologie*. Praha : Karolinum, 2021. ISBN 978-80-246-4633-6.
15. **Torp, Oyvind.** *Jak utéct rakovině*. Praha : Euromedia group, 2020. ISBN 978-80-242-6652-7.
16. *Baicalein inhibition of oxidative-stress-induced apoptosis via modulation of ERKs activation and induction of HO-1 gene expression in rat glioma cells*. **Chen, Yen-Chou, a další.** místo neznámé : Toxicology and applied pharmacology, 2006. doi: 10.1016/j.taap.2006.05.008.
17. *Krátká historie bioflavonoidů*. **Zloch, Zdeněk.** Pardubice : Univerzita Pardubice, 2003. ISBN 80-7194-549-8.
18. **Wenzel, Melanie.** *Léčivé rostliny: nejlepší využití pro zdraví celé rodiny*. Praha : Grada, 2014. ISBN 978-80-247-5155-9.
19. **Jahodář, Luděk.** *Farmaceuticky významné semenné rostliny*. Praha : Karolinum, 2022. ISBN 978-80-246-4952-8.
20. **Buhner, Stephen Harrod.** *Přírodní antivirotika: Alternativní způsob léčby*. Praha : Esence, 2021. ISBN 978-80-242-7192-7.
21. **Strunecká, Anna, Navrátilová, Zdeňka a Patočka, Jiří.** *Léčivé byliny a duševní zdraví*. Petrovice : ProfiSales, 2018. ISBN 978-80-87494-32-5.

- 22. Zhao, Qing, Chen, Xiao-Ya a Martin, Cathie.** Scutellaria baicalensis, the golden herb from the garden of Chinese medicinal plants. *National Library of Medicine*. [Online] Epub, 2016. [Citace: 14. 3. 2024.]
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5031759/>.
- 23. Baicalein, 98%.** [Online] [Citace: 8. 3. 2024.]
https://www.sigmaaldrich.id/id_en/465119-100mg-baicalein-98-
- 24. CyQUANT LDH Cytotoxicity Assay Kit.** *Thermo Fisher Scientific*. [Online] 2019. [Citace: 15. 3. 2024.] https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0018500_CyQUANT-LDH-Cytotoxicity-Assay-Kit_PI.pdf.