

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd



**INDUKCE OXIDAČNÍHO STRESU U BUNĚK
KOŽNÍCH KERATINOCYTŮ**

Diplomová práce

Vedoucí práce: PharmDr. Anna Jirkovská, Ph.D.
Konzultant: Mgr. Petr Jošt, Ph.D.

Hradec Králové 2023

Nikola Martínková

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne 15. 5. 2023

.....

Nikola Martínková

PODĚKOVÁNÍ

Z celého srdce děkuji Mgr. Petru Joštovi, Ph.D. za odborné vedení a trpělivost po celou dobu tvorby této diplomové práce. Také děkuji projektu DZRO-FVZ22-ZHN II za finanční podporu, díky které mohla být tato práce zrealizována. Nakonec jsem neskutečně vděčná mému nejlepšímu partákovi Ing. Lukáši Kaplanovi, protože to byl právě on, kdo mě vracel do klidu, když jsem zrovna chtěla vyhodit z okna můj starý a neskutečně pomalý notebook. Děkuji, jsi božan.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Studentka: Nikola Martínková

Vedoucí práce: PharmDr. Anna Jirkovská, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Petr Jošt, Ph.D.

Název diplomové práce: Indukce oxidačního stresu u buněk kožních keratinocytů

Keratinocyty jsou součástí *epidermis* a představují majoritní část buněk svrchní vrstvy lidské kůže. Při poškození těchto buněk mutagenními látkami mohou nastat změny ve složení genetického materiálu, popřípadě může dojít i k zániku buňky. Mezi látky, které navozují změny v DNA a mají mutagenní potenciál lze zařadit i zpuchýřující bojovou chemickou látku sirný yperit.

Cílem této práce bylo porovnat buněčnou linii keratinocytů HaCaT s experimentálně odvozenou buněčnou linií 3HSM4 v odpovědi na oxidační stres indukovaný peroxidem vodíku. Buňky 3HSM4 byly připraveny selekcí rezistentních klonů buněk HaCaT, které byly opakovaně vystaveny cytotoxickým účinkům sirného yperitu.

Výsledky porovnání ukazují, že buňky 3HSM4 jsou rezistentnější vůči peroxidu vodíku. Pokud byla u obou typů buněk blokována syntéza glutathionu (GSH), byl cytotoxický účinek peroxidu vodíku stejný. Přesto, že se buňky 3HSM4 ukázaly jako odolnější z pohledu cytotoxicity, byla u nich zjištěna mnohem vyšší hladina volných radikálů než u buněk HaCaT. Při analýze intracelulárních zásob GSH však nebyl mezi oběma typy buněk zjištěn významný rozdíl. Peroxid vodíku také indukoval stejnou měrou zánik buněk módem apoptotické smrti. Změny mitochondriálního membránového potenciálu, změny v hladině kaspázy 3/7 a poškození DNA nebylo významné, protože po 24 hodinách již tyto změny nebyly zachyceny.

Z výsledků plyne, že sirný yperit mohl v buňkách 3HSM4 navodit trvalé změny v reakci buňky na oxidační stres. Tyto změny se pak zřejmě omezují na prvotní reakci antioxidačních ochranných mechanismů. Avšak je přípustné, že existují další faktory, díky kterým buňka dokáže být ve výsledku k peroxidu vodíku rezistentnější než původní buňky HaCaT a které se v našich analýzách neprojevíly.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Student: Nikola Martínková

Supervisor: PharmDr. Anna Jirkovská, Ph.D.

Consultant: Mgr. Petr Jošt, Ph.D.

Title of diploma thesis: Induction of oxidative stress in skin keratinocyte cells

Keratinocytes are part of the epidermis and represent the majority of cells in the upper layer of human skin. When these cells are damaged by mutagenic substances, changes in the composition of the genetic material may occur, and even cell death may occur. Such substances that induce changes in DNA and have mutagenic potential include the chemical warfare agent sulfur mustard.

The purpose of this study was to compare the HaCaT keratinocyte cell line with the experimentally derived 3HSM4 cell line in response to hydrogen peroxide-induced oxidative stress. The 3HSM4 cells were prepared by selecting resistant clones of HaCaT cells that were repeatedly exposed to the cytotoxic effects of sulfur mustard.

The results of the comparison show that 3HSM4 cells proved to be more resistant to hydrogen peroxide. When glutathione (GSH) synthesis was blocked in both cell types, the cytotoxic effect of hydrogen peroxide was the same. Although 3HSM4 cells were shown to be more resistant in terms of cytotoxicity, they were found to have much higher levels of free radicals than HaCaT cells. However, when intracellular GSH stores were analyzed, no significant differences were found between the two cell types. Hydrogen peroxide also induced cell death equally in the apoptotic death mode. Changes in mitochondrial membrane potential, changes in caspase 3/7 levels, and DNA damage were not significant because these changes were no longer detected after 24 hours.

These results suggest that sulfur mustard could induce permanent changes in the cellular response to oxidative stress in 3HSM4 cells. These changes then appear to be limited to the initial response of antioxidant protective mechanisms. However, it is conceivable that there are other unknown factors that may make the cell more resistant to hydrogen peroxide than the original HaCaT cells and that were not apparent in our analyses.

OBSAH

1	Úvod	8
2	Teoretická část	9
2.1.	Oxidační stres	9
2.1.1.	Volné radikály	9
2.1.2.	Reaktivní formy kyslíku	10
2.1.3.	Poškození buňky oxidačním stresem	11
2.1.1.	Ochranné mechanismy buňky v reakci na oxidační stres	14
2.1.1.1.	Enzymatické antioxidanty	14
2.1.1.2.	Neenzymatické antioxidanty	16
2.2.	Peroxid vodíku	22
2.2.1.	Interakce peroxidu vodíku s živými systémy	22
2.2.2.	Poškození buňky vyvolané peroxidem vodíku	23
2.3.	Kůže a její struktura	24
2.3.1.	Epidermis	25
2.3.2.	Dermis	26
2.3.3.	Hypodermis	27
2.4.	Fyziologický význam kůže	28
2.4.1.	Ochranná funkce	28
2.4.2.	Termoregulační funkce	28
2.4.3.	Smyslová funkce	28
2.4.4.	Syntéza vitamínu D	29
2.5.	Kožní buňky a oxidační stres	29
2.6.	Sírný yperit	29
2.6.1.	Projevy akutní toxicity sírného yperitu	30
2.6.2.	Cytotoxické účinky sírného yperitu	31
2.6.1.	Účinky sírného yperitu na kůži	34
2.6.2.	Mutagenní potenciál sírného yperitu	35
2.6.3.	Trvalé změny v buňce vyvolané sírným yperitem	35
3	Cíl práce	37
4	Experimentální část	38
4.1.	Seznam chemikálií	38
4.2.	Příprava roztoků	39

4.3.	Seznam přístrojů a pomůcek	40
4.4.	Biologický materiál	40
4.5.	Kultivace buněk HaCaT a 3HSM4	40
4.6.	Pasážování buněk a nasazení buněk do mikrotitračních destiček	41
4.7.	Ovlivnění buněk butionin sulfoximinem	41
4.8.	Ovlivnění buněk peroxidem vodíku	42
4.9.	Měření viability buněk	43
4.10.	Měření přítomnosti reaktivních forem kyslíku	43
4.11.	Měření hladiny intracelulárního glutathionu	44
4.12.	Příprava vzorků pro hodnocení apoptózy, mitochondriálního membránového potenciálu, aktivity kaspázy 3/7 a poškození DNA	44
4.12.1.	Detekce apoptózy/	44
4.12.2.	Aktivita kaspáz 3/7	45
4.12.3.	Analýza změny mitochondriálního membránového potenciálu	45
4.12.4.	Detekce poškození DNA	45
4.13.	Zpracování dat a statistické vyhodnocení	46
5	Výsledky	47
5.1.	Buněčná viabilita	47
5.2.	Hladina intracelulárních ROS	49
5.3.	Hladina intracelulárního GSH	52
5.4.	Porovnání módu buněčné smrti	54
5.5.	Změny v mitochondriálním membránovém potenciálu	55
5.6.	Změny v aktivitě kaspáz 3/7	56
5.7.	Poškození DNA	57
6	Diskuze	58
7	Závěr	63
8	Seznam zkratk	64
9	Seznam citované literatury	66

1 Úvod

Lidská kůže představuje třívrstvou bariéru, skrze kterou lidský organismus komunikuje s vnějším prostředím. Keratinocyty jsou majoritní buňky svrchní vrstvy kůže, které se podílejí na tvorbě *epidermis*. Svou neustálou obnovou zajišťují kompaktnost kůže, nezbytnou pro výkon veškerých fyziologických funkcí. Tvorba nových keratinocytů v bazální vrstvě *epidermis* je charakteristická intenzivní proliferací buněk. Tyto buňky se pak postupně dostávají do svrchnějších vrstev pokožky za současné totální diferenciaci buněk ve zralý keratinocyt (1).

Zásah do vývoje keratinocytu v podobě poškození genetického materiálu může znamenat indukci změn, které mohou mít za následek smrt buňky anebo její přežití. To je ovšem závislé na bezchybném procesu opravy DNA a dalších faktorech. Pokud nastane v procesu reparace DNA pochybení, například dojde-li k chybnému párování bází nebo posunu čtecího rámce, může to vést až ke vzniku mutace. Příčinou alternativních změn v buňce mohou být i epigenetické faktory, které sice přímo nesouvisí se změnami v DNA, ale mohou pozměnit expresi různých genů, které pak ovlivňují různé buněčné pochody (2,3).

Jednou z látek, která je charakteristická intenzivní interakcí s DNA a dalšími buněčnými makromolekulami je sирný yperit. Z hlediska toxikologie, je tato látka řazena mezi vysoce toxické zpuchýřující bojové látky. Je známa pro své cytotoxické a cytostatické účinky, pro které je hojení kožních lézí zasažených osob značně zdlouhavé a komplikované. V mnoha případech se v místě zhojené léze objevují další chronické komplikace včetně rozvoje zhoubného bujení (4,5).

V této práci si klademe za cíl porovnat senzitivitu buněk kožních keratinocytů HaCaT a experimentálně izolovaných buněk 3HSM4, vůči účinkům oxidačnímu stresu. Buňky 3HSM4 byly odvozeny od rezistentních klonů buněk HaCaT, které byly opakovaně vystaveny cytotoxickým koncentracím sирného yperitu. Chceme tak ověřit hypotézu, zda sирný yperit indukuje v buňce změny, které ovlivňují její odolnost proti exogenním oxidantům, což může například stát na počátku jejího nádorového zvrhnutí.

2 Teoretická část

2.1. Oxidační stres

Oxidační stres je definován jako narušení rovnováhy mezi tvorbou oxidantů (volných radikálů) a antioxidantů ve prospěch oxidantů, což vede k narušení redoxní signalizace, kontroly a k molekulárnímu poškození buněčných struktur (6–8).

V reakci na stresové faktory, jimiž jsou expozice ionizujícímu záření, toxické látky nebo onemocnění různé etiologie, může dojít k produkci volných radikálů nad rámec fyziologických procesů a porušení rovnovážného stavu. Tím se generují řetězové reakce, které poškozují buňku volnými radikály na molekulární úrovni. Cílem poškození je celá řada klíčových biologických struktur včetně DNA, která může být poškozena řetězovými zlomy, patologickými vazbami mezi řetězci, delecí bází a dalšími modifikacemi. Ty mohou mít za následek vznik mutací, popřípadě indukovat zánik buňky. Na úrovni aminokyselin a proteinů může dojít k racemizaci, ztrátě enzymové aktivity, neenzymatické glykosylaci, denaturaci nebo kovalentní modifikaci. Takto poškozené struktury podléhají abnormálnímu zesíťování strukturálních proteinů včetně kolagenových vláken (2,9).

2.1.1. Volné radikály

Volné radikály vznikají jako nevyhnutelný vedlejší produkt mnoha biochemických reakcí. Jsou to malé atomy, molekuly nebo ionty lišící se od většiny biologických molekul přítomností nepárového elektronu. Tvoří se během redoxních reakcí při štěpení chemické vazby. Každý fragment molekuly si po rozštěpení zachovává jeden z elektronů původní vazby. Nepárové elektrony udělují molekule vysokou reaktivitu, která je dostatečná k iniciaci řetězové reakce a další propagaci radikálů. Biologicky významné jsou radikály odvozené od reaktivních forem kyslíku a reaktivních forem dusíku (2,7,8,10).

Aby molekuly obsahující nepárové elektrony dosáhly stabilního stavu, reagují lokálně přijetím či odevzdáním elektronu. Chemická reaktivita je u jednotlivých radikálů různá. Protože většina molekul není volnými radikály, celá řada reakcí se týká i neradikálových sloučenin. Možnými neradikálovými cíli v buňce jsou lipidy, proteiny, sacharidy a nukleové kyseliny (7).

2.1.2. Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku (ROS) je obecný termín definující širokou škálu oxidačních molekul s velmi odlišnými vlastnostmi a biologickými funkcemi. Uplatňují se v rámci buněčné signalizace, ale i při patologických reakcích, které poškozují buňku. Tvorba reaktivních forem kyslíku je důsledkem přizpůsobení se aerobních organismů životu v atmosféře obsahující kyslík. ROS spolu s reaktivními formami dusíku (RNS) představují neustálý zdroj útoků na genetický materiál, který lze buď posílit nebo částečně oslabit nutričními, hormonálními či environmentálními faktory (11,12).

ROS mohou být produkovány endogenními či exogenními vlivy. Mezi potenciální endogenní zdroje patří vedlejší produkty metabolismu napojeného na cytochrom C, peroxizomy a imunitní buňky účastnící se zánětlivého procesu. Hlavním endogenním zdrojem ROS v buňce jsou mitochondrie. ROS zde vznikají jako vedlejší produkty procesu oxidativní fosforylace v komplexech I a III, kde probíhá koncová část dýchacího řetězce (11,12).

Mezi reaktivní formy kyslíku patří radikálové sloučeniny jako je hydroxylový radikál (OH^\bullet), alkoxylový radikál (RO^\bullet) a superoxidový aniontový radikál ($\text{O}_2^{\bullet-}$), ale i neradikálové sloučeniny, kterými jsou peroxid vodíku (H_2O_2), organické hydroperoxy (ROOH) anebo kyselina chlorná (HOCl). Nejsilnějším oxidantem z uvedených radikálů a neradikálů je hydroxylový radikál. Má krátký poločas rozpadu a reaguje okamžitě s okolními molekulami v místě svého vzniku. Poškození molekul se pak šíří řetězovou reakcí, což má destruktivní důsledky na DNA, proteiny a další intracelulární makromolekuly (7,13).

Superoxid vzniká buď metabolickými procesy, nebo při aktivaci kyslíku fyzikálními procesy po přijetí nepárového elektronu. Superoxid je považován za primární ROS a může dále interagovat s dalšími molekulami za vzniku sekundárních ROS. Děje se tak přímo, anebo převážně prostřednictvím procesů katalyzovaných enzymy, popřípadě ionty kovů. Superoxidový radikál nereaguje přímo s polypeptidy, sacharidy ani nukleovými kyselinami. Jeho oxidační vlastnosti jsou slabé, ale o to větší je význam jeho redukčních vlastností zejména ve spojení s komplexy železa, které jsou součástí cytochromu C. Mezi další běžné volné radikály patří ionty přechodných kovů, jako je železo a měď (7,12).

Biologicky významnými RNS je peroxynitrit (ONOO^-) a oxid dusnatý (NO^\bullet). Oxid dusnatý je příkladem fyziologického radikálu, který hraje roli v intracelulárních signálních kaskádách jako druhý posel. Příkladem neradikálových sloučenin dusíku jsou alkylperoxinitrit (ROONO), nitrosil (NO^+) nebo kyselina dusitá (HNO_2) (7).

2.1.3. Poškození buňky oxidačním stresem

Reaktivní formy kyslíku včetně superoxidového aniontu, H_2O_2 a hydroxylového radikálu přirozeně vznikají během oxidačních procesů metabolismu ve všech aerobních organismech (9,14).

Nízké hladiny ROS nejsou pro buňky škodlivé a hrají důležitou roli v buněčné signalizaci a indukcii obranných genů hostitele. Avšak vlivem stresorů se může hladina ROS dramaticky zvýšit ve prospěch indukce oxidačního poškození. Rozsah poškození závisí na mnoha faktorech včetně místa produkce ROS, reaktivity cíle nebo dostupnosti kovových iontů. ROS poškozují na molekulární úrovni klíčové buněčné struktury zejména DNA, lipidy a bílkovinné makromolekuly (2,9).

Veškeré molekulární modifikace v přežívajících buňkách mohou dále způsobit změny v genové expresi. Podle závažnosti, rozsahu a délky působení ROS dochází buď k zastavení buněčného cyklu a opravě DNA, k aktivaci apoptotických drah, nebo k nekróze a zániku buňky (2,15,16).

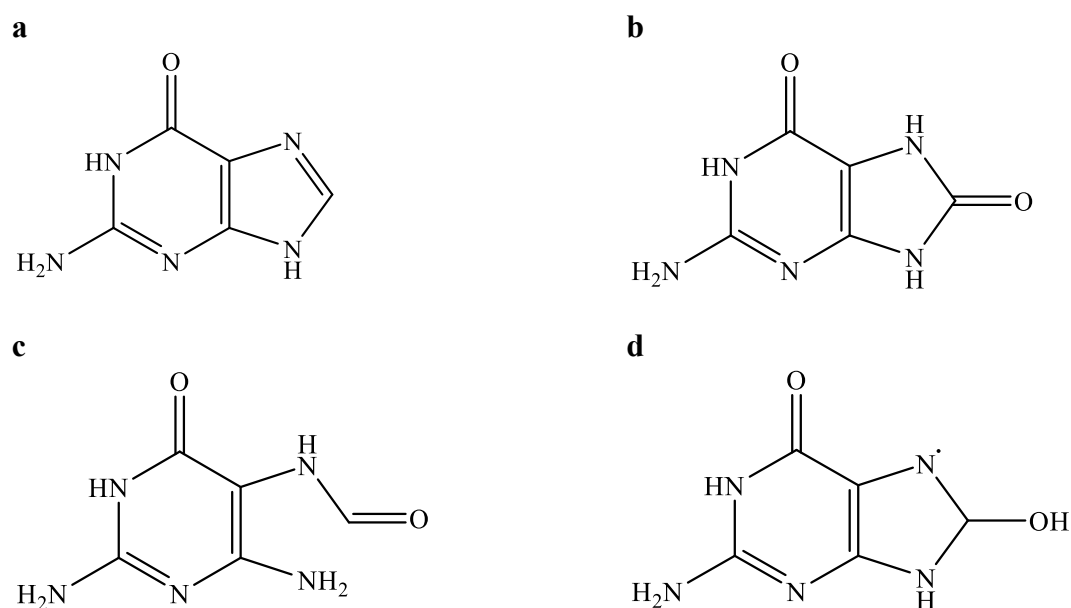
Reparace oxidačního poškození DNA probíhá cestou excize bází. Nejprve se aktivují kontrolní body buněčného cyklu a ty ho zastaví. Děje se tak z důvodu zabránění replikaci poškozené DNA. Speciální proteiny potom detekují poškozené úseky DNA nebo změny na úrovni chromatinu a aktivují přenašeče, které se podílejí na sestavování reparačních komplexů (15).

Při apoptóze neboli řízeném zániku buňky dochází ke kondenzaci chromatinu a aktivaci kaspáz, které aktivují proces kontrolované buněčné smrti. Naproti tomu nekróza představuje nekontrolovatelný pasivní proces, pro který je typické bobtnání organel, únik nitrobuněčného obsahu a fragmentů buňky do extracelulárního prostoru. Součástí procesu je i rozvoj zánětlivé reakce (16,17).

Poškození DNA

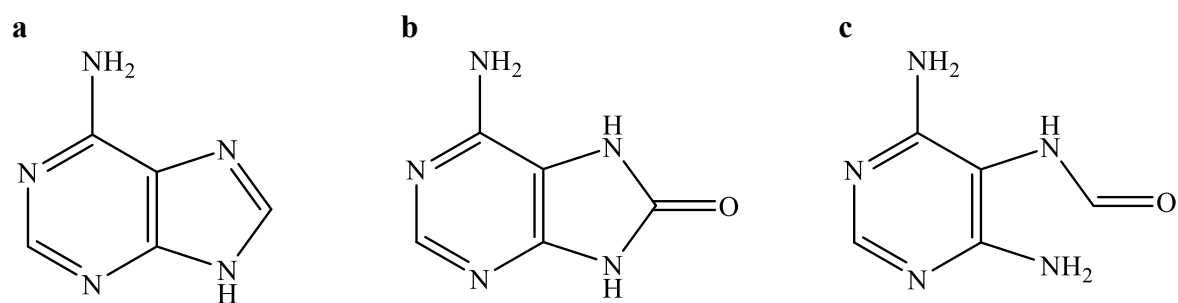
Při interakci ROS s molekulou DNA dochází k oxidaci bází, vzniku abázických míst a zlomům jednoho nebo i obou vláken dvoušroubovice. Guanin (Obr. 1a) je nejnáchylnější bázi DNA kvůli nízkému oxidačnímu potenciálu. Dvě nejčastější modifikace guaninu jsou 8-oxo-7,8-dihydroguanin (8-oxoGua, Obr. 1b) a 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FapyGua, Obr. 1c). Tyto modifikace probíhají adicí OH^\bullet na dvojnou vazbu purinového

heterocyklu za vzniku 8-hydroxy-7,8-dihydroguanylového radikálu (Obr. 1d), který může být následně oxidován na 8-oxoGua nebo redukován na kruhově otevřený FapyGua (2,18,19).



Obr. 1 Strukturní vzorec a) guaninu, b) 8-oxoGua, c) FapyGua a d) 8-hydroxyguaninu (zdroj: (18))

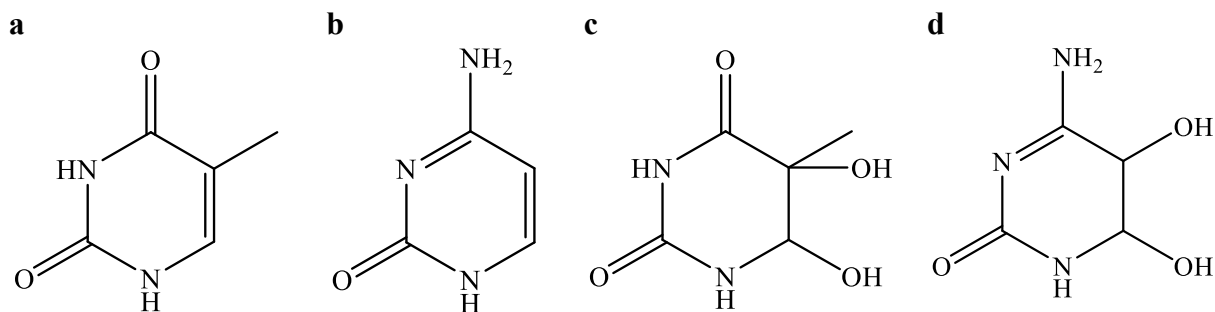
Vznikají také odpovídající modifikace adeninu (Obr. 2a) a to 8-oxo-7,8-dihydroadenin (8-oxoAde, Obr. 2b) a 4,6-diamino-5-formamidopyrimidin (FapyAde, Obr. 2c) (2,18).



Obr. 2 Strukturní vzorec a) adeninu, b) 8-oxoAde a c) FapyAde (zdroj: (18))

Pyrimidinové báze thymin (Obr. 3a) a cytosin (Obr. 3b) reagují s hydroxylovými radikály v polohách 5 a 6 za vzniku několika bazických lézí. Nejčastějšími produkty reakce jsou 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymin (thymin-glykol, Obr. 3c) a 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrocytosin (cytosin-glykol, Obr. 3d) (2,19).

Všechny tyto léze nejsou pro buňku letální, ale jsou vysoce mutagenní. Nejčastěji poté dochází k lokálnímu narušení vodíkových vazeb, narušení interakce s molekulami vody anebo s kladnými ionty jako je Na^+ , které molekulu DNA obklopují (19).



Obr. 3 Strukturní vzorec a) thyminu, b) cytosinu, c) thymin-glykolu a d) cytosin-glykolu (zdroj: (20))

Poškození lipidů

Lipidy a zejména fosfolipidy jsou hlavní složkou buněčné membrány. Peroxidace lipidů je proces, kdy dochází k přeměně nenasycených lipidů na polární lipidové hydroperoxydy. To má za následek poškození buněčné membrány, zvýšení její fluidity a únik cytosolu do extracelulárního prostředí. Rovněž může být narušena i funkce membránově vázaných receptorů nebo enzymů. Peroxidace lipidů vede také ke vzniku různých oxidovaných produktů včetně reaktivních elektrofilů z řad epoxidů a aldehydů, které jsou dále schopny modifikovat DNA, proteiny a další makromolekuly uvnitř buňky (2,21).

Lipidová peroxidace může být i jedním z faktorů podílejících se na rozvoji lidských onemocnění jako například diabetes mellitus, nádorová onemocnění, akutní poškození plic či degenerativní onemocnění centrálního nebo periferního nervového systému (2,22).

Poškození proteinů

Proteiny v buňce zastávají mnoho výkonných funkcí. Účastní se buněčné signalizace, metabolických procesů, tvoří složky cytoskeletu nebo se podílejí na udržení homeostázy. Proto má jejich poškození zásadní vliv na osud celé buňky. Mezi proteiny citlivé na oxidaci patří fosfatázy, kinázy, transkripční faktory a další enzymy podílející se na metabolismu buňky. Náchylnost proteinů k oxidaci zvyšuje přítomnost vazebných míst pro kovy, lokalizace proteinu v buňce, konformace molekuly nebo rychlost její degradace (2,21,23,24).

K poškození proteinů vlivem ROS vedou mechanismy zahrnující několik typů oxidačních reakcí. Jedná se o oxidaci katalyzovanou kovy, štěpení proteinů, oxidaci aminokyselin a konjugaci produktů po peroxidaci lipidů. Indukce oxidace proteinů je katalyzovaná kovy, které jsou navázány v proteinech. V tomto místě se pak odehrává vlastní

reakce s H_2O_2 za vzniku hydroxylových radikálů, jež napadají okolní struktury tvořené aminokyselinami (2,25,26).

Dalším mechanismem je indukce štěpení peptidových vazeb prostřednictvím ROS, při kterém vznikají alkoxylové radikály. Štěpení probíhá buď diamidovou cestou, kde vznikají peptidové fragmenty jako diamid a isokyanát anebo α -amidační cestou za vzniku amidu a N- α -ketoacylu (2,27).

Aminokyseliny mohou být rovněž modifikovány ROS přímo prostřednictvím reakce postranního řetězce. Nejnáchylnější k oxidaci jsou aminokyseliny, které ve své molekule obsahují aromatické jádro, například fenylalanin nebo histidin. Dále pak aminokyseliny obsahující sulfhydrylové skupiny, kam je řazen methionin a cystein (2,28).

2.1.1. Ochranné mechanismy buňky v reakci na oxidační stres

Při porušení rovnováhy mezi antioxidanty a oxidanty ve prospěch volných radikálů dochází k poškození biologických struktur. Pro tento případ jsou v těle vyvinuty antioxidační ochranné mechanismy, které tyto výkyvy dokážou eliminovat. Patří k nim nejen intracelulární mechanismy, které chrání vnitřní struktury buňky, ale i membránové a extracelulární mechanismy. Ty se pak podílejí na ochraně na úrovni organismu jako celku (7,29).

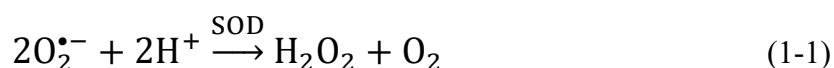
Intracelulární ochranu buňky před volnými radikály zajišťují enzymatické antioxidanty jako je superoxid dismutáza, kataláza nebo glutathion peroxidáza. Dále buňka disponuje neenzymatickými antioxidanty, z nichž nejvýznamnější je tripeptid glutathion (12).

Na povrchu membrán se pak uplatňují další neenzymatické antioxidanty z řad vitaminů, jakou jsou vitamin C, vitamin E nebo například karotenoidy či flavonoidy. Mezi hlavní extracelulární antioxidační obranné systémy patří proteiny schopné vázat železo a měď. Pokud jsou kovy vázány ve struktuře proteinu, nemohou interagovat s volnými radikály. K těmto vazebným proteinům patří například transferin, laktoferin, albumin nebo ceruloplazmin (7,30).

2.1.1.1. Enzymatické antioxidanty

Superoxid dismutáza

Superoxid dismutáza (SOD, EC 1.15.1.1) je jeden z nejúčinnějších intracelulárních enzymových antioxidantů. SOD v cytosolu a v mitochondriích katalyzuje dismutaci superoxidu na kyslík a méně reaktivní peroxid vodíku (1-1).

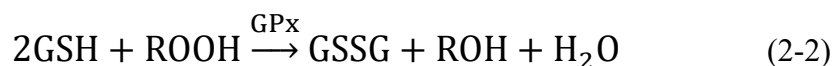
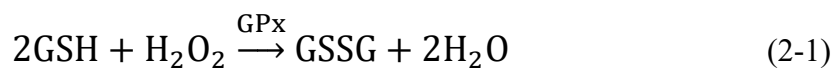


Superoxid zde podléhá disproporcionaci a vykazuje jak oxidační, tak i redukční vlastnosti. SOD existuje ve třech izoformách SOD1, SOD2 a SOD3. Vzájemně se od sebe liší polohou aktivního centra tvořeného kovem, aminokyselinovou složkou, počtem proteinových podjednotek a kofaktorů. SOD1 je dimer obsahující zinek a měď. Je lokalizován v cytoplazmě, v mezimembránovém prostoru mitochondrií, v jádře a v lysozomech. SOD2 obsahuje mangan a SOD3 obsahuje kovy zinek a měď. Tyto dvě izoformy jsou tetramery lokalizovány v mitochondriích a extracelulární matrix. SOD1 vycytává superoxidové radikály. SOD2 a SOD3 poté katalyzují jeho dismutaci na H_2O_2 a kyslík (7,12,31).

Glutathion peroxidáza

Glutathion peroxidáza (GPx, EC 1.11.1.9) se podílí na metabolismu H_2O_2 , který je generován SOD. Jeho činnost je lokalizována v cytoplazmě a v mitochondriích. GPx je strukturně tvořena tetramerem, který obsahuje v každé podjednotce seleno-cysteinový zbytek. Vyskytuje se ve dvou izoformách a to na selenu nezávislá glutathion-S-transferáza (GST, EC 2.5.1.18) a na selenu závislá glutathion peroxidáza (GPx, EC 1.11.1.19). GPx má zásadní úlohu v ochraně proti endogenně i exogenně vyvolané peroxidaci lipidů buněčné membrány. (12,32,33).

Substrátem pro katalytickou reakci GPx je H_2O_2 nebo organický hydroperoxid. H_2O_2 je rovněž i substrátem pro CAT a spolu s GPx o tento substrát soutěží. H_2O_2 je rozkládán na vodu za současné oxidace neenzymatického thiolového antioxidantu GSH. Současně během reakce vzniká oxidovaný glutathion (GSSH) (2-1). Hydroperoxid je za účasti oxidace GSH na GSSH obdobnou reakcí přeměněn na alkohol a vodu (2-2) (12):



Kataláza

Enzym kataláza (CAT, EC 1.11.1.6) se vyskytuje v buňkách živočichů, rostlin, hub a dalších aerobních organismů. CAT se v buňce nachází v organele zvané peroxizom. Rovněž ji najdeme i v cytoplazmě erytrocytů. Tento enzym katalyzuje přeměnu H_2O_2 na vodu a molekulární kyslík (3-1):



CAT má jednu z nejvyšších rychlostí přeměny substrátu na produkt ze všech enzymů. Jedna molekula katalázy dokáže každou minutu přeměnit okolo 6 milionů molekul H_2O_2 na vodu a kyslík (12).

2.1.1.2. Neenzymatické antioxidanty

Antioxidanty neenzymatické povahy jsou nízkomolekulární látky s malou molekulovou hmotností. Jedná se především o vitaminy a thioly. Z řady exogenních látek jsou to především antioxidanty rostlinného původu. Mezi neenzymatické antioxidanty ale patří rovněž endogenní makromolekulární látky jako je albumin, transferin, feritin, ceruloplazmin nebo haptoglobin (33).

V porovnání s enzymatickými antioxidanty se odlišují svojí nízkou specifitou k substrátu. Díky tomu eliminují negativní účinky ROS i RNS rychlou terminací radikálové řetězové reakce (34,35).

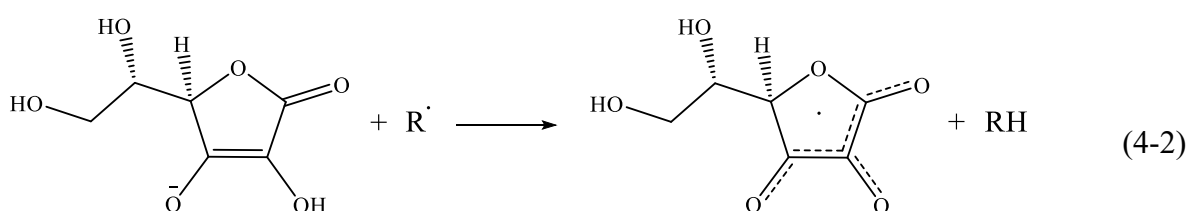
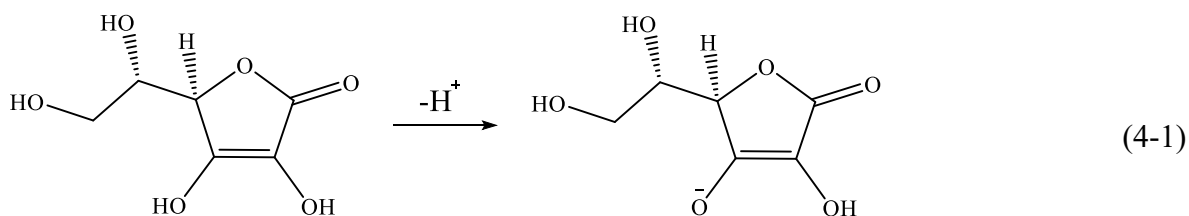
Příkladem přírodních exogenních neenzymatických antioxidantů jsou flavonoidy, vitaminy C, E, A, karotenoidy, rostlinné polyfenoly nebo kurkumin. Některé z těchto antioxidantů jsou rozpustné ve vodě a nacházejí se převážně v cytosolu nebo cytoplazmatické matrix, zatímco jiné jsou rozpustné v tucích a jsou přítomny v buněčných membránách (33).

Kromě přítomnosti antioxidantů je pro odolnost vůči škodlivým účinkům volných radikálů důležitá i struktura membrán s vhodným poměrem cholesterolu a fosfolipidů (12).

Vitamin C

Vitamin C (kyselina L-askorbová) je ve vodě rozpustná sloučenina vykazující optickou aktivitu. Její antioxidační účinek spočívá v odevzdání protonu z hydroxylové

skupiny v poloze 3 a vzniku rezonančně stabilizovaného askorbátového aniontu. Tím dojde k terminaci radikálové řetězové reakce (4-1). Přítomnost konjugovaných dvojných vazeb stabilizuje deprotonovaný aniont a rovněž přispívá ke stabilitě askorbátového radikálu, který vzniká při reakci aniontu s volnými radikály (4-2) (33).



Další hlavní funkcí vitamínu C je regenerace vitamínu E ve formě tokoferolového radikálu zpět do jeho výchozího aktivního stavu. Tokoferolový radikál, který zachytí elektron při odbourávání kyslíkových radikálů je mnohem méně reaktivní a pomocí vitamínu C je zpět přeměněn na α -tokoferol. Tím dojde k přerušení řetězové reakce přenosu volných radikálů a zároveň i k přerušení jejich škodlivého působení na organismus (7,33).

Regenerace molekuly vitamínu E probíhá v buněčných membránách ve spojení s GSH nebo jinými reduktanty (33).

Vitamin C působí jako antioxidant i jako redukční činidlo tím, že je schopen odevzdat elektrony do různých enzymatických a neenzymatických reakcí. Tyto ionty jsou redukovány přechodnými kovy, které jsou součástí několika biosyntetických enzymů. Tím je zabráněno další biologické oxidaci makromolekul (33).

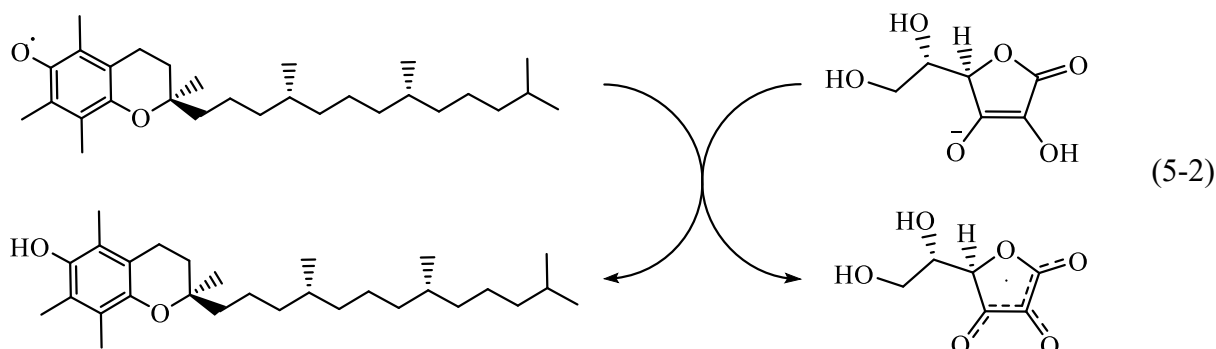
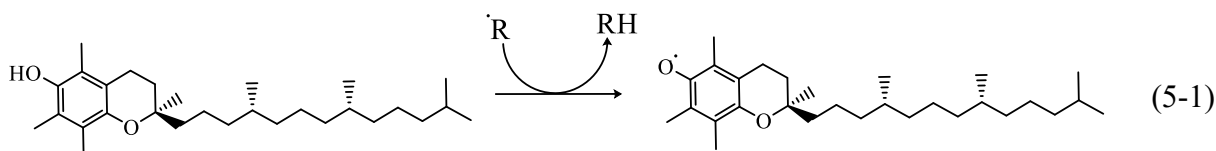
V rámci ochrany buněčné membrány může skupina vitamínů C, E a karotenoidů kooperovat s antioxidantními enzymy (12).

Vitamin E

Vitamin E (tokoferol) je soubor opticky aktivních derivátů 6-hydroxychromanu s hydrofobním fytylovým řetězcem. Jsou známy čtyři izomery tokoferolů a čtyři izomery

tokotrienolů. Nejběžnější a biologicky nejaktivnější z izomerů je α -tokoferol. Vitamin E je řazen do skupiny lipofilních vitaminů, a proto je v buňce lokalizován v membráně, kde je zároveň nejsilnějším membránově vázaným antioxidantem. Poskytuje ochranu nejen před ROS, ale i před RNS (33).

Vitamin E redukuje lipidové peroxylové radikály přenosem atomu vodíku z fenolové skupiny 6-hydroxychromanu, čímž vzniká relativně stálý a rezonančně stabilizovaný tokoferolový radikál, který není schopen vyvolat další peroxidaci lipidů (5-1). Radikál α -tokoferolu může být redukován zpět na původní aktivní formu α -tokoferolu pomocí kyseliny askorbové, respektive askorbátu (5-2) nebo koenzymu Q10. Případně může být zhašen druhým peroxylovým radikálem (33,36).



Vitamin A

Vitamin A (all-trans retinol) tvoří skupinu nenasycených organických sloučenin rozpustných v tucích, mezi něž patří retinol, retinal (R-CHO), kyselina retinová (R-OOH), retinylestery (R-OO) jako retinylpalmitát a mnoho provitaminů A, například β -karoten. Jejich společnou chemickou strukturou je diterpen ($C_{20}H_{32}$). Všechny formy mají dále společný β -iononový kruh, na který je navázána izoprenoidní vazba v podobě retinyllové skupiny. Obě části molekuly jsou pro aktivitu vitaminu A klíčové (33,37).

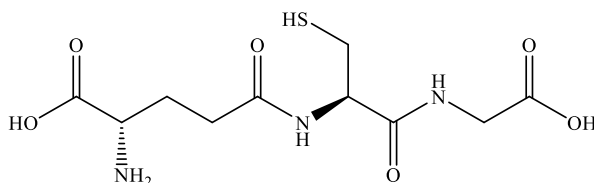
Antioxidační ochranná funkce vitaminu A spočívá v zachycení peroxylového lipidového radikálu prostřednictvím adiční reakce na β -iononového kruhu retinolu. Kromě eliminace volných radikálů hraje významnou roli při udržování zraku. Retinal je v sítnici

potřebný pro tvorbu rodopsinu. Tato světlo pohlcující molekula je nezbytná pro barevné i skotopické vidění (33).

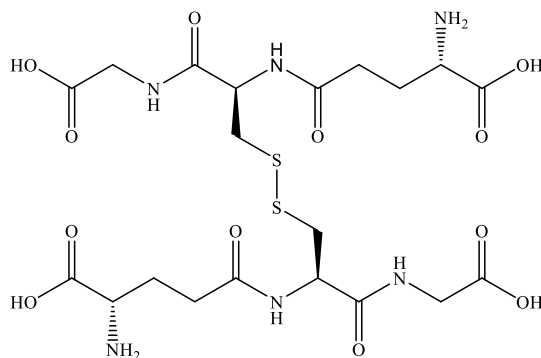
Glutathion

Glutathion je tripeptid syntetizovaný z prekurzorů aminokyselin L-cysteinu, L-glutamátu a glycinu. Patří mezi neenzymové antioxidanty, které obsahují thiolové funkční skupiny. V buňce se nachází hlavně v cytosolu, a to v relativně vysoké koncentraci, která může dosahovat až $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, tedy velmi podobných hodnot jako glukóza, draslík nebo cholesterol. Méně je pak GSH obsažen v buněčném jádře a mitochondriích. Syntéza GSH probíhá převážně *de novo* v játrech (12,38).

GSH se vyskytuje ve dvou formách, a to jako redukovaný glutathion (GSH, Obr. 4) a oxidovaný glutathion disulfid (GSSG, Obr. 5). Oxidovaná forma glutathionu je tvořena dvěma molekulami původní redukované formy, které jsou navzájem spojeny disulfidickým můstkem původních SH-skupin cysteinu (12).



Obr. 4 Redukovaná forma glutathionu (GSH, zdroj: (12))



Obr. 5 Oxidovaná forma glutathionu glutathion disulfid (GSSG, zdroj: (12))

GSH představuje redukční chemickou bariéru, která brání nadměrné oxidaci citlivých buněčných složek. V buňce se většina GSH nachází v redukované formě, která je stabilní. K oxidaci GSH dochází nejen přímou chemickou reakcí s radikálem, ale je také oxidován v rámci redukčních enzymatických reakcí s peroxidy (39,40).

Thiolová (-SH) skupina propůjčuje GSH schopnost chránit ostatní thiolové funkční skupiny v proteinech před oxidačním poškozením. Thiolové skupiny jsou v buňkách široce rozšířené a vysoce reaktivní části biomolekul. Vytvářejí komplexní sloučeniny s ionty kovů, účastní se oxidačních reakcí, kde se samy oxidují na sulfonové kyseliny a vytvářejí thiolové radikály a disulfidy (33).

Kromě detoxikace volných radikálů hraje GSH významnou roli při regeneraci oxidovaných forem vitaminů C a E. V buněčném jádře udržuje GSH správné redoxní poměry proteinů, které jsou nezbytné pro opravu DNA a genovou expresi. Dále GSH plní důležitou úlohu při detoxikaci metabolitů xenobiotik a v procesu apoptózy se podílí na interakci s pro-apoptickými a anti-apoptickými signály (12,38,40).

Převaha oxidantů v intracelulárním prostředí vede k rychlé modifikaci SH-skupin proteinů. Podle počtu elektronů, které se na reakci podílejí, může proces probíhat jako dvouelektronová nebo jedoelektronová oxidace. Produktem jsou pak příslušné sulfenové kyseliny (protein-SOH) a thiolové radikály (GS[•]) (6-1).



Životnost takto vytvořených thiolových radikálů může být výrazně delší než u mnoha jiných radikálů. Vzniklé GS[•] mohou dimerizovat za vzniku neradikálového produktu GSSG (6-2):



Příliš vysoká koncentrace GSSG může oxidačně poškodit další enzymy. GSSG může dále reagovat se sulfhydrylovými skupinami (protein-SH) za vzniku protein-glutathion smíšených disulfidů (protein-SSG) (6-3):



Protein-SSG je dále redukován v glutathionovém cyklu prostřednictvím glutathion reduktázy a malých proteinů jako jsou glutaredoxin a thioredoxin za účelem obnovení -SH skupiny proteinů. Pokud však proces oxidace bílkovinných sulfhydrylů není zachycen GSH, vede další oxidace ke vzniku nevratně oxidovaných forem, jako jsou kyseliny sulfinové (protein-SO₂H) a sulfonové (protein-SO₃H) (12).

Karotenoidy

Karotenoidy, též tetraterpenoidy, jsou skupinou fytonutrientů produkovaných rostlinami, řasami, některými bakteriemi a houbami. Bylo identifikováno více než 1 100 karotenoidů, které se dělí do dvou hlavních skupin: xantofyly obsahující kyslík a karoteny, které jsou složeny pouze z uhlovodíků. Všechny karotenoidy mají základ ve struktuře tetraterpenu, který je tvořen z osmi izoprenových jednotek obsahujících 40 atomů uhlíku (33).

Antioxidační aktivita těchto látek vyplývá především z konjugovaného systému dvojných vazeb, které mají schopnost delokalizovat nepárové elektrony. β -karoten se tak vyznačuje vynikající schopností eliminovat singletový kyslík bez jakékoli degradace nebo chemické reaktivity karotenu s volnými radikály (12).

Díky dlouhému nenasycenému alkylovému řetězci jsou karotenoidy dobře rozpustné v tucích. Z toho důvodu hrají klíčovou roli, podobně jako vitamín E, v ochraně lipoproteinů a buněčných membrán před peroxidací lipidů, způsobenou především peroxylovými radikály (33).

Flavonoidy

Flavonoidy jsou exogenní antioxidanty s bohatou strukturní rozmanitostí. Jsou zastoupeny u vyšších rostlin a v některých dalších organismech schopných fotosyntézy. Dosud bylo identifikováno a charakterizováno více než 8 000 polyfenolových derivátů (12,33).

Jejich společným strukturním rysem je difenylpropanová část skládající se ze dvou aromatických kruhů spojených třemi atomy uhlíku, které spolu obvykle tvoří kyslíkatý heterocyklus (12).

Fenolické sloučeniny jsou terminátory řetězových reakcí volných radikálů a chelátory redoxně aktivních iontů kovů, které jsou schopny katalyzovat peroxidaci lipidů. Fenolické antioxidanty zasahují do oxidace lipidů a dalších molekul rychlou donací atomu vodíku radikálovým sloučeninám (12).

Fenolické sloučeniny však mohou působit i jako prooxidanty, pokud jsou přítomny ve vysokých koncentracích za přítomnosti kovů a v prostředí s vysokým pH (33).

2.2. Peroxid vodíku

Peroxid vodíku (H_2O_2) je dvouprvková anorganická sloučenina kyslíku vodíku. Atomy kyslíku jsou navzájem spojeny jednoduchou peroxidickou vazbou. Tato vazba je mimořádně nestabilní a snadno se štěpí. Produktem štěpení peroxidické vazby je pak vysoce nestabilní a reaktivní částice s nepárovým elektronem, tedy hydroxylový radikál (41,42).

V čistém stavu je H_2O_2 bezbarvá, až světle modrá viskózní kapalina s hustotou $1,44 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$. S vodou je volně mísitelný v jakémkoliv poměru. H_2O_2 má široké využití jako bělicí prostředek v papírenském, textilním i potravinářském průmyslu. V chemickém průmyslu má uplatnění při výrobě anorganických i organických sloučenin. Stabilizovaný 3% roztok H_2O_2 se používá v lékařství jako lokální antiseptikum (43,44).

2.2.1. Interakce peroxidu vodíku s živými systémy

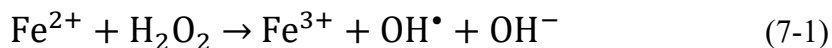
Peroxid vodíku je hlavní reaktivní formou kyslíku, která se vyskytuje v biologických systémech. Je vedlejším produktem aerobního dýchání, konečným produktem řady metabolických reakcí a také přenašečem buněčných signálů (45,46).

Ačkoli se jedná o silné oxidační činidlo, H_2O_2 nereaguje s většinou biologických molekul přímo, včetně nízkomolekulárních antioxidantů. Důvodem je vysoká aktivační energie potřebná k zahájení reakce, kterou H_2O_2 není schopen překonat. K přímé reakci H_2O_2 dochází s thioley, ovšem u většiny nízkomolekulárních thiolů a cysteinových zbytků je tato reakce pomalá. Nejsnadněji H_2O_2 reaguje s biomolekulami za přítomnosti iontů přechodných kovů vázaných v proteinech. Patří sem selenoproteiny, některé proteiny bohaté na thiolové skupiny, ochranné antioxidantní enzymy CAT, GPx, SOD a další peroxidázy (45).

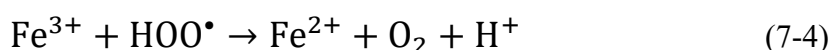
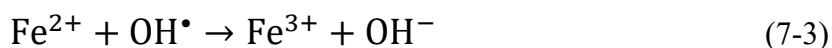
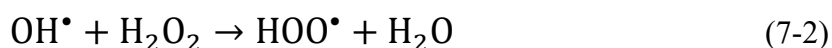
V abiotickém prostředí, při stálé teplotě a neutrálním pH je H_2O_2 stabilní. Důvodem jeho nestability, zejména v biologickém prostředí a při kontaktu s buňkami, je přítomnost železnatých kationtů (Fe^{2+}). Železo je široce využíváno všemi typy buněk při katalýze mnoha základních metabolických reakcí. Protože H_2O_2 snadno proniká buněčnou membránou, dochází v přítomnosti Fe^{2+} k jeho štěpení (47).

Hydroxylové radikály, jako produkt štěpení H_2O_2 za přítomnosti iontů železa, jsou schopny oxidovat širokou škálu substrátů a způsobovat jejich poškození. Soubor reakcí, při kterých se uplatňují oxidační i redukční vlastnosti H_2O_2 je označována jako Fentonova reakce. (48,49).

Principem reakce je zvýšení oxidačního potenciálu H_2O_2 v přítomnosti Fe^{2+} iontů v kyselém prostředí. Při této reakci daruje Fe^{2+} jeden elektron molekule H_2O_2 , což způsobí jeho rozklad (7-1) (47,50):



Vzniklý hydroxylový radikál a železité ionty se účastní dalších reakcí, které jsou součástí Fentonovy reakce (7-2 až 7-5) (50):



2.2.2. Poškození buňky vyvolané peroxidem vodíku

Vysoce toxické hydroxylové radikály vzniklé Fentonovou reakcí spouští kaskádu dějů, jejichž výsledkem je poškození lipidů, proteinů a DNA. Rychlost reakcí OH^\bullet je řízena difuzí, proto v místech jeho vzniku probíhají oxidační procesy. Důvodem je přítomnost přechodných prvků (železo nebo měď), které jsou nespecificky navázány právě na lipidy, proteiny a nukleové kyseliny. Reakcí s těmito komplexy (biomolekula-kov) vznikají poškozené molekuly zahrnující peroxidy lipidů, karbonylované řetězce proteinů nebo hydroxylované báze nukleových kyselin. Takto může vznikat nejméně pět hlavních tříd oxidačních poškození zprostředkovaných hydroxylovými radikály včetně oxidovaných bází, abázických míst, vnitrovláknových nebo mezivláknových aduktů DNA, zlomů řetězce DNA a příčných vazeb DNA-protein (51–53).

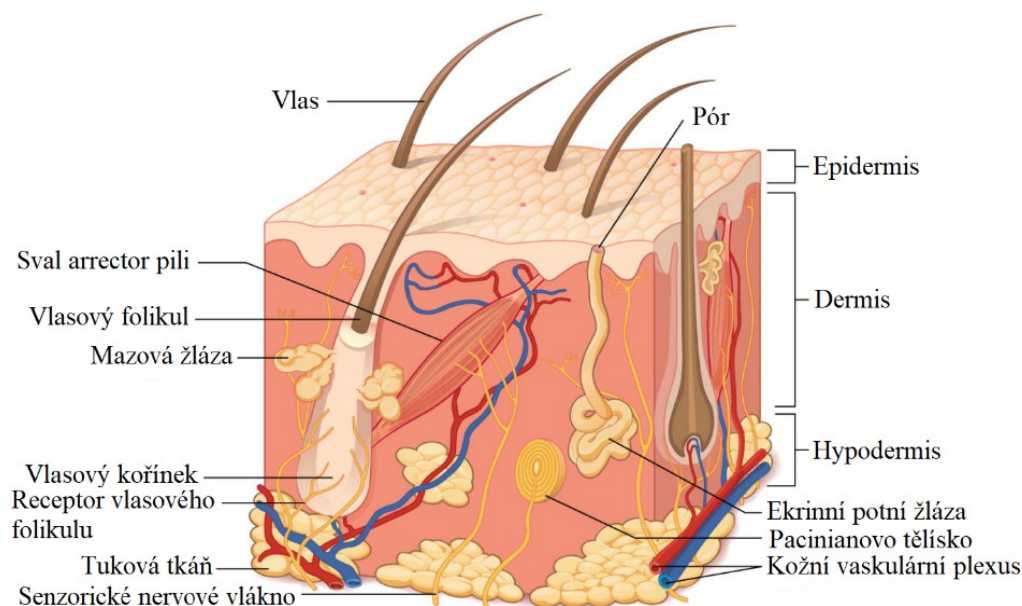
Signální dráhy v buňce následně reagují na tato poškození tím, že zahájí jeho opravu anebo eliminaci potenciálně škodlivých struktur iniciací apoptózy (54).

Pokud není možné poškození způsobené H_2O_2 opravit, spouští se kaskády dějů vedoucích k apoptóze nebo nekróze. Mechanismy apoptózy zahrnují molekulární děje závislé

na energii. Existují dvě hlavní cesty, jimiž apoptóza probíhá. Vnější cesta neboli dráha receptorů smrti a vnitřní cesta neboli mitochondriální dráha. Každá dráha aktivuje vlastní iniciátorovou kaspázu, která následně aktivuje efektorovou kaspázu-3. Štěpení kaspázy-3 vede k fragmentaci DNA, degradaci cytoskeletálních a jaderných proteinů, zesíťování proteinů, tvorbě apoptických tělísek a expresi ligandů pro fagocytární buněčné receptory. Nakonec jsou fragmenty buňky pohlceny makrofágy. Proces apoptózy probíhá bez přítomnosti zánětlivé reakce (55,56).

2.3. Kůže a její struktura

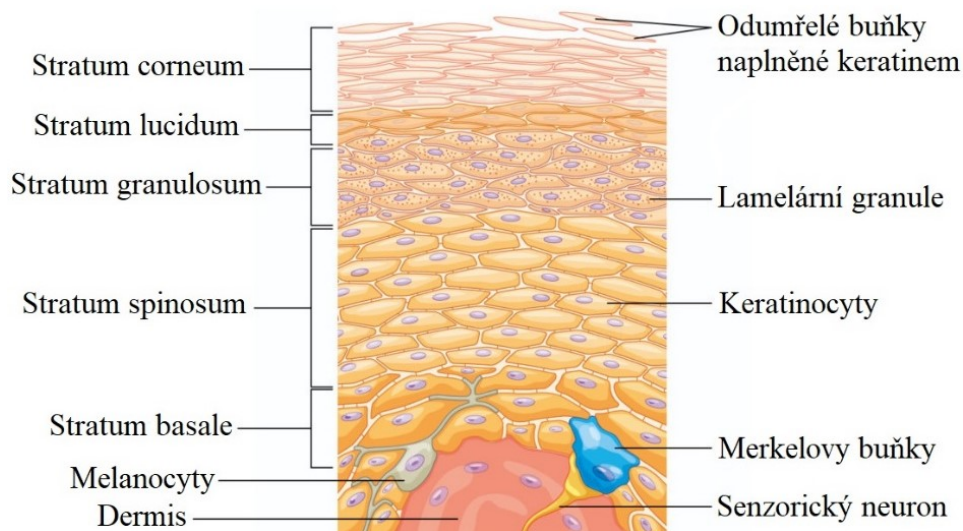
Kůže je největší orgán lidského těla a pokrývá celý jeho povrch. Je složena ze tří vrstev *epidermis* (pokožka), *dermis* (škára) a *hypodermis* (podkožní vazivo), přičemž každá vrstva se odlišuje jak anatomicky, tak i funkčně (Obr. 6). Kůže slouží jako bariéra proti fyzikálním, chemickým ale i biologickým faktorům. Udržuje tělesnou homeostázu, podílí se na regulaci teploty těla a hospodaření s vodou. Zároveň funguje jako endokrinní a exokrinní orgán. Endokrinní funkce kůže zahrnuje produkci vitamínu D a exokrinní funkci plní potní a mazové žlázy. Další důležitou úlohou je i senzitivní vnímání tepla, chladu, bolesti a tlaku (57,58).



Obr. 6 Struktura kůže a její vrstvy *epidermis*, *dermis* a *hypodermis* (zdroj: (57))

2.3.1. Epidermis

Nejsvrchnější vrstvou kůže je pokožka (*epidermis*). Je to dynamická neustále se dělící tkáň, ve které jsou buňky v nepřetržitém nesynchronizovaném pohybu. Je tvořena vrstevnatým dlaždicovým epitelem, který je složen z několika morfologicky odlišných vrstev keratinocytů, jejichž funkcí je tvorba nerozpustného skleroproteinu keratinu. Nejhlubší vrstvou *epidermis* je *stratum basale*. Na tuto vrstvu navazuje *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* a *stratum corneum* (Obr. 7) (1,59).



Obr. 7 Buňky keratinocytů tvořící *epidermis* (zdroj: (57))

Stratum basale (bazální vrstva) je nejhlubší vrstvou epidermis. Od *dermis* ji odděluje bazální lamina. Buňky se ve *stratum basale* vážou k *dermis* prostřednictvím propletených kolagenových vláken. V povrchové části *dermis* se rovněž nachází dermální papily v podobě výběžků. Tyto výběžky zvyšují pevnost spojení mezi *epidermis* a *dermis*. Nachází se zde také kmenové buňky kvádrového tvaru, které jsou mitoticky aktivní a neustále se diferencují v keratinocyty. Dalšími buňkami ve *stratum basale* jsou Merkelovy buňky. Tento typ buněk plní funkci kožních mechanoreceptorů. Nejvíce jich je lokalizováno na konečcích prstů na ruce a na nohou. Součástí *stratum basale* jsou také melanocyty, které produkují tmavě hnědý pigment melanin, který je zodpovědný za zbarvení kůže do různých odstínů hnědé. Akumulace melaninu v pokožce způsobuje její ztmavnutí, dodává vlasům barvu a též pomáhá chránit buňky *epidermis* před poškozením UV zářením. Do keratinocytů se melanin přenáší prostřednictvím buněčné vesikuly zvaného melanosom. Melanosomy jsou dočasné struktury, které jsou nakonec degradovány fúzí s lysozomy. Díky odlupování svrchní vrstvy

keratinocytů je ztmavnutí pokožky způsobené slunečním zářením nestálé. Nepravidelné hromadění melanocytů v kůži se projevuje v podobě pigmentových skvrn nebo pih (57,58,60).

Stratum spinosum (vrstva ostnatých buněk) se skládá z 8 až 10 vrstev keratinocytů, které vznikly v důsledku buněčného dělení ve *stratum basale*. Keratinocyty zde zahajují syntézu keratinu. Ten díky tvorbě a sekreci lipidů poskytuje *epidermis* odolnost vůči vodě. Nové keratinocyty jsou produkovány ve *stratum basale* a vytlačují ostatní keratinocyty ze *stratum spinosum* do *stratum granulosum*. Nacházejí se zde také nepravidelné, polyedrické buňky s cytoplazmatickými prostory a dendritické buňky, které jsou rozptýleny mezi keratinocyty. Jedná se o Langerhansovy buňky, které mají funkci makrofágů. Pohlcují bakterie, cizí částice a poškozené buňky vyskytující se v této vrstvě. Langerhansovy buňky se diferencují v kostní dřeni a jsou součástí specifické imunity (1,57,60).

Stratum granulosum (vrstva zrnitých buněk) obsahuje 3 až 5 buněčných vrstev. Buňky se směrem k povrchu zplošťují a jejich buněčné membrány se ztlušťují. Zároveň také generují keratin, který je vláknitý a keratohyalin, který se hromadí v podobě lamelárních granul. Lamelární granula obsahují glykolipidy, které se vylučují na povrch buněk a drží je pohromadě. Tyto dva proteiny tvoří většinu hmoty keratinocytů ve *stratum granulosum* a dodávají této vrstvě zrnitý vzhled (58,60).

Stratum lucidum (vrstva jasných buněk) je tvořena 2 až 3 vrstvami buněk přítomných v místech silnější kůže jako jsou dlaně nebo chodidla. Je to hladká, tenká a zdánlivě čirá vrstva. Keratinocyty, tvořící tuto vrstvu, jsou již mrtvé a zploštělé. Buňky keratinocytů jsou vyplněny proteinem bohatým na lipidy tzv. eleidenem. Tento protein dodává keratinocytům jejich průhledný vzhled a vytváří hydrofobní bariéru (57,58).

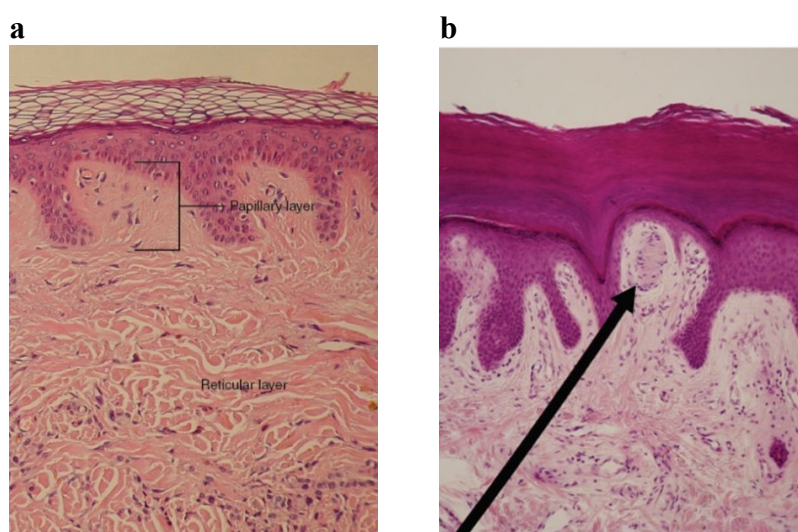
Stratum corneum (zrohovatělá vrstva) tvoří 20 až 30 buněčných vrstev, které jsou přímo vystaveny vnějšímu prostředí. Tato vrstva je tvořena keratinem a rohovitými šupinami z odumřelých keratinocytů. Vytváří tak bariéru, chránící spodní vrstvy *epidermis* před možným průnikem mikroorganismů, dehydratací a mechanickým poškozením. Buňky se zde uvolňují do okolního prostředí a jsou nahrazovány buňkami ze *stratum granulosum* nebo, v případě dlaní a chodidel, ze *stratum lucidum*. Celý tento proces vývoje keratinocytů, vedoucí ke vzniku *stratum corneum*, je nazýván terminální diferenciací (1,57,58).

2.3.2. Dermis

Dermis je střední vrstva kůže, chrání tělo před mechanickým poškozením, pomáhá při tepelné regulaci a obsahuje receptory pro smyslové vnímání. Neustále interaguje s *epidermis*

a obě tyto vrstvy se vzájemně ovlivňují při reparaci a přestavbě pokožky během hojení ran. *Dermis* se skládá ze dvou vrstev – papilární a retikulární (Obr. 8a). Obě vrstvy jsou tvořeny pojivovou tkání, která je propojenou sítí elastinu a kolagenních vláken (1,59).

Horní papilární vrstva vytváří prstovité dermální výběžky směrem k *epidermis*. Uvnitř papilární vrstvy jsou buňky pojiva (fibroblasty), malý počet tukových buněk (adipocytů) a množství malých cév. Papilární vrstva také obsahuje fagocyty jako složku imunitního systému, které pomáhají eliminovat bakterie nebo jiné patogeny, které mohou proniknout do kůže. Tato vrstva rovněž obsahuje lymfatické kapiláry, nervová vlákna a hmatové mechanoreceptory tvořené Meissnerovými tělísky (Obr. 8b) (1,57).



Obr. 8 Histologický preparát *dermis* a) papilární a retikulární vrstva, b) Meissnerovo tělíčko (šipka), zvětšeno 10 x (zdroje: modification of work by "kilbad"/Wikimedia Commons) (57))

Na papilární vrstvu navazuje vrstva retikulární, která je složená z husté nepravidelné pojivové tkáně. Tato vrstva je dobře prokrvená a bohatě inervována sensorickými nervovými vlákny a sympatikem. Elastinová vlákna dodávají pokožce pružnost a umožňují její pohyb. Kolagenová vlákna poskytují opěrnou strukturu a pevnost v tahu. Vlákna kolagenu zasahují jak do papilární vrstvy, tak i do *hypodermis*. Kolagen navíc váže vodu a udržuje pokožku hydratovanou. V *dermis* jsou dále umístěny potní žlázy, vlasové folikuly, nervy, krevní a lymfatické cévy a svaly vzpřimovače chlupů (57–59).

2.3.3. Hypodermis

Hypodermis je nejhlubší vrstvou kůže. Obsahuje řídké kolagenní vazivo, kterým je tato vrstva připevněna k podkladu (sval, kůže). V kolagenním vazivu jsou pak vmezeřeny

ostrůvky tukové tkáně, které obsahují adipocyty. Tyto buňky slouží jako mechanicko-tepelně-izolační vrstva a rovněž jako energetická rezerva. Velikost tukové vrstvy je závislá na tělesné lokaci, nutričním stavu a pohlaví jedince. Dále jsou zde uloženy sensorické neurony a větší cévy (58,59).

2.4. Fyziologický význam kůže

2.4.1. Ochranná funkce

Kůže mechanicky chrání tělo před přírodními živly jako je vítr, voda a sluneční záření. Díky keratinu a glykolipidům v rohové vrstvě *epidermis* působí jako ochranná bariéra proti ztrátám vody. Dále tvoří první obrannou linii zabraňující průniku patogenů nebo škodlivých chemických látek. Potní žlázy, vylučující pot, brání mikrobům v nadměrném osídlení povrchu kůže a zároveň napomáhají ochlazování organismu (60,61).

2.4.2. Termoregulační funkce

Kůže přispívá k regulaci tělesné teploty díky těsnému spojení se sympatickým nervovým systémem. Parasympatikus kůži neinervuje. Sympatický nervový systém nepřetržitě monitoruje tělesnou teplotu a iniciuje příslušné motorické reakce. Když teplota těla překročí určitou mez, potní žlázy vylučují na povrch kůže vodu, sůl a další látky. Vlivem odpařování vody z povrchu *epidermis* dochází k ochlazování kůže. Denně dojde k vyloučení přibližně 500 ml potu. Při nadměrné zátěži je množství potu větší (57,61).

Kromě termoregulace prostřednictvím odpařování potu, dochází i k rozšiřování arteriol v *dermis* a přebytečné teplo se tak odvádí přes kůži do okolního prostředí. To vysvětluje zarudnutí pokožky při nadměrném zahřátí. Naopak při poklesu tělesné teploty dochází ke zúžení arteriol, aby se minimalizovaly tepelné ztráty. Děje se tak zejména na konečcích prstů nebo na špičce nosu. Kůže pak získává bílý odstín z důvodu nízkého prokrvení. Přestože teplota kůže klesá, hlouběji uložené struktury organismu jsou chráněny před pasivními tepelnými ztrátami (57,61).

2.4.3. Smyslová funkce

Díky přítomnosti nervových zakončení je prostřednictvím kůže vnímáno mnoho senzitivních vjemů různé povahy. Jedná se o receptory doteku, tepla, chladu nebo bolesti.

Meissnerovy tělíška a Merkelovy buňky pak reagují na lehký dotyk. Pacinianova lamelová tělíška reagují na vibrace. Kromě těchto receptorů jsou součástí kůže i senzitivní nervy vedoucí k jednotlivým vlasovým folikulům (57,62).

2.4.4. Syntéza vitamínu D

Vitamin D₃ (cholekalCIFerol) je syntetizován v epidermální vrstvě kůže pomocí UV-B záření o vlnové délce 290 až 320 nm. Vlivem tohoto záření dochází k přeměně 7-dehydrocholesterolu na previtamin D₃, přičemž dalším krokem tepelné izomerizace vzniká vitamin D₃. Tento vitamin není biologicky účinný, dokud nedojde k jeho aktivaci pomocí enzymatické hydroxylace. V játrech se nejprve přeměňuje na 25-hydroxyvitamin D₃ (kalcidiol). Poté dojde v ledvinách k přeměně na aktivní formu 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (kalcitriol) (61,63).

Vitamin D₃ je nezbytný pro fyziologické vstřebávání a udržování sérových koncentrací vápníku a fosforu prostřednictvím kontroly střevní absorpce vápníku, renální resorpce fosforu a uvolňování vápníku ze skeletu (57,63).

2.5. Kožní buňky a oxidační stres

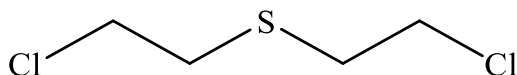
Kůže tvoří významnou bariéru mezi vnitřním a vnějším prostředím. Je tedy vystavena působení nejen fyzikálním vlivům jako je záření UV-A, UV-B, viditelnému světlu či tepelnému infračervenému záření, ale i chemickým látkám pocházejícím ze znečištěného životního prostředí, včetně ozonu a pevných částic. Nadměrné množství volných radikálů, ROS a RNS negativně ovlivňují pigmentaci a stárnutí kůže, které dále vede k nerovnoměrnosti barevného tónu pleti, pigmentovým poruchám, drsnosti pleti, vráskám a celkově jejímu poškození. Ke správné funkci kůže přispívá i její mikrobiom. Ten může být narušen jmenovanými faktory, což má za následek vytvoření nerovnováhy vedoucí k různým kožním onemocněním (11).

2.6. Sirný yperit

Sirný yperit bis(2-chlorethyl)sulfid je vysoce toxická organická sloučenina patřící do skupiny zpuchřujících bojových chemických látek (Obr. 9). Použití sirného yperitu jako bojového prostředku je zakázáno na základě mezinárodní úmluvy „Úmluva o zákazu vývoje,

výroby, hromadění zásob a použití chemických zbraní a o jejich zničení“, která byla Parlamentem České republiky ratifikována v roce 1995 (5,64).

Sirný yperit byl použit během první světové války jako první bojová chemická látka, která byla za tímto účelem vytvořena. Dále pak byl nasazen i během několika dalších konfliktů včetně Irácko-iránské války v letech 1980–1988 nebo během občanské války v Sýrii, která začala v roce 2011 (64).



Obr. 9 Strukturní vzorec sirného yperitu (zdroj: (4))

V čistém stavu je destilovaný sirný yperit čirá, bezbarvá olejovitá kapalina. Tuhne již při +14 °C a vře při +218 °C. Přítomnost produktů degradace nebo vedlejších produktů syntézy sirného yperitu způsobuje žluté až tmavě hnědé zbarvení kapaliny, která pak získává i charakteristický zápach po hořčici, křenu či spálené gumě. Sirný yperit je špatně mísitelný s vodou a podléhá hydrolytickému rozkladu. V tucích a organických rozpouštědlech je však velmi dobře rozpustný, což předurčuje jeho snadný průnik nejen skrz textilie, ale především jeho snadnou absorpci pokožkou. Kvůli jeho destruktivním vlastnostem při kontaktu s živou tkání a nepřítomnosti kauzálního antidota je sirný yperit velice nebezpečnou látku (65).

2.6.1. Projevy akutní toxicity sirného yperitu

Branami vstupu sirného yperitu do lidského organismu jsou kůže, dýchací cesty, oči a minoritně i gastrointestinální trakt. Vzniku prvních klinických příznaků předchází různě dlouhé bezpříznakové období. Délku této periody ovlivňuje celá řada faktorů, z nichž nejvýznamnější jsou skupenství sirného yperitu (kapalina, aerosol, pára), zasažený orgán (oči jsou nejvíce citlivé), vlhkost, teplota a mechanické namáhání postiženého místa (podpaží, oblast genitálu) (65–67).

Klinický obraz otravy je dobře známý z tisíců obětí během první světové války. Sirný yperit způsobuje na exponované kůži typické velké puchýře vyplněné čirým nažloutlým exsudátem. Vznik puchýře je důsledkem toxické dermo-epidermální nekrolýzy struktur v oblasti spodní vrstvy bazální membrány na rozhraní *dermis* a *epidermis*. Po separaci obou vrstev se pak ve vzniklém prostoru začne hromadit tekutina, která tento prostor dále rozšiřuje a zvětšuje. Tím dochází ke vzniku rozsáhlých puchýřů. Poškození dýchacích cest je

provázeno poškozením tracheobronchyální sliznice s postupným rozvojem plicního edému, hemoragické bronchitidy a tvorbou pseudomembrám. Všechny tyto komplikace velmi znesnadňují dýchání, a tedy i dostatečné zásobování organismu kyslíkem (4,66).

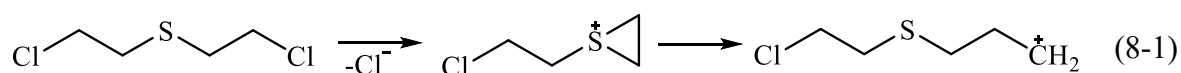
Zasažené oči reagují na přítomnost sirného yperitu do jedné hodiny. Klinické příznaky se projevují otokem očních víček, zánětlivou reakcí spojivky, fotofobií a silnou bolestí. Přechodná slepota je pak způsobena křečovitým sevřením víček, tzv. blefarospasmem (4,66).

Po průniku do krevního řečiště se sirný yperit dostává až k mitoticky aktivním buňkám kostní dřeně, kde svým cytostatickým působením zastavuje krvetvorbu. Rozsáhlé poškození organismu, útlum imunitního systému a vysoké riziko sekundární infekce pak klade velké nároky na péči o postiženého. Rekonvalescence je značně zdlouhavá a provázená mnoha přidruženými komplikacemi. Na základě poznatků zjištěných na několika tisících obětech chemického útoku sirným yperitem během Irácko-iránské války trpí tito lidé řadou pozdních následků expozice. Nejčastěji se jedná o chronickou obstrukční plicní nemoc, plicní fibrózu, opakující se vředovou chorobu rohovky, chronický zánět spojivek, abnormální pigmentaci či depigmentaci kůže a zvýšený výskyt nádorových onemocnění (4,66).

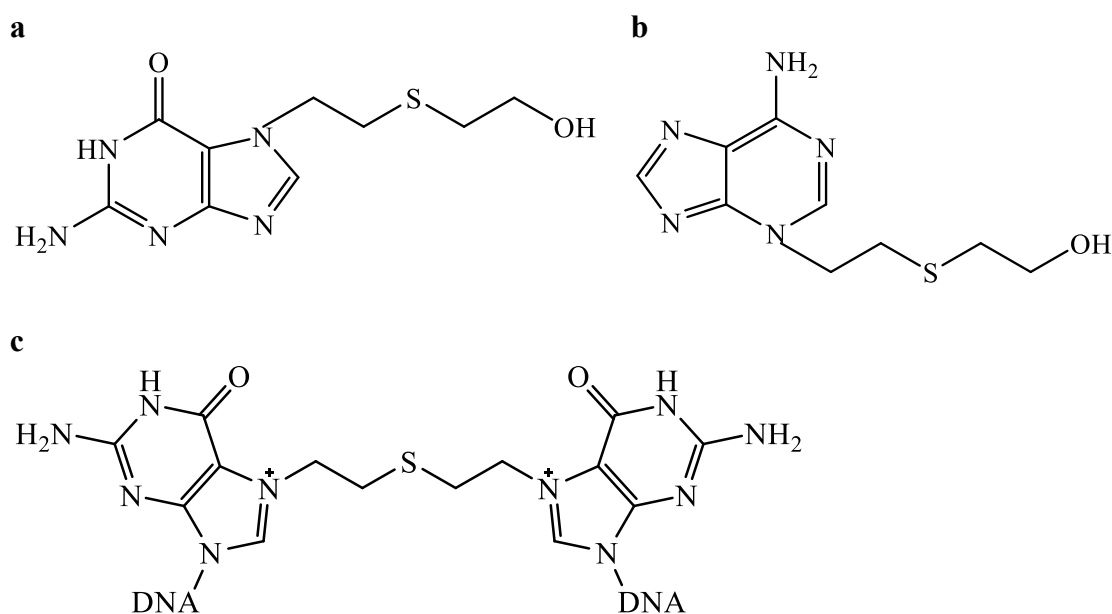
2.6.2. Cytotoxické účinky sirného yperitu

Toxicita sirného yperitu se na buněčné úrovni projevuje několika mechanismy. Jedná se o alkylační poškození makromolekul včetně DNA, inhibici glykolýzy, vyčerpání intracelulárních zásob nikotinamidadenindinukleotidu (NAD^+), zvýšení intracelulární hladiny vápníku, zvýšení hladiny mediátorů apoptózy, oxidační stres, zánět a vyčerpání buněčných antioxidantů (68).

Sirný yperit je ve vodném prostředí vysoce reaktivní. Tato reaktivita je způsobena přítomností chlormethylové skupiny, která se vyznačuje vysokou polaritou. V polárním prostředí dochází k intramolekulární cyklizaci sirného yperitu a vzniku nestabilního meziprojektu 1-(2-chlorethyl)thiiranium chloridu. Vlivem silného vnitřního pnutí sulfoniového iontu dochází k otevření propanového heterocyklu za vzniku vysoce reaktivního karbokationtu (8-1). Tento silný elektrofil reaguje mechanismem nukleofilní substituce se sloučeninami bohatými na elektrony, jako jsou sulfhydrylové skupiny (-SH) nebo aminoskupiny (-NH₂) přítomné v DNA, RNA, proteinech a dalších sloučeninách (4,67).



Sirný yperit ovlivňuje DNA buď přímo interakcí s nukleotidy, nebo nepřímo ovlivněním replikačního a transkripčního systému DNA. Při přímé interakci sirného yperitu s molekulami DNA dochází k tvorbě jednoduchých nebo dvojitých alkylačních aduktů. Monoadukty sirného yperitu vznikají převážně s molekulou guaninu v poloze N7 (N7-hydroxyethylthioethyl-guanin, Obr. 10a). Méně často vznikají na adeninu v polohách N1 a N3 (N3-hydroxyethylthioethyl-adenin, Obr. 10b). Monoadukty, které obsahují v molekule 2-chlorethylový řetězec, dále reagují s bázemi na stejném nebo protilehlém vlákně DNA za vzniku vnitřetězcových nebo meziřetězcových příčných vazeb v podobě bifunkčních aduktů jako je bis(N7-guanin-ethyl)sulfid (Obr. 10c). Tyto bifunkční adukty vytváří kovalentní spojení komplementárních řetězců DNA, které jsou za normálních okolností propojeny pouze vodíkovými můstky (69,70).



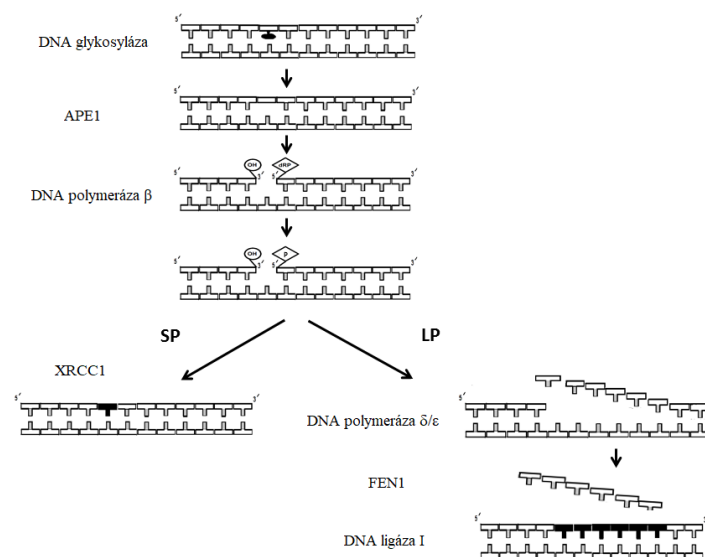
Obr. 10 Strukturální vzorec a) N7-hydroxyethylthioethyl-guaninu, b) N3-hydroxyethylthioethyl-adeninu a c) bis(N7-guanin-ethyl)sulfidu (zdroj: (71))

Tyto patologické modifikace vedou ke vzniku genotoxického stresu, dvouřetězcových zlomů DNA, k modifikacím proteinů nebo genomu, zástavě replikačních a transkripčních pochodů v DNA, zástavě buněčného cyklu, apoptóze nebo nekrotické buněčné smrti. Sirný

yperit též může interagovat přímo s proteiny a narušovat jejich normální funkce prostřednictvím alkylačního poškození. Dalším cílem sirného yperitu jsou lipidy, které mohou být peroxidovány za tvorby volných radikálů jako vedlejších produktů reakce (68).

Aby buňka mohla reagovat na kritické poškození DNA, je nutno toto poškození nejprve detekovat prostřednictvím senzoričkových proteinů. Existují tři vzájemně propojené systémy schopné rozpoznat poškození DNA. Patří mezi ně kinázy jako ataxia-telangiectasia mutated (ATM), ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR) a DNA-dependentní proteinkináza (DNA-PK). Vlivem těchto enzymů se spouští kaskáda reakcí, která aktivuje proteiny důležité pro přežití buňky nebo proteiny iniciující buněčnou smrt. Aktivací kontrolního bodu se zastaví buněčný cyklus a aktivují se proteiny pro opravu DNA (72).

Hlavními reparačními mechanismy DNA jsou reparace excizí bází (BER), reparace excizí nukleotidů (NER), homologní rekombinace (HR) a nehomologní spojování konců (NHEJ). Při reparaci alkylových aduktů se využívají především dráhy BER a NER. Při dráze BER specifická DNA glykosyláza nejprve rozpozná léze a katalyzuje odstranění poškozené báze štěpením glykosylové vazby. Po odstranění zde zůstává abázické místo. Poté endonukleáza APE1 přeruší řetězec DNA a vytvoří jednovláknový zlom. Prostřednictvím DNA polymerázy β dojde k vložení jednoho nukleotidu a odstranění 5'-deoxyribózového fosfátu (5'-dRP). Vzniklý zlom uzavírá DNA ligáza III-XRCC1 a dochází k vytvoření krátké záplaty (SP) (Obr. 11 SP). Pokud poškození nelze opravit krátkou záplatou, probíhají opravy pomocí dlouhé záplaty (LP). DNA polymeráza δ/ϵ přivádí dva až osm nukleotidů za abázické místo. Převíslá DNA je zde vyříznuta prostřednictvím endonukleázy FEN1 a DNA ligáza I poté uzavře vzniklý zářez (Obr. 11 LP) (69,73,74).



Obr. 11 Schématické znázornění dráhy BER a reparace poškození cestou krátké a dlouhé záplaty (zdroj: (71))

Dráha NER je zprostředkována postupným sestavováním opravných proteinů v místě poškození DNA. NER je složitější než dráha BER a vyžaduje přibližně třicet různých opravných proteinů, které jsou součástí několika krokového mechanismu. Tyto kroky zahrnují rozpoznání poškození, lokální denaturaci dvoušroubovicové struktury DNA, vyříznutí krátkého jednořetězcového úseku DNA přesahujícího lézi, postupnou syntézu nového řetězce prostřednictvím DNA polymerázy δ a ligaci vláken DNA ligázou I (69,75).

Dalším metabolickým účinkem yperitu, co se týče akutní toxicity, je inhibice buněčné glykolýzy. Narušení této metabolické dráhy se děje v důsledku interference s hexokinázami bohatými na SH-skupiny. Inhibice glykolýzy je však nepřímým důsledkem poškození a opravy nukleových kyselin. Zpočátku, kdy yperit rychle alkyluje purinové báze DNA (guanin a adenin), dochází k aktivaci endonukleáz. Ty depurinací odstraňují alkylované báze a ponechávají v DNA apurinová místa, kde snadno dochází ke zlomům. Potřeba opravy DNA aktivuje jaderný enzym poly(ADP-ribózu)polymerázu typu 1 (PARP-1), která je rozhodujícím faktorem mezi iniciací apoptózy nebo nekrózy. Aktivace PARP-1 stimuluje opravu poškozené DNA, která je však energeticky náročná, a vede k vyčerpání substrátu NAD^+ . Deplece buněčného NAD^+ , která začíná během hodiny po expozici a dosahuje maxima přibližně po čtyřech hodinách, inhibuje glykolýzu. Tím dochází i k inhibici tvorby energie ve formě adenosintrifosfátu (ATP) v buňce. ATP je také spotřebováno na resyntézu NAD^+ . V důsledku ztráty intracelulárního ATP poté dochází k nekrotické buněčné smrti. Při lehčích expozicích siriému yperitu iniciuje PARP-1 rovněž opravu DNA. Pokud poškození není opravitelné, následuje apoptóza a PARP-1 se štěpí. Tyto biochemické změny probíhají souběžně s rozvojem poškození tkáně (66,67,69).

2.6.1. Účinky siriého yperitu na kůži

Sirný yperit způsobuje, v závislosti na intenzitě expozice a dalších faktorech, poškození kůže, které lze klasifikovat jako mírné, středně těžké a těžké. Mírná poranění, jako je erytém, otok a popáleniny prvního stupně se vyskytují po expozici parám o koncentraci $50 \text{ mg}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-3}$ nebo přímým kontaktem kapalně fáze s kůží při aplikaci $0,1$ až $1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Středně těžké poranění, včetně těžkého otoku a puchýřů následuje po přímé aplikaci kapalně fáze v množství 1 až $2,5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Těžká poranění způsobují lokální nekrózu obklopenou šířící se vezikulací. Taková poškození vznikají při dávkách 200 až $1\ 000 \text{ mg}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-3}$ nebo při přímém zasažení kůže kapalnou fází v množství více než $2,5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Projevy dermální toxicity se zvyšují i s rostoucí teplotou a vlhkostí zasaženého místa. Nejcitlivější k poškození

jsou ty části těla, kde je vyšší výskyt potních žláz jako je krk, podpaží, loketní a podkolenní jamky nebo třísla (65,67).

První mikroskopické změny tkáně začínají 3 až 6 hodin po expozici. Ve vrstvě bazálních keratinocytů v *epidermis* zpočátku dochází k degeneraci buněčných jader a ztrátě karyoplazmy. Postupné zahuštění obsahu jader vede k jejich pyknotickému vzhledu. Progrese poškození má za následek degeneraci buněk bazálních keratinocytů, tvorbě intracelulárních a extracelulárních vakuol, rozpuštění bazální buněčné vrstvy a oddělení *dermis* od *epidermis*. Formuje se tak prostor vymezený vrstvou *epidermis* a *dermis*, ve kterém se počíná hromadit tkáňový mok. Vznikající puchýř se poté vyvíjí ještě několik dní od expozice (67).

Hojení kožních lézí po zasažení sirným yperitem je dlouhodobé a odvíjí se od závažnosti poškození. Léčba je symptomatická. Po mírných expozicích se erytém obvykle zahojí během několika dní. Závažnější poranění vyžadují léčbu jako u popálenin druhého stupně. V závislosti na celkové zasažené ploše a hloubce erytému, může rekonvalescence trvat několik týdnů až měsíců. Při těžkých poškozeních kůže spojené s velkými puchýři může být indikováno jejich chirurgické odstranění včetně přilehlé nekrotické tkáně. Proces hojení pak může být urychlen transplantací kožních štěpů. Protože se jedná o léčbu špatně se hojících ran, je celková terapie komplikována vysokou náchylností k sekundární infekci (4,67).

2.6.2. Mutagenní potenciál sirného yperitu

Sirný yperit byl první chemickou látkou s prokázanými mutagenními účinky. Tyto účinky se projevují zejména po dlouhodobé nebo opakované expozici. I krátká expozice však může způsobit chromozomální poškození. Ačkoli většina buněk disponuje účinnými opravnými mechanismy DNA, v případě jejího poškození sirným yperitem nejsou vždy plně účinné a bezchybné. Genotoxické účinky sirného yperitu zahrnují alkylační poškození DNA, tvorbu kovalentních meziřetězcových vazeb, alkylační modifikaci bází, zástavu buněčného cyklu, inhibici syntézy a opravy DNA, bodové mutace a indukci aberací chromozomového a chromatidového typu. To vše může být molekulárním podkladem pro vznik nádorového bujení (67,66,70).

2.6.3. Trvalé změny v buňce vyvolané sirným yperitem

Většina kožních lézí způsobených kontaktem s parami sirného yperitu se poměrně rychle hojí a pokud nedojde k jejich sepsi, dochází obvykle k úplnému zhojení do čtyř týdnů.

Poškození DNA kožních buněk, které je chybně opraveno, může vést k vysoce frekventovaným mutacím a pozdním následkům. Ty se projevují v průběhu během různě dlouhého období (až desítky let) od expozice (65,76,77).

Chronické potíže se projevují v podobě nádorových onemocnění, neuropatických bolestí, trvalých změn oční rohovky či spojivky, kůže a dýchacího ústrojí. Objevuje se rakovina hrtanu, plic, rakovina kůže nebo leukémie. Mezi obtížemi respiračního charakteru se může rozvinout astma bronchiale, fibróza plic, bronchiektázie, chronická obstrukční plicní nemoc, plicní infekce nebo poškození hlasivek. Trvalé kožní problémy jsou též velmi různorodé. Projevují se zvýšenou suchostí a citlivostí kůže, pocity svědění nebo pálení, zvýšené pocení, hypopigmentací nebo naopak hyperpigmentací, alopecií a vyrážkami. Trvalé následky zasažení oka mohou mít za příčinu neostřý vizus, světloplachost, zjizvení rohovky, keratitidu, zákal oční čočky nebo neovaskularizaci rohovky (4,76).

3 Cíl práce

Cílem práce je porovnat dvě buněčné linie v odpovědi na oxidační stres vyvolaný peroxidem vodíku. Buněčná linie HaCaT, která je tvořena buňkami lidských spontánně imortalizovaných keratinocytů byla porovnáována s buňkami 3HSM4. Tyto buňky byly experimentálně odvozeny od rezistentních klonů buněčné linie HaCaT, která byla opakovaně vystavena cytotoxickým účinkům sirného yperitu. Rozdíly v reakci na oxidační stres mohou indikovat mechanismus, jakým by mohly být původní buňky HaCaT vlivem sirného yperitu pozměněny.

4 Experimentální část

4.1. Seznam chemikálií

- dodecylsírán sodný (Sigma-Aldrich, USA)
- peroxid vodíku 30 % (Sigma-Aldrich, USA)
- Acetyléster 5-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetátu (Life Technologies Corporation, USA)
- Komerční kit: Count[®] & Viability (Luminex Corporation, USA)
- Dimethyl sulfoxid (Sigma-Aldrich, USA)
- Disodná sůl para-nitrofenylfosfátu (Thermo Scientific, USA)
- Dulbecco's Modified Eagle's High Glucose Medium (Biosera, Francie)
- Fetální bovinní sérum (Biosera, Francie)
- Fyziologický roztok pufovaný fosfáty (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich, USA)
- Glutamin (Biosera, Francie)
- Hydroxid sodný (Penta, ČR)
- Kyselina octová 99 % (Penta, ČR)
- L-buthionin-sulfoximin (Sigma-Aldrich, USA)
- Monochlorobiman (Life Technologies Corporation, USA)
- Octan sodný trihydrát (Lachema, Neratovice)
- Penicillin-Streptomycin (Biosera, Francie)
- Trypsin EDTA (Biosera, Francie)
- Triton x-100 (Sigma-Aldrich, USA)
- Komerční kit: Muse Annexin V & Dead Cell Assay, kat. č. MCH100105 (Luminex Corporation, USA)
- Komerční kit: Muse Mitopotential Kit, kat. č. MCH100110 (Luminex Corporation, USA)
- Komerční kit: Muse Caspase-3/7 Kit, kat. č. MCH100108 (Luminex Corporation, USA)
- Komerční kit: Muse Multi-Color DNA Damage Kit, kat. č. MCH200107 (Luminex Corporation, USA)

4.2. Příprava roztoků

Kompletní medium pro kultivaci buněk

Kompletní Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) obsahovalo 10 % fetálního bovinního séra (FBS), 1 % roztoku antibiotik (penicilin-streptomycin) a 2 mmol·l⁻¹ glutaminu. Pro přípravu media bylo suplementováno 450 ml DMEM 5 ml glutaminu, 5,5 ml roztoku antibiotik a 50 ml FBS. Hotové medium bylo označeno datem přípravy a uchováváno při teplotě 4 °C.

Zásobní roztok disodné soli para-nitrofenylfosfátu

Na 100 ml zásobního roztoku disodné soli para-nitrofenylfosfátu (*p*NPP) o koncentraci 50 mmol·l⁻¹ bylo naváženo 1,8557 g *p*NPP. Navážka byla převedena do odměrné baňky o objemu 100 ml, rozpuštěna a roztok byl doplněn sterilní destilovanou vodou po rysku. Následovala sterilizace roztoku přes membránový filtr (0,22 μm) a roztok byl rozplněn po alikvotech o objemu 1 ml. Alikvoty byly skladovány při teplotě -18 °C.

Acetátový pufr

Na 1 000 ml acetátového pufru bylo naváženo 13,608 g trihydrátu octanu sodného, který byl rozpuštěn v 900 ml destilované vody. Následně byla provedena úprava pH na hodnotu 5,5 přidáním několika ml zředěného roztoku koncentrované kyseliny octové. Na závěr bylo k roztoku přidáno 1 000 μl Tritonu x-100. Pufr byl následně převeden do odměrné baňky o objemu 1 litr a doplněn destilovanou vodou po rysku.

1 N hydroxid sodný

Na přípravu 1 N roztoku NaOH bylo naváženo 10 g NaOH. Po rozpuštění ve 150 ml destilované vody byl roztok převeden do 250 ml odměrné baňky a doplněn po rysku.

Roztok dodecylsíranu sodného

5% roztok dodecylsíranu sodného (SDS) byl připraven navážením 5 g SDS a po rozpuštění byl roztok doplněn sterilní destilovanou vodou na 100 ml.

4.3. Seznam přístrojů a pomůcek

- Centrifuga (Hettich, Německo)
- CO₂ inkubátor (Binder, Německo)
- Laminární box (EuroClone S.p.A., Itálie)
- Spektrofotometr Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (Biotek, USA)
- Mikrotitrační destička pro měření fluorescence (BRAND GMBH + CO KG, Německo)
- Multikanálová pipeta Xplorer Plus (Eppendorf, Německo)
- Mikropipety (Eppendorf, Německo)
- Sterilní plastové pomůcky pro kultivaci buněk (TPP, Švýcarsko; Corning, USA; Costar, USA)
- Vodní lázeň (Polyscience, USA)
- 24jamková transparentní destička (Corning Incorporated, USA)

4.4. Biologický materiál

- buněčná linie HaCaT (CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Německo)
- buněčná linie 3HSM4 byla izolována jako rezistentní klon buněk, které byly opakovaně vystaveny působení sirného yperitu (Katedra toxikologie a vojenské farmacie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Česká republika)

4.5. Kultivace buněk HaCaT a 3HSM4

Linie buněk HaCaT a 3HSM4 byly kultivovány v kompletním mediu DMEM. Inkubace buněk probíhala při 37 °C v CO₂ inkubátoru za přítomnosti 5 % oxidu uhličitého a 95–99 % relativní vzdušné vlhkosti. Buňky byly kultivovány v kultivačních lahvích o velikosti plochy dna 75 cm².

4.6. Pasážování buněk a nasazení buněk do mikrotitračních destiček

Následující postup je shodný pro obě použité buněčné linie. Z kultivační lahve bylo odsáto medium DMEM a buňky byly opláchnuty 4 ml PBS. Převodění adherentních buněk do suspenze bylo provedeno přidáním 2 ml roztoku trypsinu/EDTA. Po 15 minutách inkubace při teplotě 37 °C byla suspenze pipetována z kultivační lahve do 15 ml zkumavky a doplněna do objemu 14 ml mediem DMEM. Následovala centrifugace při 600 otáčkách za minutu po dobu 4 minut. Supernatant byl odsán a peleta resuspendována v 1 ml media DMEM. Suspenze byla následně doplněna na objem 10 ml a promíchána. Poté byl stanoven počet buněk a suspenze byla naředěna v mediu DMEM tak, aby v každé jamce mikrotitrační destičky bylo 10 000 buněk ve 100 μ l media.

Za účelem měření absorbance (test viability buněk) byly buňky linie HaCaT i linie 3HSM4 nasazeny do transparentní 96jamkové destičky s plochým dnem. Pro měření hladiny intracelulárního glutathionu (měření fluorescence) byly buňky obou linií nasazeny do 96jamkové destičky s černými stěnami a čirým, plochým dnem.

Pro měření fluorescence (test na indukci oxidačního stresu) byla připravena suspenze buněk tak, aby v každé jamce mikrotitrační destičky bylo 15 000 buněk ve 100 μ l media DMEM. Buňky linie HaCaT i linie 3H4 byly nasazeny do 96jamkové destičky s čirým, plochým dnem a černými stěnami.

Pro detekci apoptózy, aktivované ATM kinázy, analýzy změny mitochondriálního membránového potenciálu a aktivity kaspáz 3/7 byla použita transparentní 24jamková mikrotitrační destička s plochým dnem. Suspenze buněk linie HaCaT i linie 3HSM4 byla připravena tak, aby v každé jamce bylo 200 000 buněk v 1 ml media DMEM. Buňky byly dále inkubovány v CO₂ inkubátoru při 37 °C.

4.7. Ovlivnění buněk butionin sulfoximinem

Po 4 hodinách od nasazení buněk do mikrotitrační destičky byly buňky ovlivněny butionin sulfoximinem (BSO). Toto ovlivnění se provádělo v rámci měření buněčné viability, hladiny oxidačního stresu a intracelulárního glutathionu (GSH). Nejprve byl připraven zásobní roztok BSO o koncentraci 40 mmol·l⁻¹ navážením 6,05 mg BSO a jeho rozpuštěním v 680 μ l sterilní destilované vody. Z tohoto zásobního roztoku byl připraven pracovní roztok (2x) o koncentraci 100 μ mol·l⁻¹ a to smícháním 20 μ l zásobního roztoku BSO a 7 980 μ l media DMEM. K buňkám v mikrotitračních destičkách bylo pipetováno 100 μ l pracovního

roztoku BSO. Výsledná koncentrace BSO byla $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Do kontrolních jamek bylo pipetováno medium. Jako blank pro spektrofotometrické měření a měření fluorescence byl k buňkám pipetován 5% roztok SDS ($100 \mu\text{l}$), který buňky kompletně zlyzoval. Inkubace buněk s BSO probíhala po dobu 18 hodin v CO_2 inkubátoru při 37°C .

4.8. Ovlivnění buněk peroxidem vodíku

Po 18hodinovém intervalu inkubace buněk s BSO bylo veškeré medium z transparentní 96jamkové mikrotitrační destičky odsáto. Do destičky bylo pipetováno $100 \mu\text{l}$ kompletního media DMEM a buňky byly následně ovlivněny koncentrační řadou peroxidu vodíku. Ta byla připravena z pracovního roztoku, který byl připraven smícháním $34 \mu\text{l}$ zásobního roztoku 30% peroxidu vodíku a $521 \mu\text{l}$ PBS. Dále byla připravena 8členná koncentrační řada. Nejvyšší koncentrace, $6\,400 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, byla připravena smícháním $48 \mu\text{l}$ pracovního roztoku a $2352 \mu\text{l}$ media DMEM. Z tohoto roztoku pak bylo sériovým ředěním v poměru 1:1 připraveno dalších 7 koncentrací. K buňkám, ve $100 \mu\text{l}$ media, bylo přidáno $100 \mu\text{l}$ roztoku peroxidu vodíku v mediu. Do kontrolních jamek bylo přidáno medium DMEM.

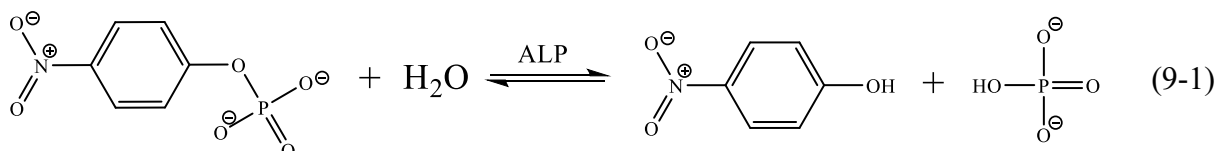
Pro měření hladiny intracelulárního glutathionu byl postup ovlivnění peroxidem vodíku obdobný, ovšem byla použita jiná koncentrační řada. Ta byla připravena z pracovního roztoku, který byl připraven smícháním $10 \mu\text{l}$ zásobního roztoku 30% peroxidu vodíku a $990 \mu\text{l}$ PBS. Dále byla připravena 8členná koncentrační řada. Nejvyšší koncentrace, $400 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, byla připravena smícháním $51 \mu\text{l}$ pracovního roztoku a $6\,611 \mu\text{l}$ media DMEM. Z tohoto roztoku bylo stejným způsobem jako u měření viability připraveno dalších 7 koncentrací. Následně byly buňky ovlivněny koncentrační řadou peroxidu vodíku přidáním $100 \mu\text{l}$ od každé koncentrace pomocí 8kanálové pipety. Do kontrolních jamek bylo pipetováno $100 \mu\text{l}$ media.

Poznámka: Přesná molární koncentrace 30% peroxidu vodíku byla stanovena manganometrickou titrací za použití dihydrátu kyseliny šťavelové jako základní látky. Technicky byla titrace provedena elektronickou byretou s přesností odečteného objemu na dvě desetinná místa (ml). Stanovená molární koncentrace 30% peroxidu byla $10\,446,80 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Tato koncentrace byla použita jako výchozí hodnota pro další ředění. Stanovení přesné koncentrace peroxidu vodíku není součástí zadání této diplomové práce, a proto zde nebude více popisováno.

Pro detekci apoptózy, aktivované ATM kinázy, analýzy změny mitochondriálního membránového potenciálu a detekci aktivovaných kaspáz 3/7 bylo ovlivnění buněk peroxidem vodíku provedeno následovně. Veškeré médium v transparentní 24jamkové mikrotitrační destičce bylo odsáto a nahrazeno 1 ml nového media DMEM. Následně byly buňky ovlivněny roztokem peroxidu vodíku. Z 10 μl zásobního roztoku 30% peroxidu vodíku a 990 μl PBS byl připraven pracovní roztok o koncentraci $104,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Ze 164 μl pracovního roztoku peroxidu vodíku a 15,416 ml media DMEM byl připraven 1 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok (2x koncentrovaný). Buňky byly ovlivněny 1 ml tohoto roztoku a výsledná koncentrace peroxidu vodíku byla $550 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Do kontrolních jamek bylo pipetováno médium.

4.9. Měření viability buněk

Životaschopnost buněk byla měřena spektrofotometrickou metodou založenou na měření absorbance *p*-nitrofenolu, který je produktem přeměny substrátu 4-nitrofenylfosfátu na *p*-nitrofenol a fosforečnan vlivem enzymu kyselá fosfatáza (AP, EC 3.1.3.2) (9-1). Tento enzym je přítomen pouze v cytoplazmě živých buněk. Pro stanovení viability byl připraven pracovní roztok smícháním 1 ml $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku *p*NPP a 9 ml acetátového pufru.



Po 24 hodinách inkubace buněk ovlivněných peroxidem vodíku bylo z destičky odsáto veškeré médium. Buňky byly opláchnuty 200 μl PBS a bylo k nim pipetováno 100 μl připraveného pracovního roztoku *p*NPP. Buňky byly inkubovány při 37 °C po dobu 45 minut. Po 45 minutách bylo do každé jamky pipetováno 15 μl 1N roztoku NaOH. Absorbance žlutého produktu reakce byla zaznamenána při vlnové délce 405 nm.

4.10. Měření přítomnosti reaktivních forem kyslíku

Pro měření reaktivních forem kyslíku byl připraven roztok intracelulární fluorescenční sondy CM-H₂DCFDA. Do mikrozkušavky s 50 μg CM-H₂DCFDA bylo přidáno 20 μl DMSO. Veškerý obsah byl smíchán s 6 ml DPBS. Ze všech jamek mikrotitrační destičky pro měření fluorescence bylo odsáto médium, buňky byly opláchnuty 200 μl PBS a do každé

jamky bylo přidáno 50 μl 1,45 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku CM-H₂DCFDA v DPBS. Následovala inkubace 45 minut při 37 °C. Koncentrační řada peroxidu vodíku byla připravena podle postupu popsaného v kapitole 4.8., pouze s tím rozdílem, že koncentrační řada byla připravena v DPBS. Testovány byly koncentrace v rozmezí 50 až 6 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Po uplynutí inkubačního intervalu byl obsah jamek odsán a buňky byly opláchnuty 200 μl PBS. Do všech jamek bylo předloženo 100 μl DPBS. Do kontrolních jamek bylo pipetováno 100 μl DPBS a do testovacích jamek připravená koncentrační řada peroxidu vodíku. Následovala inkubace 2 hodiny při 37 °C. Měření fluorescence bylo provedeno při excitační vlnové délce 485/20 nm a emisní spektrum bylo měřeno při vlnové délce 528/20 nm.

4.11. Měření hladiny intracelulárního glutathionu

Po 24 hodinách inkubace buněk ovlivněných peroxidem vodíku (koncentrační řada 6,25 až 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) bylo odsáto veškeré médium. Buňky byly opláchnuty 200 μl PBS a do jamek bylo přidáno 50 μl DPBS. Ze 40 μl 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ zásobního roztoku monochlorbimanu a 8 ml PBS byl připraven 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pracovní roztok monochlorbimanu. K buňkám bylo pipetováno 50 μl pracovního roztoku a ihned bylo zpuštěno měření fluorescence při vlnových délkách ex. 360/40 nm a em. 460/40 nm. Měření probíhalo v kinetickém módu při 37 °C. Hodnoty fluorescence byly zaznamenány v intervalu 1 minuta po dobu 20 minut.

4.12. Příprava vzorků pro hodnocení apoptózy, mitochondriálního membránového potenciálu, aktivity kaspázy 3/7 a poškození DNA

Po 24 hodinách inkubace buněk s 550 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ peroxidu vodíku bylo médium z jamek pipetováno do 15 ml zkumavky. Následně byly buňky převedeny pomocí 0,5 ml trypsinu do suspenze a přidány k mediu v příslušné zkumavce. Po centrifugaci při 1 000 otáčkách za minutu po dobu 4 minut byl supernatant odsán, peleta resuspendována v 0,5 ml media DMEM a veškerý obsah byl převeden do mikrozkuvek o objemu 1,5 ml. Buňky byly opět centrifugovány a resuspendovány v příslušné roztoku podle návodů k jednotlivým testům.

4.12.1. Detekce apoptózy/

K detekci živých buněk, časných a pozdních apoptotických buněk a mrtvých buněk byl použit komerční test Muse Annexin V & Dead Cell Assay. Buněčná peleta byla resuspendována ve 100 μl media DMEM následně bylo přidáno 100 μl reagentie Muse

Annexin V. Po 20minutové inkubaci v temnu za laboratorní teploty byla provedena analýza. Z každého vzorku bylo analyzováno 5 000 buněk.

4.12.2. Aktivita kaspáz 3/7

Pro stanovení aktivace kaspáz 3 a 7 byl použit komerční test Muse Caspase-3/7 Kit. Buňky byly resuspendovány v 50 μ l BA pufru. Podle návodu byl připraven pracovní roztok casp3/7 z 10,1 μ l činidla Casp3/7 a 70 μ l PBS. K 5 μ l pracovního roztoku casp3/7 bylo přidáno 50 μ l suspenze buněk. Buňky byly 30 minut inkubovány při 37 °C. Z 32 μ l 7-AAD stock a 2 368 μ l testovacího pufru byl připraven pracovní roztok 7-AAD. Po 30 minutách inkubace bylo k buňkám přidáno 150 μ l pracovního roztoku 7-AAD. Vzorky byly 5 minut inkubovány při laboratorní teplotě a následně analyzovány. Z každého vzorku bylo měřeno 5 000 buněk.

4.12.3. Analýza změny mitochondriálního membránového potenciálu

Na analýzu změny mitochondriálního membránového potenciálu byl použit komerční test Muse Mitopotential Kit a postup se řídil dle přiloženého návodu. Smícháním 2 μ l barviva (MitoPotential Dye) a 2 ml testovacího pufru (assay buffer) byl připraven pracovní roztok. Buňky v mikrozkuhavce byly resuspendovány ve 100 μ l pracovního roztoku a 95 μ l MPWorking solution. Buňky byly inkubovány při 37 °C po dobu 20 minut. Po 20 minutách inkubace byly přidány 3 μ l roztoku 7-AAD. Vzorky byly 5 minut inkubovány při laboratorní teplotě. V každém vzorku bylo analyzováno 5 000 buněk.

4.12.4. Detekce poškození DNA

Na detekci aktivované ATM kinázy a fosforylované formy hystonu H2A.X byl použit komerční test Muse Multi-Color DNA Damage Kit. Vzorek buněk byl resuspendován v 50 μ l roztoku testovacího pufru připraveného z 2 ml testovacího pufru a 8 ml sterilní destilované vody. Dále bylo přidáno 50 μ l fixačního pufru a buňky byly inkubovány 10 minut na ledu. Po 10 minutách byl vzorek centrifugován a supernatant odsán. Buňky byly resuspendovány v 90 μ l testovacího pufru. Dále bylo přidáno celkem 10 μ l koktejlu protilátek anti-ATM (5 μ l) a anti-H2A.X (5 μ l). Buňky byly 30 minut inkubovány v temnu při laboratorní teplotě. Po 30 minutách bylo přidáno 100 μ l testovacího pufru. Obsah byl centrifugován a supernatant

odsán. Peleta byla resuspendována ve 100 μ l testovacího pufru a následně byly vzorky analyzovány. Při každém měření bylo analyzováno 5 000 buněk.

4.13. Zpracování dat a statistické vyhodnocení

Statistická analýza a grafické zpracování dat bylo provedeno v programu GraphPad Prism verze 9.3.1 pro Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Experimenty (buněčná viabilita, měření hladiny ROS a intracelulárního GSH) byly provedeny v replikátu $n = 3$ a výsledek reprezentuje průměrnou hodnotu ze 3 nezávislých experimentů.

Hodnoty koncentrace IC_{50} byly vypočítány čtyřparametrickou nelineární regresní analýzou logaritmické závislosti koncentrace na % viability buněk. Hodnota koncentrace IC_{50} byla vyjádřena jako aritmetický průměr \pm střední chyba průměru (SEM). Statisticky významné rozdíly hodnot IC_{50} byly určeny na základě jednocestné analýzy rozptylu (one-way ANOVA) v kombinaci s Tukeyeho post hoc testem.

Výsledky zobrazené formou sloupcových grafů (analýza GSH a ROS) reprezentují aritmetický průměr \pm SEM. Statisticky významné rozdíly hodnot průměrů byly určeny na základě dvojcestné analýzy rozptylu (2way ANOVA) v kombinaci s Bonferroniho post hoc testem.

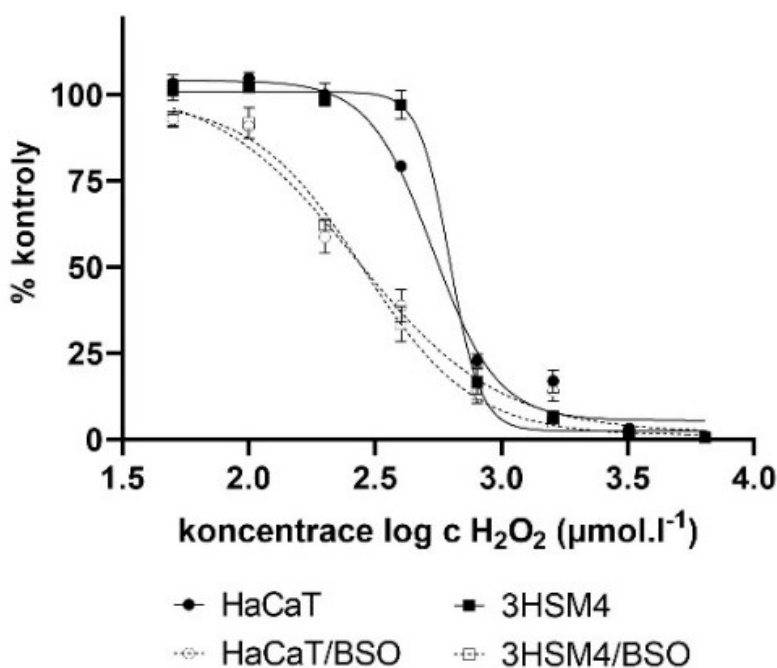
Výsledek experimentů, kde byla analyzována apoptóza, mitochondriální membránový potenciál, aktivita kaspáz 3/7 a poškození DNA, byly získány ze tří nezávislých měření, provedených v duplikátu. Výsledek reprezentuje aritmetický průměr \pm SEM. Statisticky významné rozdíly hodnot průměrů byly určeny na základě dvojcestné analýzy rozptylu (2way ANOVA) v kombinaci s Bonferroniho post hoc testem.

Hodnocení statistické významnosti rozdílů hodnot na konkrétní hladině významnosti je označeno *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ a ****, $p < 0,0001$.

5 Výsledky

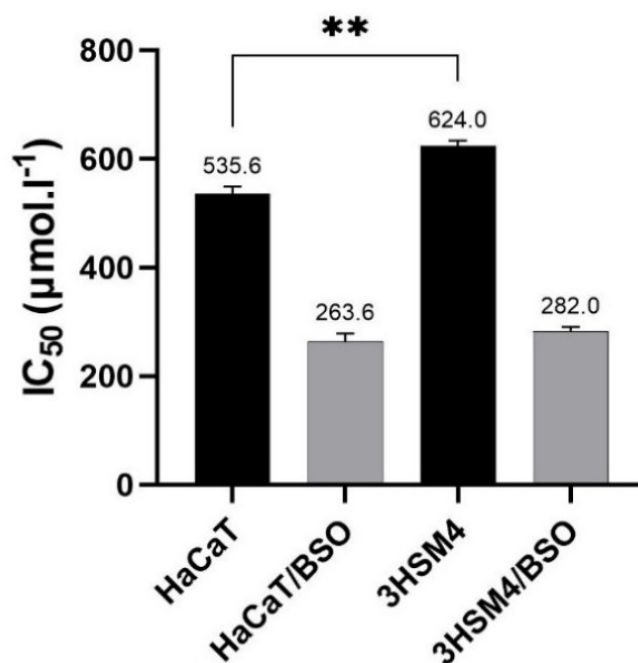
5.1. Buněčná viabilita

Viabilita buněk HaCaT a buněk 3HSM4 byla stanovena v intervalu 24 hodin po ovlivnění koncentrační řadou peroxidu vodíku. Cytotoxicita peroxidu vodíku byla vyjádřena jako koncentrace IC_{50} , tedy koncentrace, při které dojde v daném inkubačním intervalu ke snížení viability buněk o 50 % v porovnání s kontrolou (Obr. 12). Cytotoxicita peroxidu vodíku byla sledována za dvou podmínek. V prvním případě byly oba typy buněk ovlivněny peroxidem vodíku bez předchozího ovlivnění buthionin sulfoximínem (BSO, inhibitor syntézy GSH) a v druhém případě byly buňky inkubovány 18 hodin s BSO o koncentraci $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a o výměně media bylo provedeno ovlivnění koncentrační řadou peroxidu vodíku jako v prvním případě. Z průběhu křivek je zřejmé, že BSO má zásadní vliv na zvýšení senzitivity obou typů buněk k toxickým účinkům peroxidu vodíku v celém rozsahu použitých koncentrací.



Obr. 12 Závislost buněčné viability na koncentraci peroxidu vodíku. Buňky byly ovlivněny koncentrační řadou peroxidu vodíku v rozmezí 50 až $6\,400 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Po 24 hodinách byla stanovena buněčná viabilita. Buňky označené HaCaT/BSO a 3HSM4/BSO byly před ovlivněním koncentrační řadou peroxidu vodíku inkubovány 18 hodin s buthionin sulfoximínem (BSO) o koncentraci $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

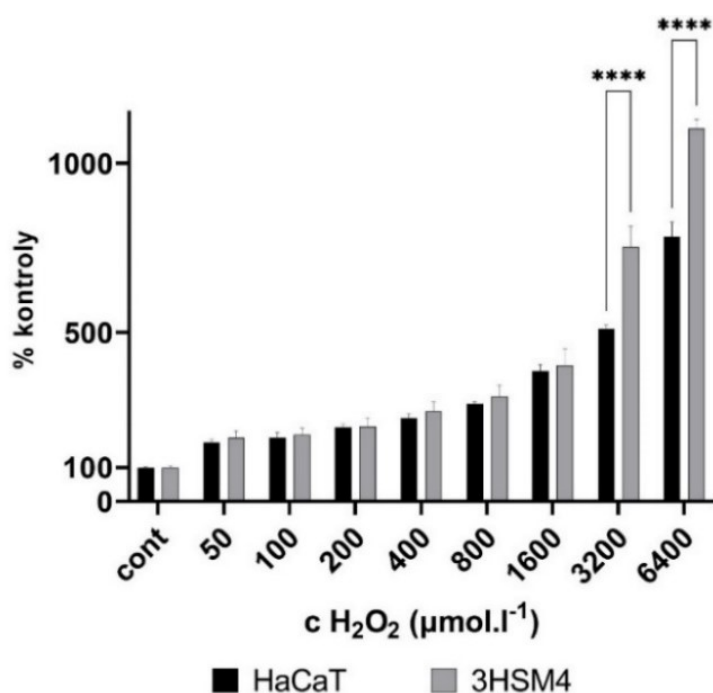
Pro buňky HaCaT byla koncentrace $IC_{50} = 536,6 \pm 23 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro buňky 3HSM4 byla stanovena koncentrace $IC_{50} = 624,3 \pm 16,8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Rozdíl obou hodnot byl zjištěn jako statisticky významný. Na druhou stranu nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi oběma typy buněk, pokud byla cytotoxicita peroxidu vodíku hodnocena po předchozí inkubaci s BSO (Obr. 13, šedé sloupce).



Obr. 13 Porovnání hodnot koncentrací IC_{50} peroxidu vodíku u buněk HaCaT a 3HSM4 bez ovlivnění buthionin sulfoximinem (BSO, černé sloupce) a za podmínek 18hodinové preinkubace s BSO. Statisticky významný rozdíl hodnot je označen **, $p < 0,002$.

5.2. Hladina intracelulárních ROS

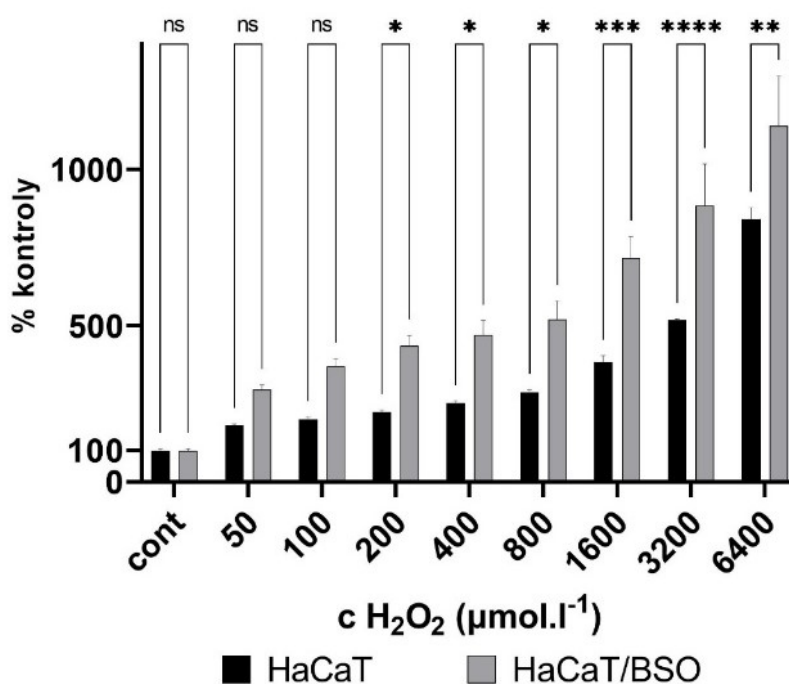
Intracelulární změny hladiny ROS byly porovnávány mezi buňkami HaCaT a 3HSM4. Buňky byly ovlivněny peroxidem vodíku v koncentračním rozsahu 50 až 6 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 2 hodin a následně byla měřena fluorescence (Obr. 14). V koncentračním rozsahu 50 až 1 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ peroxidu vodíku nebyly nalezeny signifikantně významné rozdíly mezi oběma typy buněk. Na druhou stranu je v tomto koncentračním rozsahu patrný koncentračně-závislý nárůst fluorescence oproti kontrole. V koncentraci 3 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ bylo zjištěno zvýšení hodnoty fluorescence u buněk 3HSM4 o 140,3 % v porovnání s buňkami HaCaT. Podobně i v koncentraci 6 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ byl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl, kde u buněk 3HSM4 byla fluorescence vyšší o 245,0 % v porovnání s HaCaT.



Obr. 14 Změny v intracelulární hladině ROS u buněk HaCaT a 3HSM4 po ovlivnění peroxidem vodíku a dvouhodinové inkubaci. Statisticky významný rozdíl hodnot je označen ****, $p < 0,0001$.

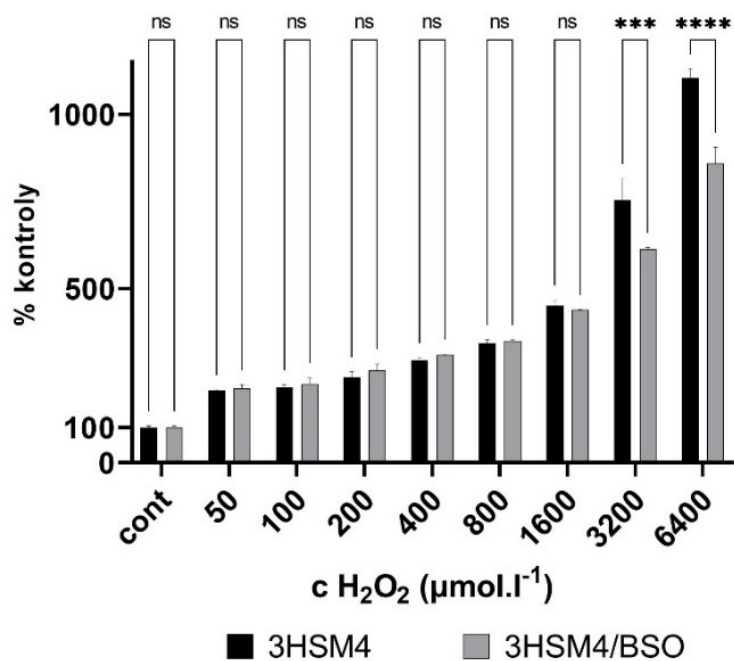
Dále byl sledován vliv BSO na míru oxidačního stresu indukovaného peroxidem vodíku na buňky HaCaT (Obr. 15). Koncentrace 50 a 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ nevyvolaly statisticky významné změny ROS. Statisticky významné hodnoty rozdílů mezi buňkami HaCaT neovlivněnými BSO a buňkami preinkubovanými s 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ BSO pak byly zjištěny v koncentracích 200 až 6 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ peroxidu vodíku. Konkrétně u koncentrace 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ byl rozdíl ve prospěch buněk HaCaT/BSO vyšší o 211,7 %, u 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$

o 220,8 %, u 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ o 234,8 %, u 1 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ o 333,0 %, u 3 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ o 366,5 % a u 6 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ o 297,1 %.



Obr. 15 Porovnání hladiny ROS u buněk HaCaT s buňkami HaCaT preinkubovanými 18 hodin s 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ BSO. Intenzita fluorescence byla měřena po 2hodinové inkubaci. Statisticky významný rozdíl hodnot je označen *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$. Nesignifikantní hodnoty jsou označeny zkratkou ns.

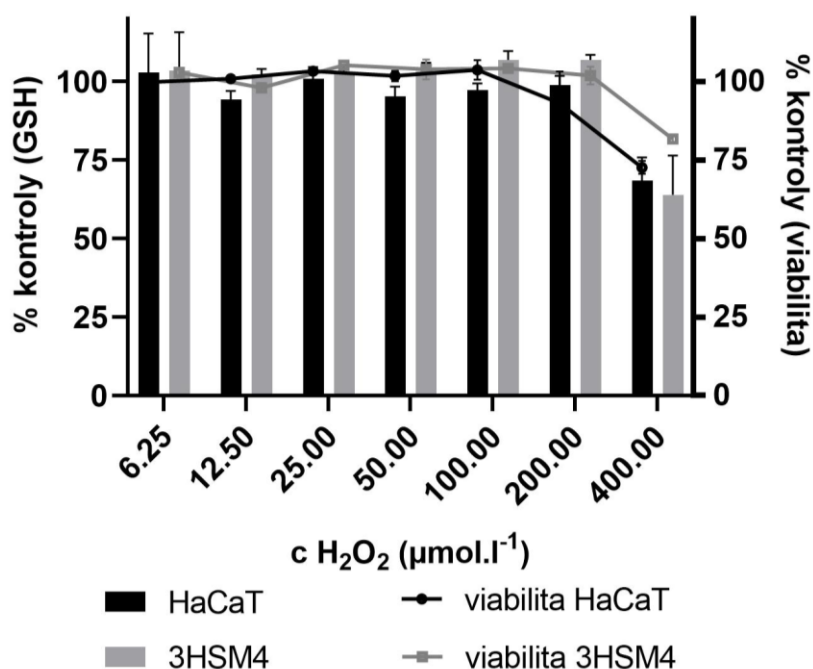
Vliv BSO byl hodnocen rovněž i na buňky 3HSM4 (Obr. 16). V rozmezí koncentrací 50 až 1 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ nebyl zjištěn signifikantní rozdíl. Statisticky vyšší hodnoty fluorescence byly zjištěny u koncentrací 3 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, kde buňky 3HSM4 vykazovaly o 140,3 % vyšší fluorescenci v porovnání s buňkami 3HSM4 preinkubovanými s BSO. U koncentrace 6 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ byl tento rozdíl u buněk 3HSM4 vyšší o 245,0 % oproti buňkám 3HSM4 preinkubovanými s BSO.



Obr. 16 Vliv BSO na hladinu ROS u buněk 3HSM4 po ovlivnění peroxidem vodíku po dobu 2 hodin. Statisticky významný rozdíl hodnot je označen ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$. Nesignifikantní hodnoty jsou označeny zkratkou ns.

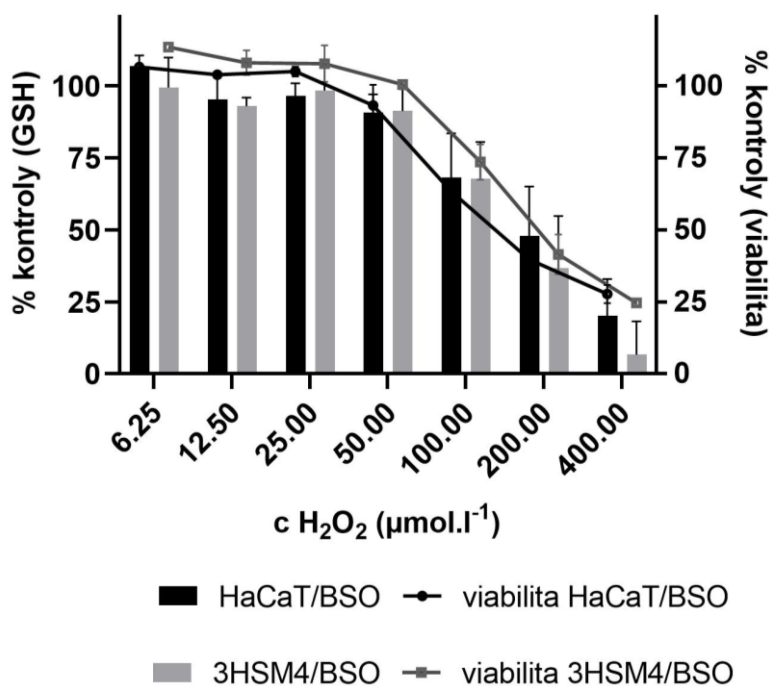
5.3. Hladina intracelulárního GSH

Změny hladiny intracelulárního obsahu GSH byly měřeny u buněk HaCaT a 3HSM4. Nejprve byly porovnány buňky HaCaT a 3HSM4, které byly ovlivněny pouze peroxidem vodíku v rozsahu koncentrací 6,25 až 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a inkubovány 24 hodin (sloupce v grafu na Obr. 17). Porovnání bylo hodnoceno v kontextu buněčné viability (křivky v grafu na Obr. 17). Rozdíly v obsahu intracelulárního GSH mezi oběma typy buněk nebyly zjištěny jako statisticky významné. Pokles hodnot intracelulárního GSH oproti kontrole u koncentrace peroxidu vodíku 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ souvisí s poklesem životaschopnosti buněk, tedy množství živých buněk, ve kterých lze GSH analyzovat.



Obr. 17 Porovnání hladiny intracelulárního GSH u buněk HaCaT (černé sloupce) a 3HSM4 (šedé sloupce) ovlivněných peroxidem vodíku po dobu 24 hodin. Statisticky signifikantní změny mezi oběma typy buněk nebyly zjištěny. Viabilitu buněk HaCaT reprezentuje černá křivka, viabilita buněk 3HSM4 je zobrazena šedou křivkou.

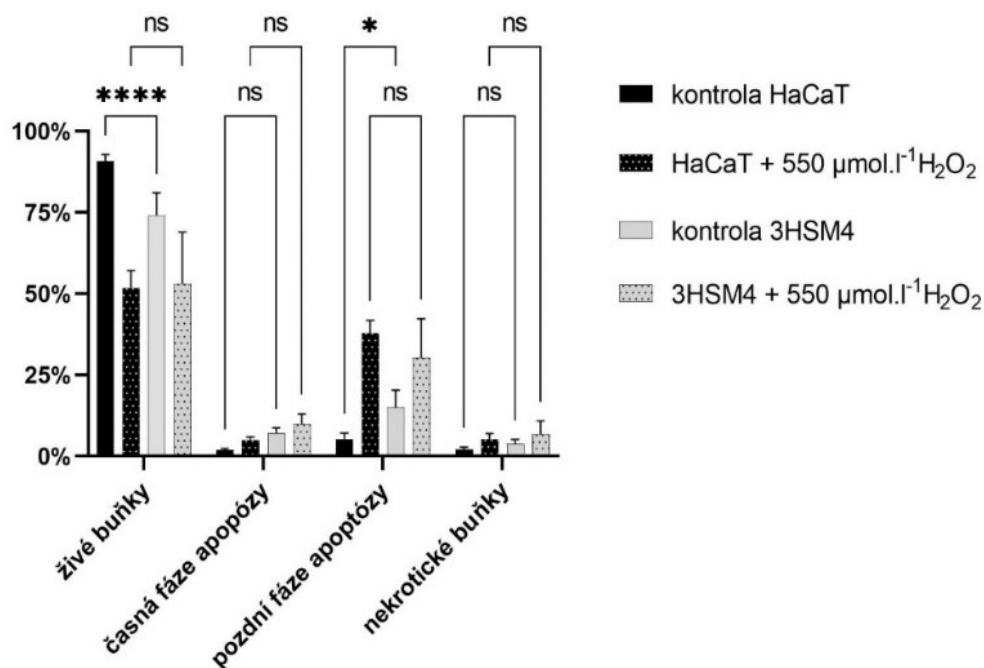
V druhé části experimentu byly buňky HaCaT a 3HSM4 preinkubovány s BSO (Obr. 18). Ani zde nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi buněčnými liniemi. Je zde však patrný pokles hodnot jak obsahu GSH, tak i buněčné viability v rozmezí testovaných koncentrací peroxidu vodíku 100 až 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.



Obr. 18 Porovnání hladiny intracelulárního GSH u buněk HaCaT (černé sloupce) a 3HSM4 (šedé sloupce) preinkubovaných 18 hodin s 50 μmol.l⁻¹ BSO a poté ovlivněných peroxidem vodíku po dobu 24 hodin. Statisticky signifikantní změny mezi oběma typy buněk nebyly zjištěny. Viabilitu buněk HaCaT reprezentuje černá křivka, viabilita buněk 3HSM4 je zobrazena šedou křivkou.

5.4. Porovnání módu buněčné smrti

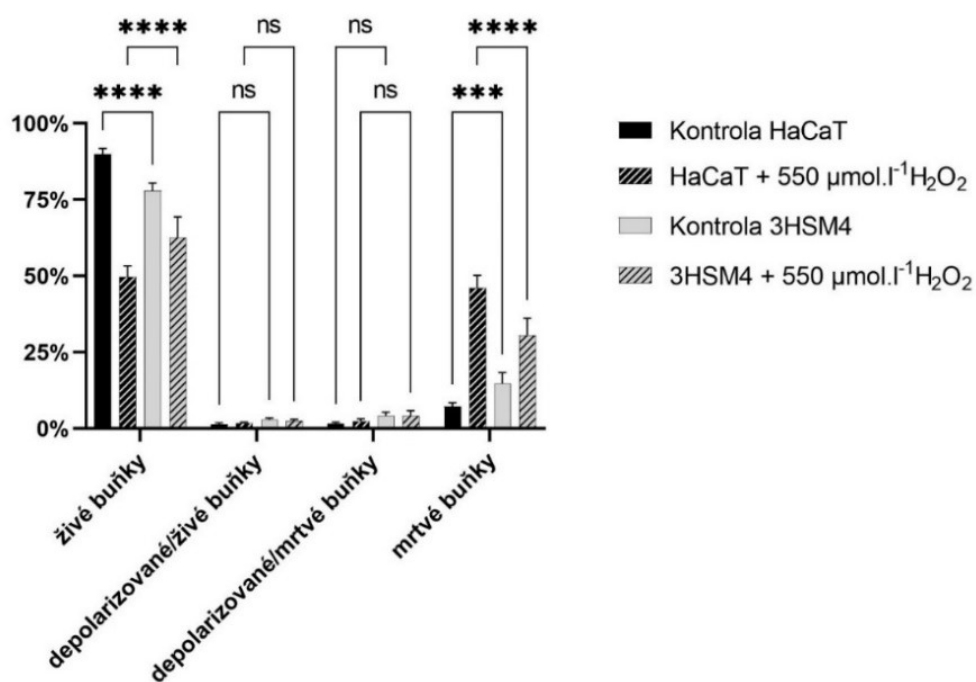
Buňky HaCaT a 3HSM4 byly ovlivněny peroxidem vodíku o koncentraci $550 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a inkubovány po dobu 24 hodin. Poté byly stanoveny populace buněk živých, v časně nebo pozdní fázi apoptózy a buňky nekrotické (Obr. 19). Mezi oběma typy buněk ovlivněných peroxidem vodíku nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly.



Obr. 19 Porovnání způsobu buněčné smrti buněk HaCaT a 3HSM4 ovlivněných peroxidem vodíku o koncentraci $550 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Buňky byly inkubovány s peroxidem vodíku po dobu 24 hodin. Statisticky významný rozdíl hodnot je označen *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,0001$. Nesignifikantní hodnoty jsou označeny zkratkou ns.

5.5. Změny v mitochondriálním membránovém potenciálu

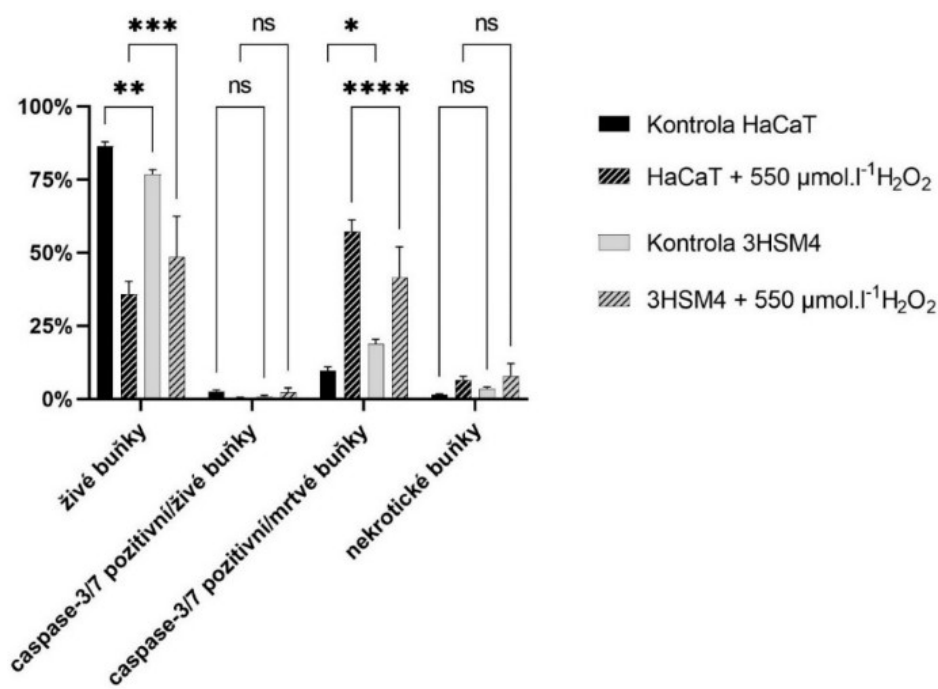
Buňky HaCaT a 3HSM4 byly ovlivněny $550 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ peroxidu vodíku po dobu 24 hodin a poté následovala analýza mitochondriálního membránového potenciálu. Byly hodnoceny populace živých buněk, živých buněk s depolarizovanou membránou mitochondrií, mrtvých buněk s depolarizovanou membránou mitochondrií a samotná populace mrtvých buněk (Obr. 20). Byl zjištěn statisticky významný pokles populace živých buněk HaCaT ovlivněných peroxidem vodíku a to o 12,9 %, oproti buňkám 3HSM4 ovlivněných peroxidem vodíku. Další signifikantní rozdíl mezi oběma typy buněk ovlivněnými peroxidem vodíku byl zjištěn v populaci mrtvých buněk. Zde byla populace mrtvých buněk HaCaT o 15,4 % větší než populace mrtvých buněk 3HSM4.



Obr. 20 Porovnání změn mitochondriálního membránového potenciálu buněk HaCaT a 3HSM4 ovlivněných peroxidem vodíku o koncentraci $550 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Buňky byly inkubovány s peroxidem vodíku po dobu 24 hodin. Statisticky významný rozdíl hodnot je označen ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$. Nesignifikantní hodnoty jsou označeny zkratkou ns.

5.6. Změny v aktivitě kaspázy 3/7

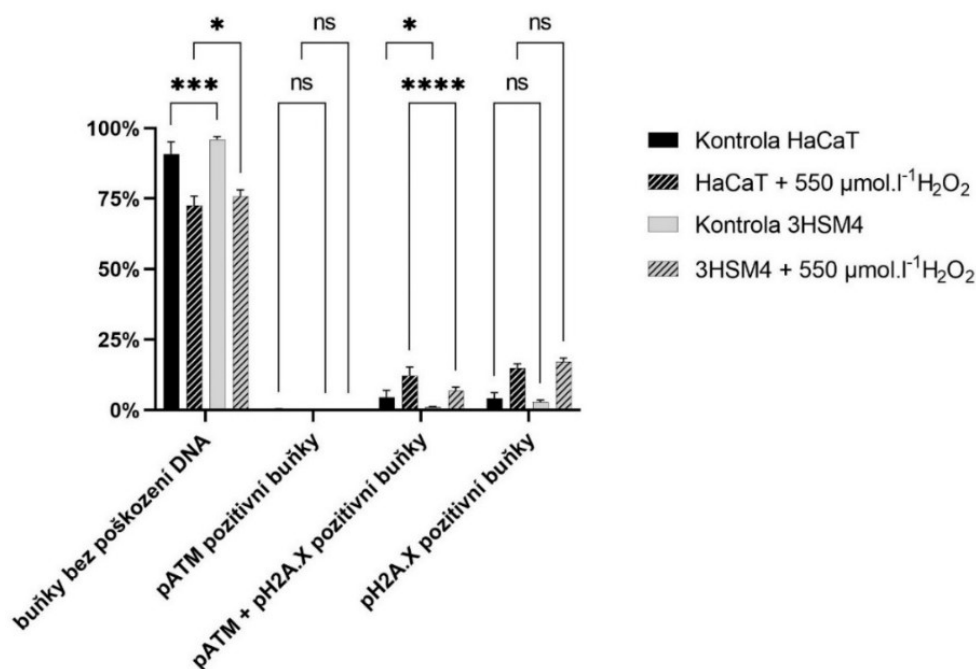
Buňky HaCaT a 3HSM4 byly ovlivněny $550 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ peroxidu vodíku po dobu 24 hodin a poté následovalo stanovení aktivovaných forem kaspázy 3/7 (Obr. 21). Mezi oběma typy buněk ovlivněných peroxidem vodíku byly zjištěny statisticky významné změny v populaci živých buněk, kde buňky 3HSM4 vykazovali o 12,6 % větší životnost než buňky HaCaT. Další rozdíl byl zjištěn v populaci mrtvých buněk, které jsou zároveň kaspáza 3/7 pozitivní. Zde byla populace buněk HaCaT o 15,7 % větší než 3HSM4.



Obr. 21 Porovnání změn aktivity kaspázy 3/7 u buněk HaCaT a 3HSM4 ovlivněných peroxidem vodíku o koncentraci $550 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 24 hodin. Statisticky významný rozdíl hodnot je označen *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$. Nesignifikantní hodnoty jsou označeny zkratkou ns.

5.7. Poškození DNA

Poškození DNA bylo hodnoceno dvěma molekulárními markery. Prvním z nich byla fosforylovaná ATM kináza a druhým fosforylovaný histon H2A.X (Obr. 22). U buněk HaCaT a 3HSM4 vystavených účinku peroxidu vodíku byl zjištěn malý, ale statisticky významný rozdíl v populaci buněk, které nevykazují poškození DNA. Populace buněk 3HSM4, nevykazující žádné poškození DNA z hlediska hodnocených markerů, byla o 3,2 % větší než populace buněk HaCaT. Další signifikantní rozdíl byl zjištěn v populaci buněk pozitivních na oba hodnocené markery. Buňky HaCaT vykazovaly o 5,4 % vyšší míru poškození vlivem peroxidu vodíku než buňky 3HSM4.



Obr. 22 Poškození DNA hodnocené dle přítomnosti fosforylované formy ATM kinázy a fosforylovaného histonu H2A.X. Analýza byla provedena u buněk u buněk HaCaT a 3HSM4 ovlivněných peroxidem vodíku o koncentraci 550 µmol.l⁻¹ po dobu 24 hodin. Statisticky významný rozdíl hodnot je označen *, p<0,05; ***, p<0,001; ****, p<0,0001. Nesignifikantní hodnoty jsou označeny zkratkou ns.

6 Diskuze

Buňky keratinocytů tvoří svrchní vrstvu pokožky. V bazální vrstvě *epidermis* tyto buňky intenzivně proliferují a ve svrchnějších vrstvách *epidermis* se diferencují ve zralé keratinocyty. Ty pak tvoří základ kožní bariéry. Sirný yperit, jakožto vysoce toxická látka s cytostatickým účinkem dokáže závažným způsobem narušit normální procesy v *epidermis*. V důsledku toxické dermo-epidermální nekrolýzy dochází k rozrušení spojení mezi *dermis* a *epidermis*. To má za následek rozvoj typických klinických známek zasažení touto zpuchýřující chemickou bojovou látkou. Regenerace takto postižené tkáně je velmi zdlouhavá a kvůli riziku sekundární infekce mohou nastat i další komplikace, které znesnadňují hojení. Obnova keratinocytů je také znesnadněna zásahem sirného yperitu do struktury DNA, která je poškozena přímou alkylací bází a vznikem meziřetězcových kovalentních spojení. Tyto patologické vazby brání procesu denaturace vodíkových vazeb uvnitř dvoušroubovice DNA, který je potřebný pro zahájení její replikace, než buňka vstoupí do fáze mitózy (58,66,67).

Za těchto podmínek je buněčný cyklus zastaven, a pokud poškození buňky není neslučitelné s jejím přežitím, je zahájena oprava DNA. Přesně organizovanými mechanismy reparace jsou odstraněny meziřetězcové kovalentní vazby a alkylované báze. Tím buňka může toto poškození překonat a dále se dělit. Bylo ovšem prokázáno, že sirný yperit může na základě svých epigenetických modifikací genomu pozměnit různé metabolické a jiné děje, které mohou buňku trvale modifikovat (66,70).

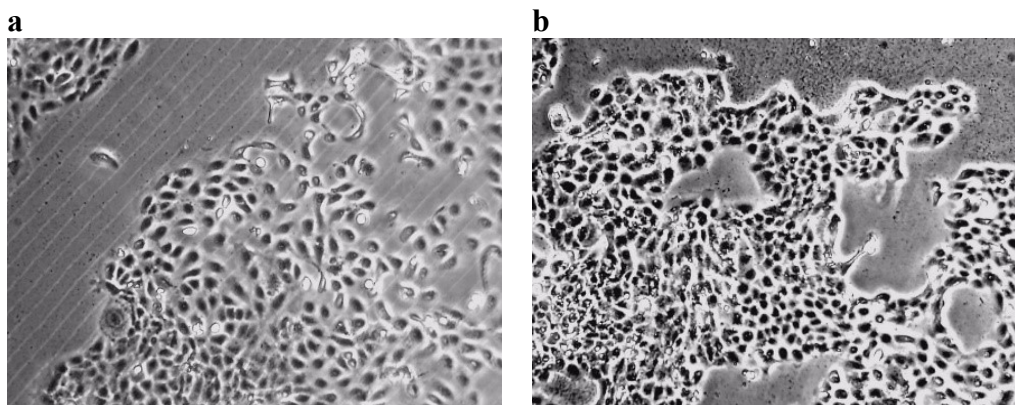
Tato práce si kladla za cíl zjistit, zda sirný yperit může v buňkách keratinocytů HaCaT vyvolat takové změny, které jsou sice slučitelné s dalším přežitím buňky, ovšem mění některé její reakce na chemické stimuly. Práce byla zaměřena na sledování těchto buněk v jejich biochemické odpovědi na indukci oxidačního stresu.

Buňky HaCaT jsou spontánně imortalizované lidské adultní keratinocyty. Jsou velmi podobné normálním lidským keratinocytům, nevykazují tumorogenní růst *in vivo* a jejich karyotyp je během dlouhodobé kultivace stabilní (78).

Buňky 3HSM4 byly experimentálně odvozeny od buněk HaCaT. Na počátku byly buňky HaCaT ovlivněny sirným yperitem a metodou klonogenního testu byla získána rezistentní kolonie buněk, která jako jediná přežila nejvyšší koncentraci sirného yperitu. Tato kolonie byla izolována a po expanzi klonu byla použita pro další klonogenní test, kde byla opět ovlivněna koncentrační řadou sirného yperitu. Celkem byl tento klon 4 x po sobě ovlivněn sirným yperitem a výsledný izolát byl nazván 3HSM4. Tyto buňky se tak staly 6,6 x

rezistentnější vůči sirmému yperitu než původní buňky HaCaT (tento výsledek není součástí této diplomové práce).

Buňky HaCaT mají morfologii epitelových buněk kubického tvaru. Cytoplazma tvoří široký a protáhlý lem kolem struktury buněčného jádra (Obr. 23a). Kultura buněk 3HSM4 vytváří, v porovnání s buňkami HaCaT, kompaktnější buněčnou monovrstvu o vyšší hustotě buněk (Obr. 23b).



Obr. 23 Buňky linie HaCaT (a) a 3HSM4 (b). Světelný mikroskop s fázovým kontrastem, zvětšeno 200 x (zdroj: vlastní)

Peroxid vodíku je cytotoxická sloučenina neradikálového charakteru, která byla v této práci využita jako induktor oxidačního stresu. Nejprve byla hodnocena cytotoxicita peroxidu vodíku, abychom získali základní informaci o senzitivitě buněk k této látce. Výsledky ukazují, že buňky 3HSM4 jsou rezistentnější vůči peroxidu vodíku, oproti buňkám HaCaT. Publikované údaje o senzitivitě buněk HaCaT k peroxidu vodíku jsou variabilní. Experimentálně zjištěná cytotoxicita peroxidu vodíku (koncentrace IC_{50}) pro buňky HaCaT po 24hodinové inkubaci je často měřena za účelem stanovení optimální koncentrace peroxidu vodíku pro další experimenty nebo testování. Autor Zhang a kol. ve své práci stanovil přibližnou hodnotu $IC_{50} \approx 350 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ metodou MTT (79). V práci autora Cheng a kol. je tato hodnota odhadnuta na $1\,200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, měřeno testem viability WST-1 (derivát tetrazoliové soli) (80). Práce Ramanauskienė a kol. udává IC_{50} peroxidu vodíku, stanovenou stejnou metodou, $183,7 \pm 20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (81).

V další práci autora Hu a kol. je uveden rovněž pouze odhad hodnoty $IC_{50} \approx 600 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, měřeno pomocí derivátu tetrazoliové soli WST-8 (82). Tato poslední hodnota je blízka výsledku našeho měření. Nesoulad mezi hodnotami jednotlivých autorů

může být zapříčiněn jistou nestabilitou peroxidu vodíku, který časem podléhá samovolné degradaci za přispění různých faktorů (83).

Žádný z autorů neuvádí, zda nějakým způsobem ověřoval, popřípadě stanovil přesnou koncentraci komerčně dodaného peroxidu vodíku před jeho použitím. Pro naši práci byla molární koncentrace 30% peroxidu vodíku stanovena manganometrickou titrací. Dalším faktorem může být ovlivnění aktivity mitochondriálních dehydrogenáz peroxidem vodíku, které přeměňují tetrazoliové soli na formazan (84,85).

Dále byl hodnocen vliv inhibitoru enzymu glutamát-cystein ligázy (BSO). BSO se používá v rámci onkologické léčby jako chemosenzitizující a radiosenzitizující látka, která zvyšuje účinnost chemoterapie a radioterapie. Vlivem BSO je v buňce inhibován první krok v biosyntéze GSH a buňka tím ztrácí jeden ze zásadních ochranných mechanismů před poškozením ROS a RNS (86).

V našich experimentech byly oba typy buněk inkubovány 18 hodin s BSO o koncentraci $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Tato koncentrace byla zvolena tak, aby neovlivňovala viabilitu buněk. Stejná koncentrace BSO byla použita pro ovlivnění buněk HaCaT i v publikaci Jacquoilleot a kol. (87). Výsledky experimentu neukázaly signifikantní rozdíl v cytotoxicitě peroxidu vodíku, kterým byly buňky HaCaT i 3HSM4 následně ovlivněny. Ovšem porovnáme-li tyto výsledky s buňkami, které byly ovlivněny pouze peroxidem vodíku, je tato koncentrace téměř o polovinu nižší. Tento rozdíl potvrzuje zvýšenou citlivost buněk vůči peroxidu vodíku v důsledku nedostatečné antioxidační ochrany.

Hydroxylový radikál vzniklý mechanismem Fentonovy reakce z peroxidu vodíku po jeho průniku do cytoplazmy, je hlavním zdrojem oxidačního poškození v buňce. Hladina ROS byla u buněk HaCaT a 3HSM4 detekována intracelulární fluorescenční sondou CM-H₂DCFDA. Tato sonda je po průniku do buňky přeměněna na sloučeninu, která po interakci s volným radikálem vykazuje intenzivní zelenou fluorescenci. Buňky 3HSM4 se v našich testech jevily jako senzitivnější z pohledu indukce ROS, která se projevila až při vysokých koncentracích peroxidu vodíku ($3\ 600$ a $6\ 400 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). V nižších koncentracích (50 až $1\ 600 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) byla fluorescenční odezva obou typů buněk srovnatelná. Výsledek může poukazovat na rychlejší vyčerpání antioxidačních mechanismů u buněk 3HSM4, což může být právě důvodem k iniciálnímu nárůstu detekované hladiny ROS během dvou hodin po ovlivnění peroxidem vodíku.

Experiment jsme dále modifikovali preinkubací buněk s BSO, abychom zjistili význam GSH v antioxidační ochraně obou typů buněk. Buňky HaCaT preinkubované s BSO

vykazovaly vyšší intracelulární hladinu ROS oproti buňkám bez preinkubace, což je v souladu s mechanismem působení BSO. Výsledek tedy poukazuje na to, že GSH tvoří v buňkách HaCaT významnou část antioxidační ochrany. Na druhou stranu u buněk 3HSM4 bylo po preinkubaci s BSO dosaženo opačného efektu. Tyto buňky vykazovaly nižší hladinu ROS než buňky bez preinkubace. Možnou příčinou může být alterace antioxidačních mechanismů, nezávislých na GSH, která se projevuje v takto krátkém intervalu po ovlivnění buněk peroxidem vodíku. Výsledky cytotoxicity za 24 hodin pak poukazují na srovnatelný efekt BSO a peroxidu vodíku u obou typů buněk.

Hladina intracelulárního GSH pak byla dále analyzována za využití intracelulární fluorescenční sondy (monochlorbiman), která specificky reaguje s thioly jako je GSH. Reakce s GSH je katalyzována enzymem glutathion-S-transferáza, jejichž aktivita je měřena jako nárůst fluorescenčního signálu v čase (40). V našich experimentech byl GSH měřen po 24 hodinách inkubace s peroxidem vodíku. Maximální koncentrace byla zvolena $400 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ peroxidu vodíku z důvodu předchozího měření, ze kterého bylo známo, že hodnota IC_{50} peroxidu vodíku se pohybuje v rozmezí přibližně 500 až $600 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro oba typy buněk.

Výsledky měření GSH neukazují žádné signifikantní rozdíly v jeho intracelulárním obsahu. Pokles hodnot u obou typů buněk je pak zaznamenán v koncentraci $400 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, avšak zhodnotíme-li tento pokles v kontextu buněčné viability jedná se o snížení fluorescenčního signálu v důsledku nižší koncentrace buněk. Ten byl zapříčiněn již toxickou koncentrací peroxidu vodíku. Obdobná situace byla zjištěna i v případě, kdy byl obsah GSH hodnocen i u buněk preinkubovaných s BSO. Zde se projevil strmý pokles hladiny GSH v závislosti na peroxidu vodíku, ale rozdíl v poklesu mezi jednotlivými typy buněk nebyl signifikantní. Pokles buněčné viability kopíroval trend poklesu GSH. Výsledek je tedy opět zkrácen postupným snížením celkového počtu buněk napříč koncentrační řadou peroxidu vodíku, a tedy i poklesem intenzity fluorescenčního signálu.

Pro další analýzy byla zvolena koncentrace peroxidu vodíku $550 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, která leží v rozmezí hodnot IC_{50} zjištěných pro buňky HaCaT a 3HSM4. V těchto analýzách jsme porovnávaly oba typy buněk z pohledu buněčné smrti. Testy byly prováděny po 24 hodinách inkubace s peroxidem vodíku.

Peroxid vodíku indukoval buněčnou smrt u obou typů buněk převážně cestou apoptózy, protože procento nekrotických buněk bylo minimální. Velikost populací apoptotických buněk jak HaCaT, tak i 3HSM4 se po ovlivnění peroxidem vodíku vzájemně nelišila. Vnitřní cesta apoptózy je indukována prostřednictvím mitochondrií. Narušením

transmembránového potenciálu spouští kaskádu dějů vedoucích k aktivně řízenému zániku buňky (88). Naše výsledky ukazují jen malé procento buněk s depolarizovanou membránou mitochondrií u obou typů buněk. To může být vysvětleno časovým nesouladem mezi působením peroxidu vodíku, rychlostí dějů probíhajících v buňce a časem analýzy.

Interval 24 hodin byl vhodně zvolen z pohledu apoptózy ovšem změny v mitochondriálním potenciálu, které předcházejí apoptóze již nemusely být v našich analýzách zachyceny. Tuto hypotézu rovněž potvrzuje analýza aktivity efektorových kaspáz 3/7, jejichž zvýšená aktivita byla zjištěna u buněk HaCaT ovlivněných peroxidem vodíku. Tyto výsledky korespondují s pozdní fází apoptózy, kdy je porušena cytoplazmatická membrána a do buňky může volně pronikat barvivo propidium jodid nebo 7-aminoaktinomycin D, které se váže do DNA mrtvých buněk.

Peroxid vodíku, prostřednictvím hydroxylového radikálu, způsobuje jednovláknové zlomy DNA (89). Mezi prvními, kdo na takové poškození reaguje je proteinkináza ataxia-teleangiectasia mutated (ATM kináza). V okolí dvouvláknových zlomů pak dochází k rychlé fosforylaci histonu H2A.X (90). Naše výsledky ukazují, že populace buněk s fosforylovanou ATM kinázou zcela chybí. Jelikož jsou jednoduché zlomy rychle opravovány, nemusí být již za 24 hodin detekovatelné, což je v souladu s výsledkem autora Benhusein a kol. (91).

7 Závěr

Přesné mechanismy, jakými sirtinový yperit ovlivňuje změny u buněk, které dokáží přežít jeho cytotoxický účinek, opravit alkylační poškození a pokračovat dále v proliferaci nejsou zcela objasněné.

V této práci jsme porovnávali reakci buněk HaCaT a 3HSM4 na oxidační stres. Výsledky ukazují, že sirtinový yperit, kterému byly buňky 3HSM4 opakovaně vystaveny, indukoval v těchto buňkách změny, které jsme chtěli identifikovat. Cíle této práce byly zaměřeny na změny v oblasti oxidačního stresu. Ukázalo se, že buňky 3HSM4 jsou senzitivnější k indukci oxidačního stresu, která však nemá za následek progresivnější zánik buňky.

Role antioxidační ochrany prostřednictvím GSH byla pro oba typy buněk významná, pokud byla jeho syntéza inhibována, avšak nebyl mezi buňkami HaCaT a 3HSM4 nalezen významný rozdíl v jeho intracelulární hladině. Peroxid vodíku indukoval apoptózu u obou typů buněk, avšak změny mitochondriálního membránového potenciálu, aktivitu kaspázy 3/7 a poškození DNA se po 24 hodinách již zachytit nepodařilo.

Možné modifikace buněk 3HSM4, které tato práce poodhalila, nezahrnují celé spektrum změn, které mohou být v těchto buňkách přítomny. Pro další komparativní analýzu by bylo třeba sledovat rozdíly například na úrovni genové exprese nebo na úrovni proteomu.

8 Seznam zkratek

3HSM4	buňky experimentálně odvozené od linie HaCaT, která byla opakovaně ovlivněna sirtým yperitem
7-AAD	7-aminoactinomycin D
BSO	buthionin sulfoximin
CAT	kataláza
CM-H ₂ DCFDA	acetyléster 5-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetátu
DMEM	Dulbeccovo modifikované Eagleovo médium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPBS	Dulbeccův fosfátem pufrovaný fyziologický roztok
FBS	fetální bovinní sérum
GPx	glutathionperoxidáza
GSH	redukovaný glutathion
GSSH	oxidovaný glutathion
H ₂ O	destilovaná voda
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HaCaT	spontánně immortalizované lidské adultní keratinocyty
HNO ₂	kyselina dusitá
HOCl	kyselina chlorná
IC ₅₀	koncentrace, při které dojde ke snížení viability buněk o 50 %
MCB	monochlorbiman
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
NAD ⁺	nikotinamidadeninindinukleotid
NaOH	hydroxid sodný
NO ⁺	nitrosil
NO [•]	oxid dusnatý
O ₂ ^{•-}	superoxid
OH [•]	hydroxilový radikál
ONOO ⁻	peroxynitrit
PBS	fyziologický roztok pufrovaný fosfáty
pNPP	disodná sůl para-nitrofenylfosfátu
RNS	reaktivní formy dusíku

RO [•]	alkoxylový radikál
ROOH	organické hydroperoxydy
ROONO	alkylperoxinitrit
ROS	reaktivní formy kyslíku
SDS	dodecylsírán sodný
SOD	superoxid dismutáza
WST-1	Water-Soluble Tetrazolium 1 (ve vodě rozpustná tetrazoliová sůl 1)
WST-8	Water-Soluble Tetrazolium 8 (ve vodě rozpustná tetrazoliová sůl 8)

9 Seznam citované literatury

1. Kolarsick PAJ, Kolarsick MA, Goodwin C. Anatomy and Physiology of the Skin: Journal of the Dermatology Nurses' Association. červenec 2011;3(4):203–13.
2. Deavall DG, Martin EA, Horner JM, Roberts R. Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity. Journal of Toxicology. 2012;2012:1–13.
3. Simons T, Steinritz D, Bölcck B, Schmidt A, Popp T, Thiermann H, et al. Sulfur mustard-induced epigenetic modifications over time – a pilot study. Toxicology Letters. září 2018;293:45–50.
4. Jošt P, Múčková L, Štětina R, Pejchal J. SULFUR MUSTARD: PERSISTING THREAT. MMSL. 7. září 2018;87(3):106–18.
5. Wattana M, Bey T. Mustard Gas or Sulfur Mustard: An Old Chemical Agent as a New Terrorist Threat. Prehospital and Disaster Medicine. únor 2009;24(1):19–29.
6. Sies H. Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. Antioxidants. 10. září 2020;9(9):852.
7. Betteridge DJ. What is oxidative stress? Metabolism. únor 2000;49(2):3–8.
8. Pruchniak MP, Aražna M, Demkow U. Biochemistry of Oxidative Stress. In: Pokorski M, editor. Advances in Clinical Science [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015 [citován 4. říjen 2022]. s. 9–19. (Advances in Experimental Medicine and Biology; roč. 878). Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/5584_2015_161
9. Meng JY, Zhang CY, Zhu F, Wang XP, Lei CL. Ultraviolet light-induced oxidative stress: Effects on antioxidant response of *Helicoverpa armigera* adults. Journal of Insect Physiology. červen 2009;55(6):588–92.
10. Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. Cell Death Differ. březen 2015;22(3):377–88.
11. Chen J, Liu Y, Zhao Z, Qiu J. Oxidative stress in the skin: Impact and related protection. Intern J of Cosmetic Sci. říjen 2021;43(5):495–509.
12. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions. březen 2006;160(1):1–40.
13. Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. APOPTOSIS. 2000;5(5):415–8.
14. Storz G, Imlayt JA. Oxidative stress. Current Opinion in Microbiology. duben 1999;2(2):188–94.
15. Barzilai A, Yamamoto KI. DNA damage responses to oxidative stress. DNA Repair. srpen 2004;3(8–9):1109–15.

16. Choi K, Kim J, Kim G, Choi C. Oxidative Stress-Induced Necrotic Cell Death via Mitochondria-Dependent Burst of Reactive Oxygen Species. *CNR*. 1. listopad 2009;6(4):213–22.
17. Higuchi Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochemical Pharmacology*. říjen 2003;66(8):1527–35.
18. Dizdaroglu M, Kirkali G, Jaruga P. Formamidopyrimidines in DNA: Mechanisms of formation, repair, and biological effects. *Free Radical Biology and Medicine*. prosinec 2008;45(12):1610–21.
19. Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. červen 2011;711(1–2):193–201.
20. Tremblay S, Wagner JR. Dehydration, deamination and enzymatic repair of cytosine glycols from oxidized poly(dG-dC) and poly(dI-dC). *Nucleic Acids Research*. 13. listopad 2007;36(1):284–93.
21. Avery SV. Molecular targets of oxidative stress. *Biochemical Journal*. 1. březen 2011;434(2):201–10.
22. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clinical Chemistry*. 1. duben 2006;52(4):601–23.
23. Diao Y, Liu W, Wong CCL, Wang X, Lee K, Cheung P yan, et al. Oxidation-induced intramolecular disulfide bond inactivates mitogen-activated protein kinase kinase 6 by inhibiting ATP binding. *Proc Natl Acad Sci USA*. 7. prosinec 2010;107(49):20974–9.
24. Östman A, Frijhoff J, Sandin Å, Böhmer FD. Regulation of protein tyrosine phosphatases by reversible oxidation. *The Journal of Biochemistry*. říjen 2011;150(4):345–56.
25. Cecarini V, Gee J, Fioretti E, Amici M, Angeletti M, Eleuteri AM, et al. Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. únor 2007;1773(2):93–104.
26. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*. prosinec 2003;25(3–4):207–18.
27. Berlett BS, Stadtman ER. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *Journal of Biological Chemistry*. srpen 1997;272(33):20313–6.
28. Shringarpure R, Grune T, Mehlhase J, Davies KJA. Ubiquitin Conjugation Is Not Required for the Degradation of Oxidized Proteins by Proteasome. *Journal of Biological Chemistry*. leden 2003;278(1):311–8.
29. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*. červen 2000;108(8):652–9.
30. Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*. prosinec 1988;85(24):9748–52.

31. Andrés CMC, Pérez de la Lastra JM, Juan CA, Plou FJ, Pérez-Lebeña E. Chemistry of Hydrogen Peroxide Formation and Elimination in Mammalian Cells, and Its Role in Various Pathologies. *Stresses*. 25. červenec 2022;2(3):256–74.
32. Wendel A. Glutathione peroxidase. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 1981 [citován 31. leden 2023]. s. 325–33. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687981770460>
33. Moussa Z, M.A. Judeh Z, A. Ahmed S. Nonenzymatic Exogenous and Endogenous Antioxidants. In: Das K, Das S, Shivanagouda Biradar M, Bobbarala V, Subba Tata S, editoři. *Free Radical Medicine and Biology* [Internet]. IntechOpen; 2020 [citován 11. únor 2023]. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/free-radical-medicine-and-biology/nonenzymatic-exogenous-and-endogenous-antioxidants>
34. Haida Z, Hakiman M. A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities. *Food Sci Nutr*. květen 2019;7(5):1555–63.
35. Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in Medical Sciences*. březen 2018;63(1):68–78.
36. Carr AC, Zhu BZ, Frei B. Potential Antiatherogenic Mechanisms of Ascorbate (Vitamin C) and α -Tocopherol (Vitamin E). *Circulation Research*. září 2000;87(5):349–54.
37. West KP, Darnton-Hill I. Vitamin A Deficiency. In: Semba RD, Bloem MW, Piot P, editoři. *Nutrition and Health in Developing Countries* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2008 [citován 29. březen 2023]. s. 377–433. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-464-3_13
38. Jefferies H, Coster J, Khalil A, Bot J, McCauley RD, Hall JC. Glutathione: Glutathione. *ANZ Journal of Surgery*. červenec 2003;73(7):517–22.
39. Noctor G, Queval G, Mhamdi A, Chaouch S, Foyer CH. Glutathione. *The Arabidopsis Book*. leden 2011;9:1–32.
40. Čapek J, Hauschke M, Brůčková L, Roušar T. Comparison of glutathione levels measured using optimized monochlorobimane assay with those from ortho-phthalaldehyde assay in intact cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. listopad 2017;88:40–5.
41. Vacík J. *Přehled středoškolské chemie*. 1. Praha: Státní pedagogické nakladatelství; 1990. 366 s.
42. Housecroft CE, Sharpe AG. *Inorganic chemistry*. 2nd ed. Upper Saddle River, N.J: Pearson Prentice Hall; 2005. 949 s.
43. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters*. 1. prosinec 2000;486(1):10–3.
44. Hill CN. *A vertical empire: the history of the UK rocket and space programme, 1950-1971*. London : River Edge, NJ: Imperial College Press ; World Scientific Pub. [distributor]; 2001. 253 s.

45. Winterbourn CC. The Biological Chemistry of Hydrogen Peroxide. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 2013 [citován 17. únor 2023]. s. 3–25. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012405881100001X>
46. Riley RF, Stecher PG. *Handbook of preparative inorganic chemistry*. 2d ed. Brauer G, editor. New York: Academic Press; 1963.
47. Mahaseth T, Kuzminov A. Potentiation of hydrogen peroxide toxicity: From catalase inhibition to stable DNA-iron complexes. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. červenec 2017;773:274–81.
48. Barbouti A. Intracellular iron, but not copper, plays a critical role in hydrogen peroxide-induced DNA Damage. *Free Radical Biology and Medicine*. 15. srpen 2001;31(4):490–8.
49. Winterbourn CC. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology Letters*. prosinec 1995;82–83:969–74.
50. Ameta R, K. Chohadia A, Jain A, Punjabi PB. Fenton and Photo-Fenton Processes. In: *Advanced Oxidation Processes for Waste Water Treatment* [Internet]. Elsevier; 2018 [citován 17. únor 2023]. s. 49–87. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128104996000036>
51. Thanan R, Techasen A, Hou B, Jamnongkan W, Armartmuntree N, Yongvanit P, et al. Development and characterization of a hydrogen peroxide-resistant cholangiocyte cell line: A novel model of oxidative stress-related cholangiocarcinoma genesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. srpen 2015;464(1):182–8.
52. Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, et al. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. březen 1999;424(1–2):9–21.
53. Štípek S, Borovanský J, Čejková J, Homolka J, Klener P, Lukáš M, et al. Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. Grada; 2000. 320 s.
54. Veal E, Day A. Hydrogen Peroxide as a Signaling Molecule. *Antioxidants & Redox Signaling*. červenec 2011;15(1):147–51.
55. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. červen 2007;35(4):495–516.
56. Zimmermann KC, Green DR. How cells die: Apoptosis pathways☆☆☆. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. říjen 2001;108(4):S99–103.
57. Betts JG, Desaix P, Johnson E, Johnson JE, Korol O, Kruse D, et al. *Anatomy & physiology*. Houston, Texas: OpenStax College, Rice University; 2013.
58. Yousef H, Alhadj M, Sharma S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [citován 3. říjen 2022]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>
59. Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Structural Characteristics of the Aging Skin: A Review. *Cutaneous and Ocular Toxicology*. leden 2007;26(4):343–57.

60. Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in Dermatology*. květen 2012;30(3):257–62.
61. Chuong CM, Nickoloff B, Elias P, Goldsmith L, Macher E, Maderson P, et al. Controversies in Experimental Dermatology. *Experimental Dermatology*. duben 2002;11(2):159–87.
62. Venus M, Waterman J, McNab I. Basic physiology of the skin. *Surgery (Oxford)*. říjen 2010;28(10):469–72.
63. Tripkovic L, Lambert H, Hart K, Smith CP, Bucca G, Penson S, et al. Comparison of vitamin D2 and vitamin D3 supplementation in raising serum 25-hydroxyvitamin D status: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*. červen 2012;95(6):1357–64.
64. Křížková J, Vitvarová T. 20 let úmluvy o zákazu chemických zbraní. *Chemické Listy*. zima 2017;111(4):285–9.
65. Timperley CM, Forman JE, Abdollahi M, Al-Amri AS, Baulig A, Benachour D, et al. Advice on assistance and protection provided by the Scientific Advisory Board of the Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons: Part 3. On medical care and treatment of injuries from sulfur mustard. *Toxicology*. 1. listopad 2021;463:152967.
66. Kehe K, Szinicz L. Medical aspects of sulphur mustard poisoning. *Toxicology*. říjen 2005;214(3):198–209.
67. Borak J, Sidell FR. Agents of chemical warfare: Sulfur mustard. *Annals of Emergency Medicine*. březen 1992;21(3):303–8.
68. Beigi Harchegani A, Mirnam Niha M, Sohrabiyan M, Ghatrehsamani M, Tahmasbpour E, Shahriary A. Cellular and molecular mechanisms of sulfur mustard toxicity on spermatozoa and male fertility. *Toxicology Research*. 1. listopad 2018;7(6):1029–35.
69. Panahi Y, Fattahi A, Nejabati HR, Abroon S, Latifi Z, Akbarzadeh A, et al. DNA repair mechanisms in response to genotoxicity of warfare agent sulfur mustard. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. březen 2018;58:230–6.
70. IARC Working Group. SULFUR MUSTARD. In: *Chemical Agents and Related Occupations* [Internet]. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 2012. s. 437–50. (100F). Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK304425/?report=classic>
71. Fidder A, Moes GWH, Scheffer AG, Van Der Schans GP, Baan RA, De Jong LPA, et al. Synthesis, Characterization, and Quantitation of the Major Adducts Formed between Sulfur Mustard and DNA of Calf Thymus and Human Blood. *Chem Res Toxicol*. březen 1994;7(2):199–204.
72. Roos WP, Thomas AD, Kaina B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat Rev Cancer*. leden 2016;16(1):20–33.

73. Sukhanova MV, Singatulina AS, Pastré D, Lavrik OI. Fused in Sarcoma (FUS) in DNA Repair: Tango with Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 and Compartmentalisation of Damaged DNA. *IJMS*. 24. září 2020;21(19):7020.
74. Mohan V, Madhusu S. DNA Base Excision Repair: Evolving Biomarkers for Personalized Therapies in Cancer. In: Chen C, editor. *New Research Directions in DNA Repair* [Internet]. InTech; 2013 [citován 3. duben 2023]. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/new-research-directions-in-dna-repair/dna-base-excision-repair-evolving-biomarkers-for-personalized-therapies-in-cancer>
75. Dexheimer TS. DNA Repair Pathways and Mechanisms. In: Mathews LA, Cabarcas SM, Hurt EM, editoři. *DNA Repair of Cancer Stem Cells* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2013 [citován 3. duben 2023]. s. 19–32. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-4590-2_2
76. Rahmani S, Abdollahi M. Novel treatment opportunities for sulfur mustard-related cancers: genetic and epigenetic perspectives. *Arch Toxicol*. prosinec 2017;91(12):3717–35.
77. Pashandi Z, Saraygord-Afshari N, Naderi-Manesh H, Naderi M. Comparative Proteomic Study Reveals the Molecular Aspects of Delayed Ocular Symptoms Induced by Sulfur Mustard. *International Journal of Proteomics*. 21. leden 2015;2015:1–10.
78. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology*. 1. březen 1988;106(3):761–71.
79. Zhang J, Wang W, Mao X. Chitopentose protects HaCaT cells against H₂O₂-induced oxidative damage through modulating MAPKs and Nrf2/ARE signaling pathways. *Journal of Functional Foods*. září 2020;72:104086.
80. Bae S, Lee EJ, Lee JH, Park IC, Lee SJ, Hahn HJ, et al. Oridonin protects HaCaT keratinocytes against hydrogen peroxide-induced oxidative stress by altering microRNA expression. *International Journal of Molecular Medicine*. leden 2014;33(1):185–93.
81. Ramanauskienė K, Stelmakienė A, Majienė D. Assessment of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Hydrogels: Quality and Bioactivity in Skin Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015;2015:1–7.
82. Hu W, Zhang J, Wang H, Guan M, Dai L, Li J, et al. Protective effects of isorhamnetin against H₂O₂-induced oxidative damage in HaCaT cells and comprehensive analysis of key genes. *Sci Rep*. 13. únor 2023;13(1):2498.
83. Terent'ev AO, Pastukhova ZYu, Yaremenko IA, Bruk LG, Nikishin GI. Promising hydrogen peroxide stabilizers for large-scale application: unprecedented effect of aryl alkyl ketones. *Mendeleev Communications*. červenec 2016;26(4):329–31.
84. Nulton-Persson AC, Szweda LI. Modulation of Mitochondrial Function by Hydrogen Peroxide. *Journal of Biological Chemistry*. červen 2001;276(26):23357–61.

85. Wang P, Henning SM, Heber D. Limitations of MTT and MTS-Based Assays for Measurement of Antiproliferative Activity of Green Tea Polyphenols. Deb S, editor. PLoS ONE. 16. duben 2010;5(4):e10202.
86. Lee KS, Kim HK, Moon HS, Kang JH, Kim DJ, Park JG, et al. Effects Of Buthionine Sulfoximine Treatment On Cellular Glutathione Levels and Cytotoxicities of cisplatin, Carboplatin and Radiation in Human Stomach and Ovarian Cancer Cell Lines - Glutathione, Buthionine Sulfoximine, Cytotoxicity-. Korean J Intern Med. 31. červenec 1992;7(2):111–8.
87. Jacquilleot S, Sheffield D, Olayanju A, Sison-Young R, Kitteringham NR, Naisbitt DJ, et al. Glutathione metabolism in the HaCaT cell line as a model for the detoxification of the model sensitizers 2,4-dinitrohalobenzenes in human skin. Toxicology Letters. 19. srpen 2015;237(1):11–20.
88. Nulton-Persson AC, Szweda LI. Modulation of Mitochondrial Function by Hydrogen Peroxide*. Journal of Biological Chemistry. 29. červen 2001;276(26):23357–61.
89. Yoon JJ, Jeong JW, Choi EO, Kim MJ, Hwang-Bo H, Kim HJ, et al. Protective effects of *Scutellaria baicalensis* Georgi against hydrogen peroxide-induced DNA damage and apoptosis in HaCaT human skin keratinocytes. EXCLI Journal; 16:Doc426; ISSN 1611-2156 [Internet]. 2017 [citován 3. květen 2023]; Dostupné z: https://www.excli.de/vol16/Choi_31032017_proof.pdf
90. McGowan CH, Russell P. The DNA damage response: sensing and signaling. Curr Opin Cell Biol. prosinec 2004;16(6):629–33.
91. Benhusein GhazallaM, Mutch E, Aburawi S, Williams FaithM. Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay. Libyan Journal of Medicine. 1. leden 2010;5(1):4637.