

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

SOŇA MĚŘIČKOVÁ

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Oxidační stres a jeho vliv na rozvoj nádorového onemocnění  
Bakalářská práce

University of Pardubice  
Faculty of Chemical Technology

Oxidative Stress and its Influence on the Development of Cancer  
Bachelor Thesis

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Soňa Měřičková**  
Osobní číslo: **C21202**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Oxidační stres a jeho vliv na rozvoj nádorového onemocnění**  
Téma práce anglicky: **Oxidative Stress and its Influence on the Development of Cancer**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

1. Vypracovat teoretickou rešerši na téma souvislosti oxidačního stresu a rozvoje nádorových onemocnění
2. V úvodu popsat oxidační stres a příčiny jeho vzniku
3. Stěžejní část práce věnovat vlivu oxidačního stresu na rozvoj nádorových onemocnění
4. Popsat možné poškození DNA, proteinů a lipidů vlivem oxidačního stresu

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **22. prosince 2023**

Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.** v.r.  
děkan

L.S.

**doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.** v.r.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Oxidační stres a jeho vliv na rozvoj nádorového onemocnění jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 21. 6. 2024

Soňa Měříčková

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D. za ochotu, laskavý přístup a cenné rady, které mi při zpracování této práce věnovala.

## **ANOTACE**

Bakalářská práce se zabývá oxidačním stresem a jeho vznikem, vybranými reaktivními formami kyslíku a dusíku a antioxidanty. Stěžejní část se věnuje souvislostem mezi oxidačním stresem a nádorovým onemocněním. Popisuje poškození biomolekul a ovlivnění signálních drah zapojených do procesu karcinogeneze.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

oxidační stres, rakovina, ROS, 8-oxo-dG, signální dráhy

## **TITLE**

Oxidative Stress and its Influence on the Development of Cancer

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis deals with oxidative stress, its formation, reactive oxygen and nitrogen species, and antioxidants. The main part is dedicated to the context between oxidative stress and cancer. It describes oxidative damage of biomolecules and the influence on signal pathways involved in the process of carcinogenesis.

## **KEYWORDS**

oxidative stress, cancer, ROS, 8-oxo-dG, signal pathways

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

8-oxoA	7,8-dihydro-8-oxoadenin; 8-oxoadenin
8-oxo-dG	8-oxo-2'-deoxyguanosin
A	adenin
ATP	adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)
C	cytosin
CPD	cyklobutan-pyrimidinové dimery
dA	deoxyadenosin
dC	deoxycytidin
dT	deoxythymidin
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor (epidermal growth factor receptor)
ERK	kináza regulována extracelulárním signálem (extracellular signal-regulated kinase)
FoxO	Forkhead box O
HIF	hypoxií indukovaný faktor (hypoxia induced factor)
HNE	4-hydroxynonenal
JAK	Janus kináza
KEAP1	kelch-like-ECH asociovaný protein
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza (mitogen-activated protein kinase)
MDA	malondialdehyd
MEK	mitogenem aktivovaná, extracelulárním signálem regulovaná kináza (mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase)
mRNA	mediátorová RNA
mTOR	savčí cíl rapamycinu (mammalian target of rapamycin)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaná forma)
NRF2	nukleární transkripční faktor (nuclear factor erythroid 2-related factor 2)
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza (phosphoinositide 3-kinase)
PKC	proteinkináza C
PLC	fosfolipáza C (phospholipase C)
PTEN	fosfatáza a homolog tensinu (phosphatase and tensin homolog)
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny (polyunsaturated fatty acid)
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma

RAS	rat sarcoma
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
RNS	reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
RONS	reaktivní formy kyslíku a dusíku (reactive oxygen and nitrogen species)
SOD	superoxiddismutáza
STAT	přenašeč signálu a aktivátor transkripce (signal transducer and activator of transcription)
T	thymin
TGF- $\beta$ 1	transformující růstový faktor $\beta$ 1 (transforming growth factor $\beta$ 1)
tRNA	transferová RNA
UV	ultrafialové (ultraviolet)
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1</b> Stádia maligního vývoje .....	24
<b>Obrázek 2</b> Poškození biomolekul vyvolané oxidačním stresem.....	25
<b>Obrázek 3</b> Vznik 8-oxo-dG.....	27
<b>Obrázek 4</b> Mechanismus transverze vlivem 8-oxo-dG .....	28
<b>Obrázek 5</b> Vznik 8-nitroguaninu a apurinového místa.....	30
<b>Obrázek 6</b> Mutace C → T vlivem UVB .....	31
<b>Obrázek 7</b> Doménová struktura p53.....	34
<b>Obrázek 8</b> Signální dráha EGFR.....	38
<b>Obrázek 9</b> Aktivační dráhy angiogeneze aktivované ROS.....	44
<b>Obrázek 10</b> Vztah mezi ROS a metastázami .....	45

## SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1</b> Příklady modifikovaných bází v buněčné DNA po oxidaci .....	26
--	----

# OBSAH

ÚVOD.....	13
1 OXIDAČNÍ STRES.....	14
1.1 Patofyziologie oxidačního stresu .....	14
1.1.1 Endogenní zdroje RONS .....	14
1.1.2 Exogenní zdroje RONS .....	15
1.2 Reaktivní formy kyslíku.....	16
1.2.1 Superoxidový radikál.....	16
1.2.2 Peroxid vodíku .....	16
1.2.3 Hydroxylový radikál.....	17
1.2.4 Kyselina chlorná.....	17
1.3 Reaktivní formy dusíku .....	17
1.3.1 Oxid dusnatý .....	17
1.3.2 Peroxynitrit.....	18
1.3.3 Oxid dusičitý .....	18
1.3.4 Nitrosyl .....	18
2 ANTIOXIDATY .....	19
2.1 Endogenní antioxidanty.....	19
2.1.1 Superoxiddismutáza.....	19
2.1.2 Kataláza .....	20
2.1.3 Glutathionreduktáza.....	20
2.1.4 Glutathionperoxidáza.....	20
2.1.5 Glutathion .....	20
2.1.6 Koenzym Q10 .....	21
2.2 Exogenní antioxidanty.....	21
2.2.1 Vitamín A .....	21
2.2.2 Vitamín C .....	21
2.2.3 Vitamín E .....	22
2.2.4 Karotenoidy.....	22
2.2.5 Zinek.....	23

2.2.6	Selen .....	23
3	OXIDAČNÍ STRES A NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ.....	24
3.1	Oxidační poškození biomolekul .....	24
3.1.1	Poškození DNA.....	25
3.1.1.1	Reaktivita vůči purinovým bázím DNA.....	27
a)	8-Oxo-2-deoxyguanosin .....	27
b)	7,8-Dihydro-8-oxoadenin .....	29
c)	8-Nitroguanin .....	29
3.1.1.2	Reaktivita vůči pyrimidinovým bázím DNA .....	30
a)	Vliv UV záření na poškození pyrimidinových bází .....	31
3.1.2	Poškození RNA .....	32
3.1.3	Poškození proteinů .....	32
a)	P53 .....	33
3.1.4	Poškození lipidů .....	35
a)	4-Hydroxynonenal.....	36
b)	Malondialdehyd.....	37
3.2	Signální dráhy a klíčové proteiny zapojené do procesu proliferace .....	37
3.2.1	Signální dráha receptoru epidermálního růstového faktoru.....	37
3.2.2	Nukleární transkripční faktor .....	38
3.2.3	RAS-MAPK .....	39
3.2.4	Fosfatidylinositol-3-kináza .....	40
3.2.5	Fosfolipáza C .....	41
3.2.6	JAK-STAT.....	42
3.2.7	Proteinkináza C .....	43
3.3	Progrese nádorového onemocnění .....	43
3.3.1	ROS a angiogeneze.....	43
3.3.2	ROS a metastáze.....	44
	ZÁVĚR.....	46
	POUŽITÁ LITERATURA .....	47

## ÚVOD

Oxidační stres je definován jako nerovnováha mezi oxidanty a antioxidanty. Oxidanty jsou produkovány vlastním metabolismem, zejména mitochondriemi a zároveň k jejich zvýšeným hladinám přispívá nadměrná konzumace alkoholu, tabákových výrobků, některých léků, vystavování UV záření a enviromentální znečištění. K vychytávání volných radikálů slouží látky, nazývané antioxidanty, které se nachází i ve stravě, např. v čerstvém ovoci a zelenině.

Nádorová onemocnění jsou charakterizována nekontrolovaným růstem buněk, které vytvářejí nádor, jenž může zůstat lokalizovaný v místě vzniku, nebo se rozšířit do různých částí těla. Rozvoj nádorového onemocnění je považován za vícestupňový proces, na kterém se podílí genetické mutace a karcinogenní látky. Mezi nejznámější vrozené genetické mutace patří mutace genu BRCA, která u nositelek zvyšuje predispozici k rozvoji rakoviny prsu. Z karcinogenních látek jsou za rizikové považovány alkohol, tabák, nezdravá strava, nedostatečná fyzická aktivita a některé infekce, např. *Human papillomavirus*.

Světová zdravotnická organizace na svých webových stránkách zveřejnila, že v roce 2022 přibylo odhadem 20 miliónů případů nádorového onemocnění a 9,7 milionů úmrtí. U přibližně 1 z 5 lidí se během života objeví nádorové onemocnění, přibližně 1 z 9 mužů a 1 z 12 žen na tuto nemoc zemře. Mezi 3 nejčastěji diagnostikovaná nádorová onemocnění v roce 2022 patřila rakovina plic, prsu a tlustého střeva a konečníku [1].

Oxidační stres, který je provázen zvýšenou hladinou oxidantů a sníženou hladinou antioxidantů, vede k poškození buněčných struktur a funkcí, což má za následek rozvoj některých onemocnění, mezi něž patří i nádorová onemocnění.

# 1 OXIDAČNÍ STRES

Oxidační stres je definován jako nerovnováha mezi oxidanty a antioxidanty, ve prospěch oxidantů, která vede k porušení redoxní signalizace a kontroly nebo k molekulárnímu poškození [2].

Oxidační stres vzniká v důsledku zvýšené tvorby reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS) nebo poklesem antioxidantní ochrany, která je charakterizována sníženou schopností endogenních systémů bojovat proti oxidačním útokům směřujícím k cílovým biomolekulám. Jeho závažnost je spojena s několika patologiemi, jako jsou kardiovaskulární onemocnění, rakovina a stárnutí [3].

## 1.1 Patofyziologie oxidačního stresu

RONS jsou charakterizovány přítomností jednoho nebo více nepárových elektronů v atomárních orbitalech, což jim propůjčuje vysoký stupeň reaktivity. Tyto radikály mohou být produkovány v buňkách ztrátou nebo přijetím jednoho elektronu, a tak se chovají jako oxidační nebo redukční činidla. Rozlišuje se endogenní a exogenní zdroj RONS [4, 5].

RONS, endogenního i exogenního původu, způsobují oxidační modifikaci hlavních buněčných makromolekul, tedy lipidů, sacharidů, proteinů a deoxyribonukleové kyseliny (DNA), které lze použít jako markery oxidačního stresu [5].

### 1.1.1 Endogenní zdroje RONS

Za endogenním zdrojem RONS stojí více než 50 enzymů, přičemž mitochondrie a nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADPH) oxidáza jsou hlavními zdroji. Dále se na jejich tvorbě podílí myeloperoxidázy, lipoxygenázy, fosfolipázy, glukózooxidázy, cyklooxygenázy a syntázy oxidu dusnatého [6, 7].

NADPH oxidáza je zdrojem radikálu superoxidového aniontu, který bývá dismutován na peroxid vodíku. Peroxid vodíku není volným radikálem, ale je schopen tvořit vysoce reaktivní formy kyslíku (ROS), a to hydroxylový radikál, který reaguje zejména s fosfolipidy v buněčných membránách a s proteiny [5].

Lipoxygenáza je enzym nehemového železa, která může generovat ROS oxidací kyseliny arachidonové. Myeloperoxidáza je hemový enzym nacházející se v lysozomech neutrofilů, makrofágů a monocytů. Syntáza oxidu dusnatého je monooxygenáza obsahující hem, která generuje NO. Existují 3 izoformy syntázy oxidu dusnatého, neuronální, endoteliální a indukibilní. V gastrointestinálním traktu je exprese syntáz oxidu dusnatého obzvláště důležitá, jelikož NO udržuje normální funkci sliznice, epiteliální sekreci a reguluje průtok krve.

Cyklooxygenáza uvolňuje kyselinu arachidonovou z membránových fosfolipidů a katalyzuje její přeměnu na prostanoidy. Cyklooxygenáza má 2 izoformy, z nichž jedna je exprimována nepřetržitě a druhá je exprimována při zánětu a karcinogenezi [6].

Mitochondrie představují primární zdroj ROS v buňkách, kdy respirační komplexy I a III jsou hlavními přispěvateli ke vzniku superoxidového radikálu. Peroxisomy hrají důležitou roli v metabolismu peroxidu vodíku, který vzniká vlivem oxidoreduktáz obsahujících flavinadenin dinukleotid. Dalším kritickým zdrojem je endoplazmatické retikulum, které generuje hlavně peroxid vodíku při skládání proteinů. Tvorba je připisována disulfidovým izomerázám, které generují jeden oxidační ekvivalent na každý vytvořený disulfid [7, 8].

### 1.1.2 Exogenní zdroje RONS

Ačkoli primárním zdrojem RONS v těle je vlastní metabolismus, mohou vznikat také působením vnějších faktorů, jako je ionizující a ultrafialové záření, znečištěné ovzduší a voda, těžké kovy, léky (cyklosporiny, gentamiciny) a drogy, například alkohol a tabák, které jsou v těle metabolizovány na volné radikály [5, 7].

Ultrafialové (UV) světlo je součástí slunečního záření a podle vlnových délek se dělí na UVA, UVB a UVC. UVA a UVB je nezbytné pro tvorbu vitamínu D. UV záření generuje ROS prostřednictvím poškození enzymu katalázy, zvýšením počtu syntáz oxidu dusnatého a snížením exprese proteinkinázy C [7].

Stravovací návyky vyznačující se nadměrnou konzumací nasycených tuků, rafinovaných cukrů a živočišných bílkovin, spolu se sníženou konzumací rostlinné vlákniny, vedou ke zvýšení produktů karboxylace bílkovin a peroxidace lipidů [7].

Kouření je významným zdrojem ROS. Odhaduje se, že jeden obláček cigaretového kouře obsahuje přibližně  $10^{15}$  volných radikálů různého původu. Dále kouřové látky zahrnují epoxidy, aldehydy, chinony a další [9].

Vznik volných radikálů vyvolaných alkoholem souvisí s metabolismem etanolu. V lidském těle byly popsány 3 metabolické dráhy, které zahrnují alkoholdehydrogenázu, mikrozomální etanol oxidační systém a katalázu. Cesta katalyzovaná alkoholdehydrogenázou za vzniku acetaldehydu, vede k tvorbě volných radikálů. Metabolismus etanolu také vytváří prostředí příznivé pro oxidační stres, jako je hypoxie. Dále může měnit hladiny určitých kovů a snižovat hladiny antioxidantů. Produkce ROS v jaterních buňkách hraje ústřední roli ve vývoji alkoholového jaterního onemocnění [10].

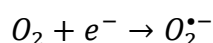
## 1.2 Reaktivní formy kyslíku

ROS je termín, který zahrnuje všechny vysoce reaktivní formy, které obsahují ve své molekule kyslík, včetně volných radikálů. Mezi ROS patří superoxidový radikál, peroxid vodíku, hydroxylový radikál, singletový kyslík a kyselina chlorná. Výše uvedené molekuly a radikály jsou schopny reagovat s nukleovými kyselinami, proteiny a dalšími molekulami, což vede k poškození buněk [11].

ROS vznikají několika způsoby, většina z nich je produkována buňkou v důsledku aerobního metabolismu v mitochondriích, ve fagocytech při ničení virů a bakterií a při detoxikaci toxických látek [11].

### 1.2.1 Superoxidový radikál

Superoxidový radikál ( $O_2^{\bullet-}$ ) vzniká jednoelektronovou redukcí kyslíku:

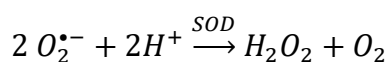


$O_2^{\bullet-}$  je produkován mitochondriemi během dýchacího řetězce. V mitochondriích je kyslík redukován o 4 elektrony na vodu pomocí cytochromoxidázy, avšak únik jednoho elektronu způsobí vznik  $O_2^{\bullet-}$ . V buňce se rychle přeměňuje na peroxid vodíku působením superoxidodismutázy (SOD) [12].

Sám prochází omezeným počtem reakcí, které se ale stávají významné při jeho zvýšené koncentraci. Je schopen inaktivovat proteiny obsahující Fe-S klastry, jako je akonitáza, kdy dochází k oxidaci klastru, který je nestabilní, železný atom disociuje a enzym se stává neaktivním. Uvolněné železo a peroxid vodíku mohou vstoupit do dalších reakcí. Dalšími významnými reakcemi jsou reakce s ostatními radikály a inaktivace ribonukleotidreduktázy [13].

### 1.2.2 Peroxid vodíku

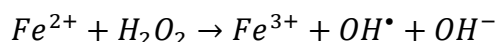
Peroxid vodíku vzniká přeměnou superoxidového radikálu pomocí SOD:



Peroxid vodíku snadno proniká buněčnými membránami, neobsahuje nepárové elektrony, tudíž není radikálem. Má však mírné oxidační vlastnosti, ale neoxiduje lipidy, DNA a proteiny, pokud neobsahují thiolovou skupinu. Peroxid vodíku je pomocí katalázy rozložen na vodu a kyslík, vlivem peroxidázy je redukován na dvě molekuly vody za použití redukčních činidel jako je glutathion a kyselina askorbová. Přes Fentonovu reakci vytváří vysoce reaktivní hydroxylový radikál [14, 15].

### 1.2.3 Hydroxylový radikál

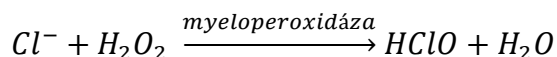
Hydroxylový radikál vzniká z peroxidu vodíku Fentonovou reakcí:



Tento radikál se vykazuje vysokou reaktivitou, což z něj činí velmi nebezpečný radikál s velmi krátkým poločasem, reaktivní téměř okamžitě na místě svého vzniku. Je známo, že reaguje s DNA, a to jak s purinovou, tak pyrimidinovou částí molekuly [16].

### 1.2.4 Kyselina chlorná

Kyselina chlorná vzniká oxidací chloridů za katalýzy enzymem myeloperoxidázou.



Kyselina chlorná je silným oxidačním činidlem. Mezi její nejvýznamnější funkce patří zabíjení patogenů, a tím přispívá k obraně hostitele. Uplatňuje se při k aktivaci kaspáz a zprostředkovávání buněčné apoptózy. Její nadprodukce ale vede k poškození biomolekul jako jsou proteiny, nukleové kyseliny a lipidy [17, 18].

## 1.3 Reaktivní formy dusíku

Skupina reaktivních forem dusíku (RNS) zahrnuje sloučeniny, které jsou odvozeny od oxidu dusnatého, včetně nitrosoniového kationtu, vyšších oxidů dusíku, peroxynitritu a S-nitrosothiolů. Každý z nich má odlišnou reaktivitu a biologickou aktivitu. RNS hrají klíčovou roli v regulaci mnoha buněk, jako jsou buňky hladké svaloviny, kardiomyocyty, krevní destičky, nervové a juxtaglomerulární buňky, avšak zvýšené hladiny RNS se podílejí na poškození buněk vyvoláním nitrosativního stresu. Jejich buněčným cílem jsou lipidy, DNA a proteiny [19].

### 1.3.1 Oxid dusnatý

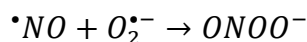
Oxid dusnatý ( $\bullet NO$ ) se podílí na řadě fyziologických funkcí jako je nervová a kardiovaskulární činnost. Je produkovaný v buňce pomocí syntáz oxidu dusnatého z L-argininu a kyslíku, okamžitě difunduje přes buněčné membrány a představuje tak druhého posla pro navození relaxace svalstva či synaptických přenosů. Zároveň je zdrojem pro ostatní reaktivní formy dusíku a při zvýšení koncentrace se stává nebezpečným kvůli vysoké reaktivitě s dalšími volnými radikály jako je superoxidový radikál [19].

Většina toxických účinků je zprostředkována jeho oxidačními produkty než jím samotným. Tudíž nepůsobí přímo na DNA, ale míra účinku závisí na jeho přeměně na vyšší oxidy dusíku.  $\bullet NO$  může reverzibilně inhibovat enzymy obsahující přechodné kovy nebo enzymy tvořící meziproducty obsahující volné radikály v jejich katalytickém cyklu. Již

v mikromolárních koncentracích reverzibilně inhibuje katalázu, cytochrom P-450, ribonukleotidreduktázu obsahující tyrosinový radikál a odpovědnou za syntézu DNA [20].

### 1.3.2 Peroxynitrit

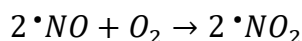
Peroxynitrit je produktem spojovací reakce dvou volných radikálů, oxidu dusnatého a superoxidu:



Peroxynitrit se za základních metabolických podmínek tvoří nepřetržitě, ale při zvýšené tvorbě  $\cdot NO$  a  $O_2^{\cdot -}$  v buňce nebo v tkáni se projeví jeho reaktivita vůči biomolekulám a iniciace tvorby volných radikálů. Jedná se o patogenetický mediátor v řadě chorobných stavů, zvláště kardiovaskulárních, neurodegenerativních a zánětlivých poruch [21].

### 1.3.3 Oxid dusičitý

Oxid dusičitý ( $\cdot NO_2$ ) může být uvolňován z cévních endotelových buněk a ze stimulovaných makrofágů procesem autooxidace oxidu dusnatého.



Jedná se o relativně pomalý proces ve vodné fázi za fyziologických podmínek vzhledem k nízkým hladinám  $\cdot NO$  a  $O_2$ .  $\cdot NO_2$  je dobrým oxidantem, reakcí dvou radikálů vzniká vysoce reaktivní dimer oxidu dusičitého  $N_2O_4$ . Vystavení nízkým koncentracím  $\cdot NO_2$  vede k vyčerpání antioxidantů doprovázené vznikem lipidových hydroperoxidů. Při reakci s molekulami dochází k přenosu elektronů za vzniku dusitanu a radikálu biomolekuly, může tak dojít ke změně struktury biomolekuly, a tím i její funkce, nebo radikál molekuly může reagovat s dalším radikálem, s biomolekulovým nebo s  $\cdot NO_2$ .  $\cdot NO_2$  také rychle oxiduje thioláty [22].

### 1.3.4 Nitrosyl

Nitrosionový kationt ( $NO^+$ ) představuje oxidovanou formu oxidu dusnatého. Oxidací NO kyslíkem, superoxidovým aniontem a přechodovými kovy vzniká oxid dusičitý, který dále poskytuje nitrosionový kationt [23].

$NO^+$  reaguje s biologickými thioley jako je glutathion nebo cystein za vzniku S-nitroso sloučenin, dále reaguje se sekundárními aminy a vytváří nitrosoaminy, které jsou karcinogenní v nízkých dávkách [23].

## 2 ANTIOXIDATY

Biologickým antioxidantem se rozumí jakákoli sloučenina, která je schopna zpomalit nebo zabránit oxidaci substrátu. Antioxidanty tedy snižují množství oxidantů a zabraňují tak rozvoji oxidačního stresu [7].

Antioxidanty lze obecně rozdělit do několika skupin: přírodní a syntetické; polární a nepolární; enzymatické a neenzymatické; endogenní a exogenní, a podle mechanismu, na kterém se podílejí:

- i. přenos atomů vodíku,
- ii. přenos elektronů,
- iii. chelatace kovů [24].

Svou aktivitu vykazují třemi různými cestami:

- i. prevence vzniku volných radikálů a jejich derivátů,
- ii. přerušení oxidačních reakcí se vznikem radikálů,
- iii. inaktivace volných radikálů či derivátů radikálů vniklých reakcemi [24].

### 2.1 Endogenní antioxidanty

Endogenními antioxidanty jsou převážně enzymy, SOD, kataláza, glutathionreduktáza a glutathionperoxidáza, které redukují volné radikály. Neenzymatickými antioxidanty jsou glutathion a kyselina lipoová, jež jsou produktem metabolismu organismu a působí jako druhá obranná linie proti ROS rychlou inaktivací radikálů [24].

Dále se na antioxidantní ochraně podílí i bílkoviny, jako je laktoferin, ferritin a ceruloplazmin, které sekvestrují prooxidanty, jako jsou ionty kovů a hem. Antioxidanty této skupiny mají substrátovou specifitu, což omezuje jejich aktivitu [7].

#### 2.1.1 Superoxiddismutáza

SOD patří do skupiny metaloenzymů, první obranné linie proti poškození buněk způsobené ROS. Katalyzují dismutaci  $O_2^{\bullet-}$  na molekulární kyslík a peroxid vodíku, čímž snižují hladinu  $O_2^{\bullet-}$ , který při zvýšené koncentraci poškozuje buňky. Tato reakce je doprovázená oxidací a redukcí kovových iontů, které jsou přítomné v aktivním místě enzymu. Na základě kovových kofaktorů se rozlišují čtyři skupiny SOD: Cu-Zn-SOD, Fe-SOD, Mn-SOD, Ni-SOD, které se nacházejí v různých subcelulárních kompartmentech [25].

SOD slouží jako protizánětlivý prostředek a může také zabránit přednádorovým změnám buněk. Přirozená hladina SOD v těle klesá s přibývajícím věkem, a proto jsou starší lidé náchylnější k nemocem souvisejícím s oxidačním stresem [25].

### **2.1.2 Kataláza**

Kataláza je homotetramer, ve kterém každý monomer obsahuje skupinu hemu b zodpovědnou za enzymatickou aktivitu. Enzym se nachází hlavně v peroxizomech, ale aktivita katalázy byla prokázána i v cytoplazmě, mitochondriích a také na cytoplazmatické membráně nádorových buněk [26].

Její hlavní funkcí je dismutace peroxidu vodíku na kyslík a vodu. Dále vykazuje peroxidázovou aktivitu, jako je rozklad metanolu, mravenčanu, azidu, hydroxyperoxidu a etanolu, jež se oxiduje na acetaldehyd, který je metabolizován v játrech. Může rozkládat peroxyinitrit a oxidovat oxid dusnatý na dusitany. Další rolí je detoxikace toxických a aktivace protinádorových látek [27].

### **2.1.3 Glutathionreduktáza**

Glutathionreduktáza je klíčový enzym, který navrácí oxidovaný glutathion zpět do redukované formy. Tento enzym obsahuje domény, z nichž jedna váže flavinadeninukleotid a NADPH. V katalytickém místě obsahuje 2 cysteiny spojené disulfidickou vazbou. Nachází se v cytoplazmě a v různých organelách, včetně jádra a mitochondrií [28].

### **2.1.4 Glutathionperoxidáza**

Glutathionperoxidáza má 8 izoenzymů, z nichž 5 obsahuje ve svém aktivním místě aminokyselinu selenocystein a zbylé cystein. Tyto enzymy hrají důležitou roli v detoxikaci a signalizaci peroxidu vodíku. Každý z nich vykazuje několik odlišných vlastností týkajících se exprese, mechanismu účinku a regulace [29].

### **2.1.5 Glutathion**

Glutathion existuje převážně jako redukovaný tripeptid, který se nachází ve vysokých koncentracích jak v eukaryotických, tak v prokaryotických buňkách. Kovalentním spojením dvou molekul glutathionu přes disulfidovou vazbu mezi postranním řetězcem cysteinu a dvěma atomy síry vzniká oxidovaný glutathion [30].

Glutathion plní mnoho různých funkcí, včetně detoxikace těžkých kovů, redukce určitých ROS, např. peroxidu vodíku, a předpokládá se, že má zásadní úlohu při biogenezi Fe-S klastrů. Je syntetizován ve dvou enzymem katalyzovaných, adenosintrifosfát (ATP) závislých krocích, které probíhají v cytosolu. Přestože syntéza glutathionu je omezena pouze na cytosol, předpokládá se, že se glutathion nachází téměř ve všech buněčných kompartmentech. Při fyziologickém pH se jedná o negativně nabitou molekulu, která není

schopna volně difundovat přes lipidovou dvouvrstvu, proto každá buněčná membrána obsahuje transportéry zprostředkující import a export glutathionu [30].

### **2.1.6 Koenzym Q10**

Koenzym Q10 je přítomen ve všech tkáních, přičemž v nejvyšších koncentracích se nachází v srdci, ledvinách, játrech a svalech. Strukturně se jedná o benzochinonový kruh s postranním řetězcem složeným z 10 izoprenových jednotek. Existuje ve třech oxidačních stavech – plně redukováná forma, radikálový meziprodukt a plně oxidovaná forma [31].

Koenzym Q10 plní řadu buněčných funkcí, hlavně v mitochondriích, kde plní roli při přenášení elektronů z komplexu I a II do komplexu III během oxidativní fosforylace. Podílí se také na metabolismu pyrimidinů. Zároveň slouží jako důležitý antioxidant rozpustný v tucích, který chrání buněčné membrány před oxidačním stresem. Kromě toho, že působí jako antioxidant, podílí se i na regeneraci antioxidantů, a to vitamínu C a E. Také bylo prokázáno, že přímo ovlivňuje expresi řady genů [32].

## **2.2 Exogenní antioxidanty**

Exogenní antioxidanty jsou přijímány stravou prostřednictvím konzumace ovoce, zeleniny a doplňků stravy. Jedná se o vitamíny A, C, E, karotenoidy, flavonoidy, fenoly a kovy Zn a Se. Působí společně s endogenními antioxidanty proti zhoršujícím účinkům oxidačního stresu a pomáhají udržovat redoxní rovnováhu. Předpokládá se, že strava bohatá na antioxidanty může být zdraví prospěšná [7].

### **2.2.1 Vitamín A**

Vitamín A je označení pro skupinu retinoidů a karotenoidů rozpustných v tucích. Karoteny jsou prekurzory vitamínu A, retinol funguje jako zásobní forma vitamínu a může být přeměněn na aktivnější formy jako je kyselina retinová a retinal. Jak retinol, tak  $\beta$ -karoten mají antioxidační vlastnosti, ale  $\beta$ -karoten má antioxidační vlastnosti výraznější. Navíc  $\beta$ -karoten předchází oxidaci retinolu. Oba působí jako řetězové antioxidanty v průběhu peroxidace lipidů. Nicméně tato aktivita se projevuje jen při nízkém parciálním tlaku kyslíku, při vyšších tlacích se projevuje autokatalytický a prooxidativní účinek. Retinol také zvyšuje antioxidační účinek kyseliny askorbové [33].

### **2.2.2 Vitamín C**

Lidské tělo je jako jeden z mála organismů závislý na příjmu vitamínu C (kyseliny L-askorbové) ve stravě, což souvisí s nedostatkem enzymu L-gulonolaktonoxidázy, která katalyzuje poslední fázi biosyntézy vitamínu C [34].

Základní biologickou funkcí vitamínu C, kromě funkce kofaktoru několika enzymů, je ochrana buněk před volnými radikály, které běžně vznikají při metabolismu. Představuje tak hydrofilní antioxidant, který se hromadí ve vodní fázi buněk. Hydroxylové skupiny na dvojné vazbě v laktonovém kruhu jsou dárce protonů a elektronů a přeměňují se na diketonovou část, což určuje silné redukční vlastnosti a umožňuje ochranu před oxidací dalších buněčných struktur. Tyto hydroxylové skupiny jsou reaktivní se singletovým kyslíkem, peroxidem vodíku, peroxidovými a hydroxylovými radikály [34].

### 2.2.3 Vitamín E

Vitamín E je lipofilní vitamín. V porovnání s ostatními lipofilními vitamíny se nachází ve všech buněčných membránách a je přítomen v celém těle v nejvyšší koncentraci. Zahrnuje 8 izomerů, 4 tokoferoly ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - tokoferol) a 4 tokotrienoly ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - tokotrienol). Jelikož tělo nedokáže syntetizovat tuto skupinu vitamínů, musí být přijímána stravou. Vitamín E vykazuje mnoho prospěšných účinků na lidské zdraví, např. protialergické, protirakovinné, kardiovaskulární, antidiabetické, a předpokládá se, že hraje významnou roli v regulaci redoxních interakcí v těle [35].

Obecně lze říct, že antioxidační účinky izomerů vitamínu E závisí na počtu methylových skupin na chromanovém kruhu.  $\alpha$ -Tokoferol má tři methylové skupiny,  $\delta$ -tokoferol jen jednu, antioxidační aktivita mezi izomery je v pořadí  $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ . Vitamín E odstraňuje peroxylové radikály a ukončuje oxidaci polynenasycených mastných kyselin (PUFA). V přítomnosti vitamínu E reagují peroxidové radikály s  $\alpha$ -tokoferolem místo s lipidovým hydroperoxidem, řetězová reakce tvorby peroxidových radikálů se zastaví a zabrání se další oxidaci PUFA v membráně [35, 36].

### 2.2.4 Karotenoidy

Karotenoidy jsou barevné pigmenty rozpustné v tucích vyskytující se v rostlinách, houbách, bakteriích, řasách a jsou přítomny v potravinách, jako je ovoce, zelenina a ryby. Existuje více než 600 druhů karotenoidů, z nichž pouze 40 je přítomno v typické stravě a 20 karotenoidů bylo identifikováno v lidské krvi a v tkáních. Mezi tyto karotenoidy patří  $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -karoten, lykopen a lutein. Užívání stravy bohaté na karotenoidy souvisí s nižším výskytem rakoviny, kardiovaskulárního onemocnění, osteoporózy a cukrovky [37].

Příznivé účinky karotenoidů jsou převážně odvozeny od antioxidačních účinků. Díky přítomnosti konjugovaných dvojných vazeb těchto sloučenin jsou schopny přijímat elektrony od reaktivních druhů a následně neutralizovat volné radikály [37].

### **2.2.5 Zinek**

Zinek je po železe druhým nejvíce rozšířeným stopovým prvkem v lidském těle, nejvíce je zastoupen ve svalech a kostech, dále v kůži a játrech. Mírný nedostatek vede ke zhoršené imunitě, zpomalenému růstu, zvýšení oxidačního stresu a k tvorbě zánětlivých cytokinů [38].

Zinek je kofaktorem cytosolického a extracelulárního enzymu Cu-Zn SOD, který katalyzuje dismutaci superoxidového radikálu na méně škodlivý  $H_2O_2$  a  $O_2$ . Dalším antioxidačním účinkem zinku je inhibice NADPH oxidázy [38].

### **2.2.6 Selen**

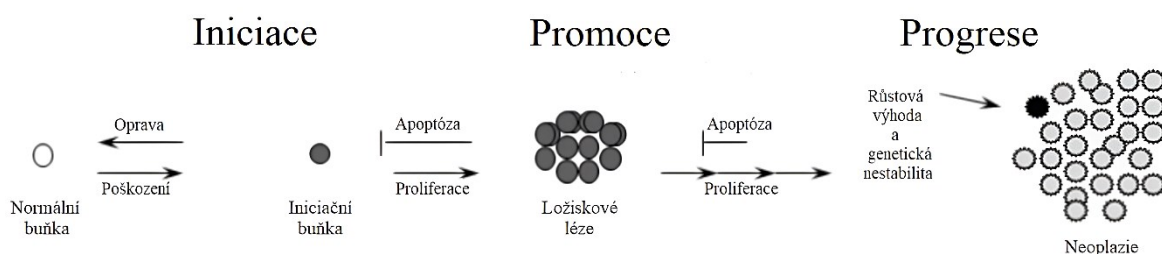
Selen je známou esenciální mikroživinou, která se podílí na mnoha biologických procesech. Je nezbytný pro správnou funkci štítné žlázy, mozku, svalů, prostaty a varlat. Selen vykazuje antioxidační a protinádorovou obranu tím, že je zabudován do struktury selenoproteinů – glutathionperoxidáz, thioredoxinreduktáz, selenoproteinu P, selenoproteinu S a selenoproteinu F [39].

### 3 OXIDAČNÍ STRES A NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ

Rakovina je jednou z hlavních příčin úmrtí. Navzdory rozsáhlému výzkumu a značnému úsilí o vývoj cílené léčby se mnoho nádorů stále vyznačuje špatnou prognózou a vysokou úmrtností [40].

Rakovina definuje zhoubné novotvary charakterizované metastatickým růstem a může se vyskytovat téměř v každém orgánu a tkáni. Vývoj rakoviny je stále považován za vícestupňový proces, během něhož genetické změny poskytují růstové výhody, a tak dochází k postupné transformaci normální buňky v maligní nádorovou buňku [41].

Konkrétně lze raný vývoj rakoviny definovat do 3 fází na základě molekulárních, buněčných a patologických charakteristik přechodu normální buňky do neoplastického stavu. Tyto 3 fáze byly definovány jako iniciace, promoce a progrese (viz obr. 1) [42].



**Obrázek 1** Stádia maligního vývoje; upraveno a převzato z [42]

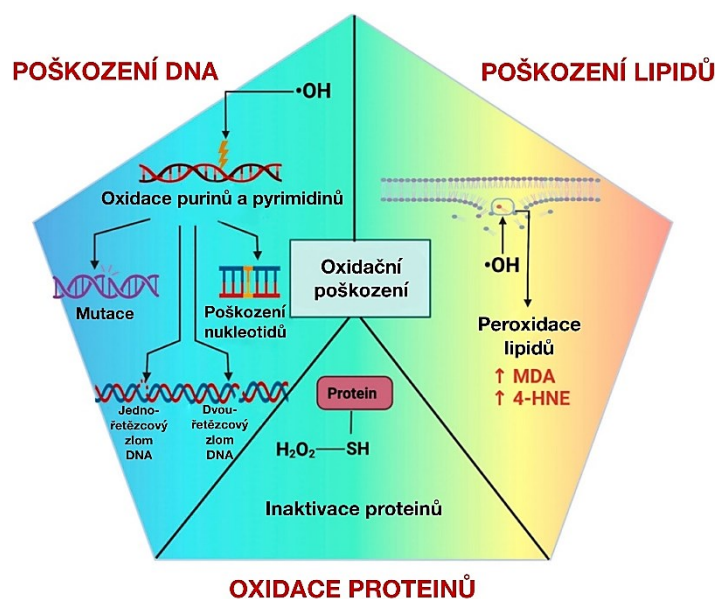
Změněná redoxní rovnováha a dysregulovaná redoxní signalizace se může významně podílet na progresi maligního onemocnění a rezistenci vůči léčbě. Předpokládá se, že nádorové buňky vykazují trvale zvýšené množství ROS v důsledku genetických a metabolických změn [40].

Jsou-li RONS produkovány v dostatečném množství tak, aby byla překročena antioxidační ochrana, může dojít k ireverzibilnímu poškození nukleových kyselin, proteinů a lipidů, což vede ke genetickým anebo epigenetickým změnám onkogenů a tumor-supresorových genů [43].

Signální děje zprostředkované oxidačním stresem ovlivňují charakter chování nádorových buněk. ROS jsou v buněčném cyklu zapojeny do proliferace a progrese, přežití buněk a apoptózy, energetického metabolismu, buněčné pohyblivosti a adheze, angiogeneze, morfologie buněk a udržování kmenových nádorových buněk [44].

#### 3.1 Oxidační poškození biomolekul

Oxidační stres způsobuje oxidační poškození nukleových kyselin, proteinů, lipidů (viz obr. 2) a sacharidů. Poškození membránových lipidů, strukturálních proteinů, enzymů a nukleových kyselin vede k abnormální funkci buněk [7].



**Obrázek 2** Poškození biomolekul vyvolané oxidačním stresem; upraveno a převzato z [7]

Například nadbytek hydroxylového radikálu a peroxynitritu může způsobit peroxidaci lipidů, a tím poškodit buněčné membrány a lipoproteiny. To vede k tvorbě malondialdehydu a konjugovaných sloučenin dienu, které jsou cytotoxické a mutagenní. Lipidová peroxidace se šíří velmi rychle, jelikož se jedná o radikálovou řetězovou reakci, a tak ovlivňuje velké množství lipidových molekul. Proteiny podléhají vlivem oxidačního stresu konformačním modifikacím, které mohou způsobit ztrátu nebo zhoršení jejich enzymatické aktivity. I DNA je náchylná ke změnám souvisejícím s oxidačním stresem, z nichž nejreprezentativnější je tvorba 8-oxo-2'-deoxyguanosinu (8-oxo-dG). Jedná se o zhoubnou změnu DNA, která může být zodpovědná za mutagenезi [45].

### 3.1.1 Poškození DNA

DNA je jednou z nejdůležitějších molekul v živých buňkách. Jedná se o polymer tvořený monomerními jednotkami zvanými nukleotidy. Nukleotid se skládá z pětiuhlíkatého cukru deoxyribózy, dusíkaté báze a jedné nebo více fosfátových skupin. V DNA se nachází 4 různé báze: purinové – adenin (A) a guanin (G), a pyrimidinové – cytosin (C) a thymin (T). DNA má dvouvláknovou šroubovicovou strukturu, jejíž obě vlákna probíhají v opačných směrech, tzn. jedno vlákno je vedeno od 5' k 3' konci, zatímco druhé vlákno je vedeno od 3' k 5' konci. Oba řetězce interagují prostřednictvím vodíkových vazeb mezi dvojicemi bází, přičemž adenin se vždy páruje s thyminem a guanin s cytosinem [46].

Každá lidská buňka zažije více než 10 000 poškození DNA denně, z nichž většina je obvykle způsobena běžnými buněčnými procesy. Například spontánní chyby během replikace DNA mohou mít za následek začlenění nesprávných nukleotidů do nově syntetizované

molekuly DNA, což způsobí nesoulad párování bází. RONS jsou považovány za látky zodpovědné za řadu lézí DNA vznikajících v důsledku oxidačního stresu, včetně vzniku apurinových nebo apyrimidinových míst, jedno nebo dvouřetězcových zlomů a substitucí bází [47].

Důsledkem expozice ROS, ať už endogenního či exogenního původu, je oxidační poškození DNA, čímž vzniká riziko narušení buněčné funkce a vzniku mutací. Oxidační poškození DNA patří mezi hlavní mutagenní procesy v zárodečné linii a provází tak raný vývoj. Proto se škodlivé mutace mohou potencionálně přenášet na většinu buněk v těle a poškozená místa mohou mít vliv i na ostatní buňky. V průběhu života dochází k oxidačnímu poškození DNA a vzniklé mutace přispívají nejen k rozvoji rakoviny, ale také k neurodegeneraci a stárnutí [48].

ROS poškozují DNA buď přímým působením na DNA nebo ovlivněním proteinů, které jsou zapojeny do jejího udržování. Zároveň se ROS účastní signalizace a odpovědi na poškození DNA, což ukazuje duální roli ROS. Doposud bylo identifikováno asi 100 různých oxidativně vytvořených bazických lézí nebo modifikací v *in vitro* studiích, ale počet a typ produktů skutečně vytvořených v buněčné DNA (viz tab. 1) je mnohem nižší, buď kvůli nedostatečné citlivosti detekčních metod nebo nestabilitě takových lézí [49].

**Tabulka 1** Příklady modifikovaných bází v buněčné DNA po oxidaci; upraveno a převzato z [49]

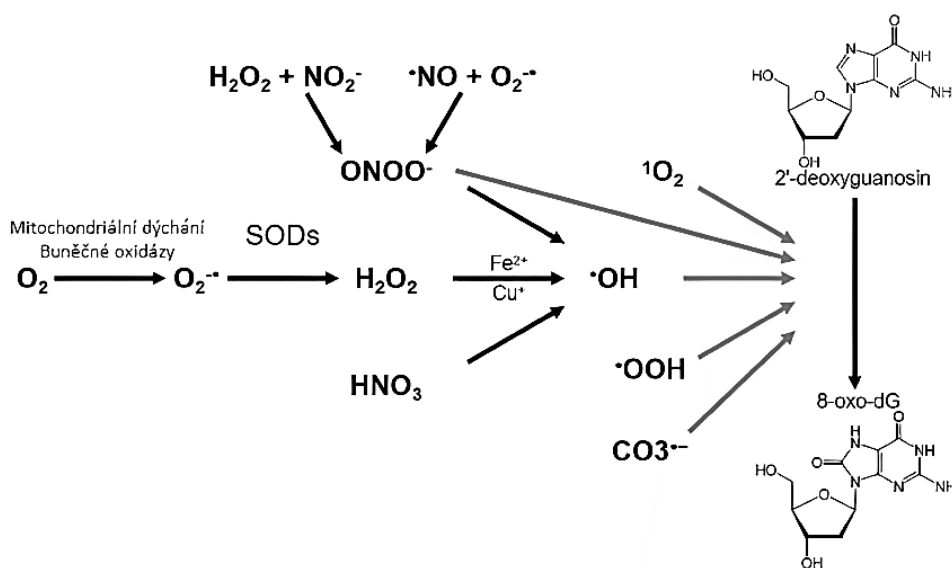
Adenin	8-oxo-7,8-dihydroadenin
	4,6-diamino-5-formamidopyrimidin
Guanin	8-oxo-7,8-dihydroguanin
	2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin
Cytosin	5-hydroxycytosin
	5-hydroxyuracil
	5,6-dihydroxy-5,6-dihydrouracil
	5-hydroxyhydantoin
Thymin	5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymin
	5-hydroxymethyl-uracil
	5-formyluracil

### 3.1.1.1 Reaktivita vůči purinovým bázím DNA

Mechanismus tvorby 8-oxo-purin reakcí  $\text{OH}^\bullet$  s DNA telecího brzlíku a dvouvláknovými oligonukleotidy byl v přítomnosti kyslíku podrobně zkoumán. Ke tvorbě 8-oxo-dG přispívají tři cesty. Přímý přídavek  $\text{OH}^\bullet$  na pozici C8 guaninové skupiny za vzniku 8-HodG $^\bullet$  představuje minoritní cestu (přibližně 5 %). Druhou cestou je ztráta jednoho elektronu, následována hydrolýzou, která vede ke stejnému radikálovému aduktu, jenž podléhá oxidaci na 8-oxo-dG. Třetí cesta, která vede ke vzniku 8-oxo-dG, zahrnuje útok  $\text{OH}^\bullet$  na sousední thymidinovou bázi. Modelové experimenty, které zahrnovaly expozici oligonukleotidů a DNA telecího brzlíku  $\text{OH}^\bullet$ , prokázaly, že v přítomnosti kyslíku je přibližně 50 % 8-oxo-dG produkováno intramolekulárním přídavkem dočasně vytvořeného pyrimidinového peroxyradikálu na C8 sousední guaninové báze. Zároveň bylo zjištěno, že tvorba 8-oxo-2'-deoxyadeninu je 10× nižší než 8-oxo-dG, což je přičítáno absenci cesty jednoelektronové oxidace a v menší míře účasti intramolekulárního peroxyradikálu na adeninové bázi. Nukleobáze guanin, která má nejnižší redukční potenciál, je hlavním místem oxidace v DNA. Na vzniku 8-oxo-dG se kromě  $\text{OH}^\bullet$  mohou podílet další oxidační druhy jako je  $\text{H}_2\text{O}_2$ , singletový kyslík,  $\text{HOCl}$  nebo  $\text{ONOO}^-$  [50].

#### a) 8-Oxo-2-deoxyguanosin

Nukleosid 8-oxo-2'-deoxyguanosin nazývaný taktéž 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin nebo 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin je známým biomarkerem oxidativního poškození DNA, který vzniká během interakce 2'-deoxyguanosinu s hydroxylovým radikálem. Nicméně i další reaktivní druhy kyslíku (viz obr. 3) mohou zasahovat do tohoto procesu [51-53].



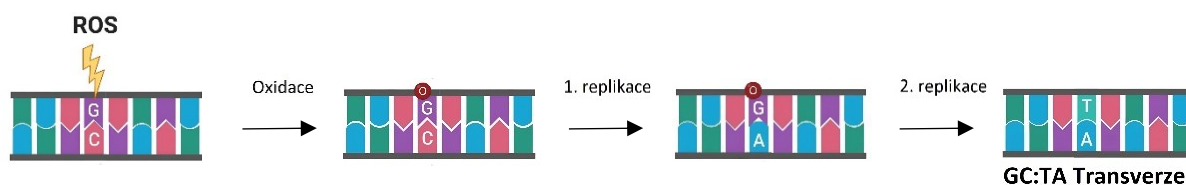
Obrázek 3 Vznik 8-oxo-dG; upraveno a převzato z [53]

Účinky 8-oxo-dG lze rozdělit do tří skupin:

- i. mutagenese a reparace nukleových kyselin,
- ii. regulace exprese genů,
- iii. kontrola zánětu a oxidačních procesů.

První a druhá skupina účinků je realizována převážně 8-oxo-dG, který je součástí DNA, zatímco třetí skupina je realizována volným 8-oxo-dG [52].

*In vitro* a *in vivo* studie prokázaly, že tvorba 8-oxo-dG v DNA, není-li opravena před replikací DNA, indukuje cílené transverze G:C na T:A. Při oxidaci 2'-deoxyguanosinu se vytváří pár 8-oxo-dG:deoxycytidin (dC), následně při replikaci v oblasti DNA obsahující 8-oxo-dG, je 8-oxo-dG chybně vynechán, což způsobí inzerci 2'-deoxyadenosinu, čímž se vytvoří pár 8-oxo-dG:deoxyadenosin (dA). Je-li chybný pár ponechán neopraven během druhého kola replikace, vytvoří se pár bází deoxythymidin (dT):dA (viz obr. 4). Ve spojení s onkogeny nebo tumor-supresorovými geny by to mohlo vést k začátku rakoviny [54, 55].



**Obrázek 4** Mechanismus transverze vlivem 8-oxo-dG; upraveno a převzato z [55]

8-Oxo-dG je schopen přijmout *anti* nebo *syn* konformaci v závislosti na úhlu okolo glykosidické vazby. *Syn* konformace je energeticky výhodnější, když se na C8 nachází kyslík. To, která báze se páruje s 8-oxo-dG, závisí na tom, zda je přijata konformace *syn* nebo *anti*. Při konformaci *syn* 8-oxo-dG strukturně imituje dT, což vysvětluje promutagenní charakter 8-oxo-dG:dA. Nicméně dA není vždy účinně začleněn proti 8-oxo-dG, protože polymeráza  $\beta$  může otáčet základní vlákno 8-oxo-dG pro efektivní párování s dC. Naopak DNA polymeráza  $\delta$  se zastaví v přítomnosti 8-oxo-dG, což umožňuje přepnutí na jiné polymerázy, včetně polymerázy  $\eta$ , která udržuje vysokou přesnost párování s dC. Přesto párování 8-oxo-dG:dA často uniká opravě DNA, protože strukturně imituje dT:dA a nezpůsobuje tak zkreslení DNA helixu. Naopak 8-oxodG:dC způsobuje mírné zkreslení struktury DNA helixu, což je snáze rozpoznáno proteiny opravující DNA a vede tak k odstranění 8-oxo-dG [53-55].

Specifické enzymatické odstranění 8-oxo-dG je katalyzováno mechanismy *base excision repair* a *nucleotide excision repair*. U savců 8-oxo-dG DNA glykosyláza rozpoznává 8-oxo-dG naproti dC a štěpí N-glykosidickou vazbu mezi bází a deoxyribózou. Tímto mechanismem vzniká apurinové místo a spouští se mechanismus *base excision repair*. Pokud není 8-oxo-dG odstraněn a dochází k replikaci DNA, glykosyláza MTH1 vyřazuje adenin

spárovaný s 8-oxo-dG a zároveň podporuje aktivitu 8-oxo-dG DNA glykosylázy. Po odstranění může být adenin nahrazen cytosinem. Tímto způsobem lze zabránit hromadění 8-oxo-dG v DNA [53].

Mnoho studií zjišťovalo zvýšené hladiny 8-oxo-dG v moči nebo v DNA tumorové tkáně ve srovnání se zdravou tkání. Například ve studiích na karcinomech prsu byly hladiny 8-oxo-dG 8–17× vyšší než u zdravé tkáně prsu, nízké hladiny v tumorové tkáni, séru a moči u pacientů s rakovinou jsou spojeny s vyšším stupněm a nízké hladiny v séru a tkáni jsou charakteristické pro agresivnější formu rakoviny [54].

U nádorů trávicího traktu, jako je karcinom tlustého střeva a žaludku, jsou zvýšené hladiny 8-oxo-dG spojeny jak s patogenním vývojem onemocnění, tak s jeho možnou validací jako nádorového markeru. Zvýšené koncentrace 8-oxo-dG ve tkáni karcinomu tlustého střeva korelovaly s akumulací genetických mutací, které charakterizovaly evoluci nádoru [56].

#### ***b) 7,8-Dihydro-8-oxoadenin***

Adenin podléhá oxidaci méně ve srovnání s guaninem, jelikož má vyšší redoxní potenciál. K oxidaci adeninu na 7,8-dihydro-8-oxoadenin, zkráceně 8-oxoadenin (8-oxoA) dochází převážně vlivem  $\text{OH}^\bullet$ . Oxidační léze adeninu byly nalezeny v mnoha nádorových tkáních hrtnu, vaječnících, mozku a plic [57].

Mutagenní potenciál 8-oxoA je dán jeho schopností nejednoznačného párování bází. Párování 8-oxoA s thyminem tvoří stabilní pár, na rozdíl od párů 8-oxoA:C u nějž byly prokázány strukturní a dynamické rozdíly, které mohou bránit rozpoznání poškozeného místa DNA glykosylázami. Dále se 8-oxoA může párovat s guaninem [57].

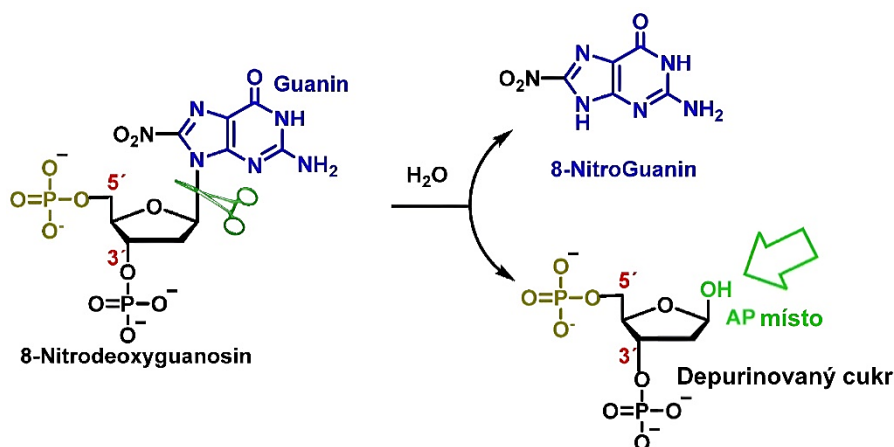
8-OxoA je schopen vyvolat mutaci v syntetickém protoonkogenu HRAS, což vede k jeho aktivaci a naznačuje roli v karcinogenezi. Zároveň 8-oxoA specifické substituce thyminu na guanin a thyminu na cytosin, které jsou nejčastěji pozorované v kontextu CTT sekvence byly zjištěny u adenokarcinomu jícnu a žaludku, B-buněčného non-Hodgkinského lymfomu a karcinomu slinivky [57].

#### ***c) 8-Nitroguanin***

K tvorbě 8-nitroguaninu dochází přidáním  $^\bullet\text{NO}_2$  do polohy C8. Přidání  $^\bullet\text{NO}_2$  do polohy C5 generuje nestabilní adukty, které se rychle rozkládají na 5-guanidino-4-nitroimidazol [58].

Poškození DNA způsobené peroxyinitritem je především oxidační. Peroxyinitrit může také způsobit oxidaci deoxyribózy a zlom řetězce. Vznikající 8-nitroguanin je nestabilní a může být spontánně eliminován, čímž dochází ke vzniku apurinového místa (viz obr. 5). Zároveň

během syntézy DNA se může 8-nitroguanin spárovat s adeninem, což vede k transversím GT. Na základě těchto informací lze 8-nitroguanin považovat za mutagenní lézi DNA, která se podílí na karcinogenezi [58].



Obrázek 5 Vznik 8-nitroguaninu a apurinového místa; upraveno a převzato z [58]

### 3.1.1.2 Reaktivita vůči pyrimidinovým bázím DNA

Tak jako vlivem  $\text{OH}^\bullet$  docházelo ke vzniku purinových modifikací, dochází i ke vzniku pyrimidinových modifikací. Útokem  $\text{OH}^\bullet$  na pyrimidiny dochází ke vzniku různých pyrimidinových aduktů, přestože jsou pyrimidinové báze méně náchylné k oxidaci, i když mají vyšší redoxní potenciál než puriny [59, 60].

$\text{OH}^\bullet$  se přidává ke dvojné vazbě mezi C5 a C6 cytosinu a thyminu, čímž vznikají radikály C5- $\text{OH}^\bullet$  a C6- $\text{OH}^\bullet$ . Dochází také k odtržení vodíku z methylové skupiny thyminu, což vede ke vzniku allylového radikálu. Adukty pyrimidinových radikálů mají redukční a oxidační vlastnosti. Oxidace C5- $\text{OH}^\bullet$  a C6- $\text{OH}^\bullet$  aduktů, následovaná přidávkem vody a deprotonací produkuje thymin-glykol a cytosin-glykol. Allylový radikál thyminu poskytuje po oxidaci 5-(hydroxymethyl)uracil a 5-formyluracil. V přítomnosti kyslíku, který reaguje s meziprodukty radikálů vznikají peroxylové radikály, které jsou nestabilní a rozkládají se na další produkty. Rozkladem pyrimidinových hydroxyhydroperoxidů vznikají 5,6-dihydroxycytosin, aloxan a 5-hydroxyhydantoin. V nepřítomnosti kyslíku dochází k redukci C5- $\text{OH}^\bullet$  a C6- $\text{OH}^\bullet$  aduktů, následovanou protonizací, čímž vznikají 5-hydroxy-6-hydroypyrimidiny, resp. 6-hydroxy-5-hydroypyrimidiny. Cytosin-glykol a další produkty cytosinu se snadno dehydratují a deaminují, což vede ke vzniku produktů jako 5-hydroxycytosin, uracil-glykol, 5-hydroxyuracil, 5-hydroxy-6-hydroxyuracil a 5,6-dihydroxyuracil [61].

5-Formyluracil, protějšek 5-formylcytosinu, je další modifikací pyrimidinové báze, která se v buňkách nachází v nižším množství než 5-formylcytosin. 5-Formyluracil je jednou z oxidačních lézí thyminu v DNA a může vznikat působením UV záření, ionizujícího světla

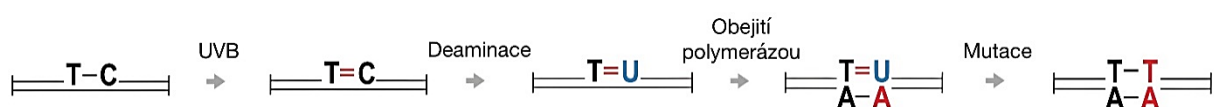
a také vlivem ROS. 5-Formyluracil během replikace DNA způsobuje chybné kódování a bodové mutace, dále může v jednořetězcové DNA zesíťovat peptidy za vzniku Schiffovy báze, zároveň zesíťování mezi DNA a proteiny je cytotoxické. Tím dochází k narušení interakcí DNA s proteiny, což má za následek narušení normálních buněčných procesů. Ze studií vyplývá, že rozdílný obsah modifikací 5-formylpyrimidinu mezi nádorovou a parakancerózní tkání může být spojen s rozvojem nádorů [62].

Biomarkery oxidačního stresu, thymin-glykol a formamidový zbytek pyrimidinových bází, vzniklých oxidací pyrimidinu, byly zvýšené u žen s rakovinou vaječníku ve srovnání s kontrolními skupinami. Zároveň bylo zaznamenáno zvýšené množství pyrimidinových lézí u žen nesoucích mutaci BRCA, bez zjevných příčin onemocnění než u zdravé kontrolní skupiny. Toto zjištění naznačuje, že oxidační poškození DNA není důsledkem nemoci, ale spíše předzvěstí onemocnění. Nositelky genu BRCA mají celoživotní zvýšené riziko rakoviny prsu a až 80% zvýšené riziko rakoviny vaječníků [60].

#### **a) Vliv UV záření na poškození pyrimidinových bází**

UVA a v menší míře UVB složky slunečního záření mají schopnost vyvolat různé oxidační dráhy v kůži. UVB je slabým generátorem fotooxidačních reakcí DNA, naopak UVA prostřednictvím excitace vhodných endogenních nebo exogenních fotosenzibilátorů může vyvolat vznik několika ROS. UVA i UVB záření je schopno vyvolat oxidační reakce, které mohou přetrvávat i po ukončení ozařování. U buněk vystavených UVB záření vznikají fotoprodukty DNA dimerizačními reakcemi mezi dvojnou vazbou C5 a C6 pyrimidinových bází. Nejčastějšími fotoprodukty jsou cyklobutan-pyrimidinové dimery (CPD) [63].

CPD lze považovat za premutagenní lézi u melanomových a nemelanomových kožních nádorů, která vede k mutaci C na T a CC na TT. TT a TC sekvence jsou nejvíce náchylné k tvorbě CPD, pozice thyminu v CPD není mutagenní díky začlenění adeninu proti thyminu polymerázou  $\eta$  a dalšími DNA polymerázami. Avšak přesný mechanismus, jak CPD obsahující cytosiny způsobuje mutace C na T, zůstal neznámý. Existující modely zahrnují DNA polymerázy náchylné k chybám, které začleňují adenin přes CPD obsahující cytosin. Další model navrhuje, že cytosin v CPD nejprve podléhá deaminaci za vzniku uracilu a poté polymeráza  $\eta$ , začlení adenin přes deaminované CPD obsahující uracil (viz obr. 6) [64].



**Obrázek 6** Mutace C  $\rightarrow$  T vlivem UVB, upraveno a převzato z [64]

### 3.1.2 Poškození RNA

Ribonukleová kyselina (RNA) je po chemické stránce podobná DNA. Jedná se o řetězec nukleotidů obsahující pětiuhlíkatý cukr ribózu, fosfát a dusíkatou bázi – adenin, guanin, cytosin a uracil. Fosfát je vázán na 5C ribózy a dusíkatá báze na 1C ribózy. RNA se snadněji rozkládá než DNA a většina molekul RNA netvoří stabilní sekundární struktury [65].

Teoreticky by RNA mohla být více náchylná k oxidačnímu poškození než DNA z různých důvodů. Například obsah RNA je 4,4× vyšší než DNA v savčích buňkách. RNA je méně spojena s bílkovinami a zároveň její báze nejsou chráněny vodíkovou vazbou a jsou tak snadněji přístupné ROS. Navíc RNA má rozsáhlou cytoplazmatickou distribuci v těsné blízkosti mitochondrií, kde vzniká většina ROS [66].

Poškození RNA může být způsobeno  $\text{OH}^\bullet$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Prozatím jedinou charakterizovanou oxidovanou bázi v RNA je 8-hydroxyguanosin, který vzniká reakcí guaninu s  $\text{OH}^\bullet$  a následnou oxidací nebo reakcí guaninu se singletovým kyslíkem a následnou redukcí. Zároveň 8-hydroxyguanosin může potenciálně měnit genetickou informaci nesprávným párováním s adeninem, s podobnou nebo vyšší účinností než s cytosinem, a vytvářet tak mutace na úrovni transkripce [66].

Úroveň oxidačního poškození RNA se u různých forem RNA liší, přičemž výraznější oxidační poškození RNA je spojeno s menším počtem proteinů vázajících RNA. Oxidace mediátorové RNA (mRNA) snižuje její translační kompetenci a nepravidelnou produkci proteinů, čímž se narušuje funkce ribozomů. U transferové RNA (tRNA) oxidační stres vyvolává hromadění jejich rozštěpených polovin, avšak není jasné, zda toto štěpení má vliv na funkci buňky, jelikož nedochází ke snížení počtu celkového tRNA. Celkově lze říct, že poškození mRNA by mohlo způsobit abnormální translaci proteinů a souběžné poškození tRNA a mRNA by mohlo způsobit dysfunkci syntézy proteinů [66, 67].

8-Hydroxyguanosin je indikátorem endogenního oxidačního poškození RNA a může být užitečný pro včasnou detekci onemocnění. Jeho zvýšený obsah byl nalezen v moči u pacientů s kolorektálním karcinomem [68].

### 3.1.3 Poškození proteinů

Proteiny jsou složeny ze stovek až tisíců malých podjednotek známých jako aminokyseliny. Celkem rozlišujeme 20 druhů aminokyselin, které jsou spojeny peptidovou vazbou a tvoří tak molekulu bílkoviny. Pořadí aminokyselin určuje strukturu proteinů a jejich funkci, jako je katalytická funkce při biochemických procesech, imunitní ochrana, pohyb, přenos nervových impulsů, kontrola růstu a diferenciací [69].

ROS způsobují oxidaci aminokyselin, změnu elektrického náboje proteinů, rozpad peptidového řetězce, zesíťování proteinů a zvyšují náchylnost k proteolýze. Aminokyseliny obsahující síru nebo thiolovou skupinu jsou více náchylné k poškození vlivem ROS, především cysteinové a methioninové zbytky jsou náchylnější k oxidaci. Oxidace methioninových zbytků nebo sulfhydrylových skupin vede ke konformačním změnám, rozkládání a degradaci proteinů. ROS vytvářejí disulfidové vazby mezi aminokyselinami obsahujícími síru a narušují funkci a strukturu proteinů. RNS způsobují nitraci proteinů vedoucí ke vzniku 3-nitrotyrosinu, což je marker zánětu. Vlivem  $\text{OH}^\bullet$  dochází k odtržení atomu vodíku z polypeptidového řetězce a vzniká tak radikál s uhlíkovým jádrem [42, 70, 71].

Karboxylové proteiny jsou definovány jako oxidačně poškozené proteiny obsahující karboxylovou skupinu v postranním řetězci aminokyselin. Vznikají při přímém oxidačním poškození aminokyselinových zbytků prolinu a argininu, které poskytují glutamátový semialdehyd, lysin poskytuje aminoadipový semialdehyd, z threoninu vzniká kyselina 2-amino-3-ketomáselná. Přímá oxidace jiných aminokyselinových zbytků může vést ke vzniku karboxylů vázaných na proteiny. Oxidace tryptofanu může vést ke vzniku až 7 oxidovaných produktů, mezi něž patří kynurenin a N-formylkynurenin a jejich hydroxylové analogy, které se vyznačují aldehydovými nebo keto skupinami vzniklými oxidačním štěpením indolového kruhu. Kromě toho vznikají dva laktamy oxindolylalanin a dioxindolylalanin [71, 72].

Oxidační poškození proteinů je nevratné a neopravitelné. Poškozené proteiny ale mají schopnost aktivovat proteozomy, které slouží k jejich degradaci. Nedojde-li k jejich odstranění, shromažďují se a mění funkci buňky [70, 71].

Poškození proteinů ROS může inhibovat aktivitu enzymů podílejících se na opravě DNA. Zvláště DNA polymerázy jsou velice citlivé na ROS, které mohou způsobit jejich modifikaci, což následně zvyšuje počet neopravených DNA a mutací. Stále více studií ukazuje, že onkoproteiny a tumor-supresorové proteiny v souvislosti s oxidačním stresem hrají velkou roli v karcinogenezi [42, 71].

#### **a) P53**

Protein p53 označovaný jako strážce genomu hraje důležitou roli při udržování genomové stability a prevenci nádorů. Somatické mutace p53 se vyskytují téměř u všech lidských nádorů a u více než 50 % všech nádorů [73].

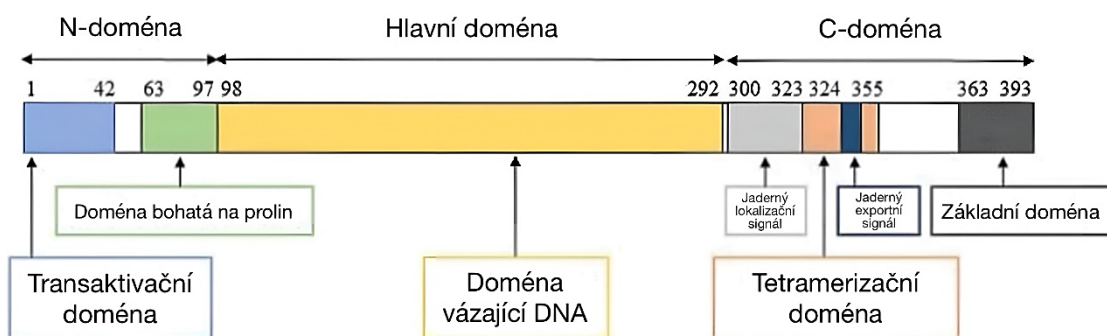
Protein p53 je kódován genem TP53, který se nachází na krátkém raménku chromozomu 17. Studie ukazují, že 8 mutací genu TP53 se nachází v kodonech a tvoří 28 % všech mutací

p53. Mutace v alelách, nazývaných hotspots, se objevují v mnoha lidských nádorech a tkáních a vyskytují se z těchto důvodů [74, 75]:

- i. enviromentální mutagenní vlivy způsobují alelické změny v genu TP53,
- ii. genové mutace jsou způsobeny specifickými sekvencemi DNA,
- iii. ztráta výkonnosti a změny ve zmutovaných proteinech p53, které mohou mít alelickou funkci [75].

Zárodečné změny genu TP53 jsou základem vzácného genetického onemocnění zvaného Li-Fraumeniho syndrom. Jedinci s tímto syndromem mají predispozice k časnému vzniku nádorů, k vyšší pravděpodobnosti, že se u nich během života objeví minimálně jedno nádorové onemocnění a přibližně 40% pravděpodobnost, že u nich bude diagnostikováno nádorové onemocnění po druhé bez ohledu na věk, kdy bylo diagnostikováno onemocnění první. Nádorová onemocnění spojená se somatickou nebo zárodečnou mutací genu TP53, jsou považována za agresivní a se špatnými výsledky [76].

Samotný protein p53 se skládá z 393 aminokyselin a obsahuje 4 domény: transaktivační doménu, doménu bohatou na prolin související s apoptózou, doménu vázající DNA a tetramerizační doménu. V rámci C-konce se navíc nachází oblast jaderného lokalizačního signálu a jaderného exportního signálu, které se podílejí na příslušné subcelulární lokalizaci (viz obr. 7) [74].



**Obrázek 7** Doménová struktura p53; upraveno a převzato z [74]

Za normálních okolností je p53 v buňce udržovaný v nízkých hladinách pomocí ubiquitin E3 ligázy MDM2, která jej inaktivuje a degraduje. Když dojde k poškození DNA, protein p53 se aktivuje, způsobí zastavení buněčného cyklu, a tím dá buňce čas na opravu. Pokud je poškození DNA závažné, dochází u buněk k apoptóze [75].

U p53 je většina mutací způsobena substituční bodovou mutací, která vede k produkci mutantního proteinu p53. Bylo zdokumentováno, že některé nádorově asociované mutantní p53 ztrácí tumor-supresorové funkce a zároveň získávají nové onkogenní funkce, efekt známý jako

*gain-of-function*, mezi něž patří podpora buněčné proliferace, angiogeneze, migrace, invaze, tvorba metastáz a chemorezistence [77].

Divoký typ p53 a jeho mutantní protějšek regulují oxidační stres opačným způsobem. Divoký typ p53 zabraňuje produkci ROS aktivací antioxidantních enzymů. Naopak mutantní p53 udržuje zvýšení intracelulárních ROS změnou několika molekulárních drah ve prospěch progresu nádorového onemocnění. Co se týče metabolických změn, mutantní p53 stimuluje aerobní glykolýzu, produkci laktátu, autofagii, expresi hypoxií indukovaného faktoru (HIF), potlačuje opravu DNA a inhibuje apoptózu [78].

ROS mohou také ovlivnit stabilitu a aktivitu p53 prostřednictvím posttranslačních modifikací, a to fosforylací p38 zprostředkovanou mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) a kinázou regulovanou extracelulárním signálem (ERK). Zároveň protein p53 je redoxně citlivý, takže funguje jako buněčný redoxní senzor díky přítomnosti cysteinových zbytků obsahujících redoxně citlivé thiolové skupiny. Oxidace cysteinu snižuje vazbu p53 na gen asociovaný s opravou DNA GADD45, což ovlivňuje odpověď na poškození DNA [79].

Mutantní p53 je schopen potlačit transkripci sestrinů SESN1 a SESN2, a tím i množství komplexu SESN a adenosin 5' monofosfát aktivované proteinkinázy, který je regulován oxidačním stresem a slouží jako antioxidantní adaptivní odpověď. Prostřednictvím dysregulace zmíněného komplexu mutantní p53 podporuje poškození autofagie v nádorových buňkách, což může vést k nahromadění abnormálních mitochondrií a následně k produkci ROS, genomové nestabilitě, iniciaci a progresi rakoviny. Dále mutantní p53 může stimulovat signalizaci savčího cíle rapamycinu (mTOR), tím měnit redoxní rovnováhu a udržovat oxidační prostředí vhodné pro množení a růst nádorových buněk. Do udržování tumorigeneze vlivem mutovaného p53 se zapojuje i aktivace řady receptorů, včetně receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR), které se podílejí na aktivaci signalizace fosfatidylinositol-3-kinázy/Akt [79].

Mutovaný p53 má nejsilnější vliv na metabolismus glukózy tím, že stimuluje glykolýzu. Především reguluje glukózové transportéry 1 a 4, čímž podporuje vstup glukózy do nádorových buněk, dále stimuluje geny zapojené do aktivace glykolýzy a pentózofosfátovou dráhu působící na glukózo-6-fosfátdehydrogenázu. Konečným výsledkem je zásoba glukózy, kterou buňky využívají k energii i za aerobních podmínek, označováno jako Warburgův efekt [80].

### **3.1.4 Poškození lipidů**

Lipidy jsou hydrofobní molekuly, rozpustné v lipofilní rozpouštědlech, jako je hexan. V živých organismech jsou součástí biologických membrán, slouží jako signální molekuly, zásobárna energie a představují důležitou živinu. Lipidy se mohou klasifikovat do 7 skupin:

triacylglyceroly, mastné kyseliny, vosky, fosfolipidy, sfingolipidy, glykolipidy a izoprenoidy. Triacylglyceroly jsou nejdůležitější zásobou energie, chemicky se jedná o trojici esterů a glycerolu. Fosfolipidy, sfingolipidy a glykolipidy patří mezi lipidy, které jsou součástí buněčných membrán a obsahují jak hydrofilní, tak hydrofobní části [81].

Vzhledem k vysokým hladinám PUFA, jsou buněčné membrány obzvláště náchylné k poškození ROS, označované jako peroxidace lipidů. Při peroxidaci lipidů dochází k reakci ROS s dvojnými vazbami mezi uhlíky. Proces peroxidace zahrnuje 3 kroky: iniciace, propagace a terminace. V první fázi dochází pod vlivem  $\text{OH}^\bullet$  k odstranění vodíkového atomu z lipidů za vzniku volného lipidového radikálu. Během propagace volné lipidové radikály reagují s kyslíkem za vzniku peroxyradikálu, které spouští řetězovou reakci za vzniku dalších volných lipidových radikálů a lipidového peroxidu, tím že odebírají vodík z dalších lipidových molekul. Lipidové hydroperoxy jsou hlavním konečným produktem peroxidace lipidů. Jako vedlejší produkty jsou produkovány různé aldehydy, včetně malondialdehydu, propionaldehydu, hexanalů a 4-hydroxynonenalů [82].

#### ***a) 4-Hydroxynonenal***

4-Hydroxynonenal (HNE) je jedním z nejvíce studovaných produktů peroxidace lipidů, který vzniká oxidací PUFA, především kyseliny arachidonové a linolové. HNE je považován za vysoce elektrofilní molekulu, která může snadno reagovat s proteiny, DNA a fosfolipidy [83].

Cílem HNE jsou všechny 4 báze DNA s různým stupněm reaktivity  $\text{dG} > \text{dC} > \text{dA} \approx \text{dT}$ . HNE je také schopen tvořit meziřetězcové křížové vazby, které by mohly interferovat s replikací a transkripcí DNA. Na kodonu 249 genu p53 je schopen vyvolat transverzi G na T a vznik adičních produktů HNE-deoxyguanosin, které byly považovány za mutační hotspot u lidského hepatocelulárního karcinomu a u karcinomu plic souvisejícího s cigaretovým kouřem [84].

HNE působí také na proteiny a vytváří adiční produkty se 3 různými postranními řetězci v proteinech, konkrétně s cysteinem, histidinem a lysinem. Proteiny modifikované HNE jsou náchylnější k degradaci proteozomální cestou. Cysteinové zbytky jsou nejcitlivější vůči napadání HNE. Rychlá konjugace s glutathionem výrazně vyčerpává tento antioxidant v různých typech buněk [85].

Nedávné imunohistochemické studie naznačily, že HNE může sloužit jako prognostický faktor. To může souviset s cytotoxickými a růstovými účinky HNE v závislosti na koncentraci a také s jeho účastí při zánětlivém procesu v nádoru a v okolní nenádorové tkáni. Jeho výskyt

byl dobře popsán zejména u gliových nádorů, kdy imunohistochemická pozitivita byla prokázána u astrocytárních, oligodendroglálních a ependymálních nádorů, přičemž míra exprese se postupně zvyšovala se stupněm nádoru. Zároveň bylo zjištěno, že exprese HNE je výrazná u invazivních karcinomů prsu, zatímco exprese 8-oxo-dG se snížila [86].

### ***b) Malondialdehyd***

Malondialdehyd (MDA) je produktem lipidové peroxidace a biosyntézy prostaglandinů. Je považován za nejvíce mutagenní produkt peroxidace lipidů, jelikož je biologicky velmi aktivní a spolu s ROS se podílí na poškození DNA, kdy může vytvářet různé endogenní exocyklické adiční produkty DNA, včetně malondialdehyd-2'-deoxyguanosinu. MDA má také význam v karcinogenním procesu, kde je schopen způsobit mutace páru bází, inserce, delece, a substituce, zejména u párů bází GC, posun rámce v opakovaných sekvencích a nestabilitu mikrosatelitových sekvencí v genech zapojených do karcinogeneze [87].

MDA působí cytotoxicky a vykazuje inhibiční účinky na antioxidační enzymy. Zároveň hladina MDA v séru odráží poškození buněk volnými radikály. Vyšší hladina MDA v moči u pacientů odpovídala vyššímu stupni onemocnění. Zvýšené hladiny MDA byly zaznamenány u různých malignit, jako jsou rakovina plic, dutiny ústní, orofaryngu, ovarií, děložního čípku, ledvin a prostaty. U rakoviny ledvin a prostaty byly hladiny MDA významně vyšší u obou typů rakovin, což odráží nárůst oxidačního poškození a lipidové peroxidace, ale bez korelace se stupněm onemocnění [88].

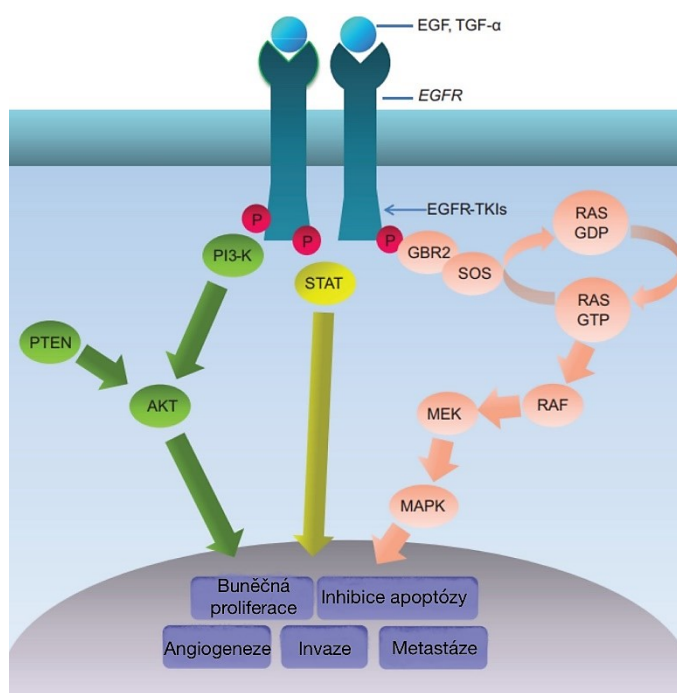
## **3.2 Signální dráhy a klíčové proteiny zapojené do procesu proliferace**

Mezi signální dráhy, které souvisí s buněčnou proliferací a jsou ovlivňovány ROS, lze zařadit signální dráhu EGFR a klíčových signálních proteinů, jako jsou nukleární transkripční faktor (NRF2), rat sarcoma (RAS), rapidly accelerated fibrosarcoma (RAF), mitogenem aktivované proteinové kinázy ERK1/2 a mitogenem aktivovaná, extracelulárním signálem regulovaná kináza (MEK), fosfatidylinositol-3-kináza (PI3K), fosfolipáza C (PLC) a proteinkináza C (PKC) [43].

### **3.2.1 Signální dráha receptoru epidermálního růstového faktoru**

EGFR patří do skupiny ErbB tyrosinkináz. Hraje roli v podpoře buněčné proliferace a potlačení apoptózy, a proto je označován jako protoonkogen. Často mutuje anebo je nadměrně exprimován u různých typů nádorového onemocnění. EGFR se nachází na plazmatické membráně a po vazbě ligandu dochází k alosterické aktivaci EGFR kinázy a k trans-

autofosforylaci tyrosinových zbytků na konci cytoplazmatického receptoru, čímž se spouští signální kaskáda regulující buněčnou proliferaci a angiogenezi (viz obr. 8) [89-91].



**Obrázek 8** Signální dráha EGFR; upraveno a převzato z [91]

EGFR také reaguje na hypoxii, která jednak zvyšuje transkripční aktivitu genu EGFR, a tím nadměrnou expresi EGFR, pokud nedošlo ke genetickým změnám, jednak spouští endocytózu EGFR závislou na buněčné kináze Src a kalveolách. V endozomech se EGFR váže a fosforyluje endozomální protein podílející se na maturaci microRNA, argonaut 2, což způsobuje inhibici maturace tumor-supresorových microRNA, a tím podporuje přežití nádorových buněk. Podobný mechanismus internalizace a akumulace v endozomech vyvolává i oxidační stres vlivem  $H_2O_2$ . Vznik ROS inaktivuje redoxně citlivé, na cysteinu závislé tyrosinfosfatázy, což vede k aktivaci buněčné kinázy Src [90].

### 3.2.2 Nukleární transkripční faktor

NRF2 je transkripční faktor patřící do skupiny cap'n'collar proteinů. NRF2 má 7 funkčních domén, které heterodimerizují s DNA a dalšími transkripčními a signálními faktory. Různé domény obsahují N-terminální hydrofobní doménu následovanou doménou vázající se na inhibitor NRF2. Inhibitor NRF2, též označovaný jako kelch-like-ECH asociovaný protein (KEAP1), je homodimerický protein, který udržuje NRF2 v cytoplasmě a umožňuje jeho proteozomální degradaci [92].

NRF2-KEAP1 slouží jako senzor oxidačního stresu vyvolaného chemickými látkami a zářením v buňkách. K degradaci NRF2 dochází jak v cytoplasmě, tak v jádře. V cytoplasmě

je ubikvitace způsobena KEAP1, v jádře je degradace způsobena KEAP1/Cul3/Rbx. Tyto dráhy regulují narušení NRF2 [92].

Předpokládá se, že dočasně aktivovaný NRF2 chrání buňky před škodlivými účinky oxidačního stresu, zatímco trvale aktivovaný NRF2 je spojen s podporou rozvoje rakoviny a zvyšováním chemorezistence. V nádorových buňkách dochází k mutaci ve vazebné doméně KEAP1 anebo NRF2, která narušuje interakci NRF2 s KEAP1, k aktivaci NRF2 onkogenními faktory a ke zvýšené expresi faktorů, které narušují interakci KEAP1-NRF2. Zvýšená transkripční aktivita NRF2, spojená s nadměrnou expresí některých enzymů glykolýzy, antiapoptických genů a onkogenů podpořila klíčovou roli NRF2 v onkogenezi. Mutace, způsobující ztrátu inhibitoru NRF2, vedou ke stabilizaci a zvýšené expresi NRF2 u několika typů rakovin, konkrétně prsu, prostaty a plic [92].

NRF2 se podílí na regulaci buněčné odpovědi na poškození DNA tím, že reguluje expresi oxoguaninové glykosylázy, která se podílí na opravě báze 8-oxo-dG. Zároveň NRF2 moduluje expresi enzymů zapojených do syntézy NADPH, který má význam pro syntézu biomolekul, včetně lipidů a nukleotidů. Zvýšená exprese NRF2 v nádorových buňkách by tak mohla být spjata s vysokou potřebou biomolekul pro podporu proliferace [92].

### **3.2.3 RAS-MAPK**

Dráhy MAPK tvoří velkou konstituční síť, která reguluje mnoho fyziologických procesů, jako je buněčný růst, diferenciaci a apoptózu. Rodina MAPK zahrnuje ERK, p38 a c-jun NH<sub>2</sub>-terminální kinázu. Kaskáda RAF-MEK-ERK reguluje důležité fyziologické funkce prostřednictvím aktivity ERK, která fosforyluje velké množství substrátů vykonávající různé molekulární funkce. Před aktivací ERK se aktivují kinázy RAF a MEK. Dysregulace RAS-RAF-MAPK-ERK a ERK1/2 je jednou z hlavních poruch, prostřednictvím různých signálních kaskád MAPK, u lidských nádorových onemocnění [93, 94].

Tvorba ROS v transformovaných buněčných liniích prostřednictvím nadměrné exprese onkogenního RAS je zásadní. Produkce ROS prostřednictvím onkogenního RAS-indukované NADPH oxidázy 1 je nezbytná pro transformační fenotypy RAS zahrnující nezávislý růst, morfologickou transformaci a nádorovou aktivitu. Bylo prokázáno, že generace ROS indukované NADPH oxidázou 1 je klíčovým krokem pro signální kaskádu, která upravuje modifikaci stresových vláken a fokální adhezi související s transformací RAS. Dochází ke snížení regulace Rho, což vede k dysregulaci stresových vláken a centrální adheze. Tato redoxní signalizace je vyvolána onkogenem RAS-indukovaného NADPH oxidázou 1 prostřednictvím dráhy MEK-MAPK, což potvrzuje i pravdivost, že inhibice MAPK vede

k obnovení Rho v buňkách. ROS se spojují s reorganizací aktivovaného cytoskeletu a jsou nezbytné pro buněčnou migraci a adhezi endoteliálních buněk [93].

Kaskáda RAF-MAK-ERK iniciuje prostřednictvím ERK transkripční program, který řídí buněčnou proliferaci. Signalizace ERK primárně ovládá přechod buňky z G1 fáze do S fáze, což je kritický kontrolní bod pro zabránění buňce v abnormální replikaci. Ztráta genů RAS nebo ERK1 a ERK2 způsobuje zadržení v G1 fázi buněčného cyklu. ERK fosforyluje ternární komplexní faktory, které indukují transkripci okamžitě raných genů, jejichž akumulace indukuje transkripci sekundárních odpovědných genů, což vede ke vstupu do S fáze buněčného cyklu. Navíc ERK podporuje buněčnou proliferaci fosforylací a inhibicí proteinů, které negativně regulují buněčnou proliferaci [94].

### **3.2.4 Fosfatidylinositol-3-kináza**

Fosfatidylinositol-3-kináza vytváří signální dráhu PI3K/Akt, která fosforyluje skupinu inositolového kruhu v inositolfosfolipidu. Třída 1A PI3K má strukturu heterodimerů, které se skládají z katalytické a regulační části. Substrátem pro tuto třídu je fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát, který se přeměňuje na druhý posel fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát, který podporuje aktivaci Akt, čímž se aktivují další faktory [95].

Serin/threoninová kináza Akt, též proteinkináza B hraje důležitou roli v signální dráze, která kontroluje mnoho buněčných procesů, jako je proliferace, translace, růst buněk, velikost buněk, buněčná smrt, invaze a angiogeneze prostřednictvím procesu fosforylace. V cytoplazmě se nachází v neaktivní formě a během aktivace dochází k jejímu přemístění na buněčnou membránu. Navázáním cytokinů, růstových faktorů a hormonů na receptory dochází k fosforylaci Akt na dvou regulačních reziduích prostřednictvím aktivace PI3K [95].

Skupina transkripčních faktorů Forkhead box O (FoxO) reguluje přežití buňky tím, že zastaví buněčný cyklus jako odpověď na buněčný stres způsobený oxidačním stresem. Dochází k produkci ROS, což aktivuje expresi FoxO v postižených buňkách. Aktivita signální dráhy PI3K/Akt způsobuje nadměrnou fosforylaci transkripčních faktorů rodiny FoxO a brání jejich vstupu do buněčného jádra. Současně aktivita PI3K/Akt zvyšuje hladinu ROS tím, že zvyšuje spotřebu kyslíku a oxidační metabolismus v mitochondriích. Pro regulaci oxidačního stresu je důležitá tumor-supresorová fosfatáza a homolog tenzinu (PTEN), jenž negativně moduluje aktivitu signální dráhy PI3K/Akt přeměnou fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát na fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát. Produkce ROS endogenně potlačuje PTEN během oxidačního stresu a jako výsledek aktivuje signální dráhu Akt a produkci dalších ROS [95].

Signální dráha PI3K/Akt zvyšuje NRF2, který je důležitý pro eliminaci ROS. NRF2 zvyšuje skupinu antioxidantních enzymů fáze II, glutathionperoxidázy, glutathion-S-transferázy a glutamát-cystein ligázy. Z tohoto pohledu působí signální dráha dvojnásobně, na jednu stranu zvyšuje množství antioxidantních enzymů fáze II aktivací NRF2, a tím potlačuje produkci ROS, na druhou stranu snižuje antioxidantní enzymy fáze I, což podporuje produkci ROS fosforylací a inhibicí FoxO. FoxO je schopen eliminovat ROS, ale je inhibován Akt, který zvyšuje buněčný metabolismus a proliferaci, čímž zvyšuje produkci ROS. Ke snížení ROS dochází aktivací NRF2 pomocí Akt [95].

### 3.2.5 Fosfolipáza C

Fosfolipázy jsou rodina enzymů metabolizujících fosfolipidy, které katalyzují rozklad fosfolipidů na biologicky aktivní lipidové mediátory, jež ovlivňují několik fyziologických funkcí v buňce. V současnosti byly identifikovány 4 rodiny fosfolipáz, fosfolipázy A, B, C, D, jejichž rozdělení je podle typu reakce, které katalyzují [96].

Celkem existuje šest členů rodiny PLC ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  a  $\zeta$ ) skládajících se ze 13 různých PLC identifikovaných na základě struktury. PLC je cytoplazmatický protein, který se přesouvá do cytoplazmatické membrány, kde se hromadí v lipidových raftech, které se skládají z cholesterolu, ceramidu a sfingomyelinu. PLC jsou studovány u různých typů nádorových onemocnění [96, 97].

Vzhledem k zapojení PLC do několika buněčných signálních drah byly u různých typů nádorů zjištěny změny v aktivitě a expresi různých izoform PLC. Aktivované izoenzymy PLC jsou propojeny s několika cestami jako je dráha PI3K-Akt-mTOR, RAS-RAF-MAPK-ERK, Janus kináza (JAK)-přenašeč signálu a aktivátor transkripce (STAT) [96].

Rakovinné buňky využívají dráhu PI3K-Akt-mTOR k podpoře signálů přežití, k inhibici signálů apoptózy a k získání chemorezistentních fenotypů. Změny v drahách PLC $\beta$ 1 a PI3K-Akt-mTOR jsou spojovány s rozvojem myelodysplastického syndromu, který se ve 30 % případů zvrhává do akutní myeloidní leukémie. Expresce PLC $\beta$ 1 negativně koreluje s fosforylací Akt, což může naznačovat, že změny v expresi PLC $\beta$ 1 a aktivace Akt u myelodysplastického syndromu může deregulovat buněčný cyklus a vést tak k inhibici apoptózy a přežití buněk myelodysplastického syndromu [96].

PLC $\gamma$ 1 podporuje tumorigenezi pozitivní regulací mnoha buněčných a fyziologických funkcí. Vzájemné funkční působení mezi PLC $\gamma$ 1 a signálními drahami růstových faktorů, včetně EGFR a receptoru pro růstový faktor odvozeného z trombocytů PDGFR, jsou známy přispěním k buněčné proliferaci. Dále bylo zjištěno, že PLC $\gamma$ 1 je substrátem několika dalších

růstových faktorů, jako jsou vaskulární endotelový růstový faktor, nervový růstový faktor a fibroblastový růstový faktor. Mechanicky tyto faktory fosforylují PLC $\gamma$ 1 na specifických tyrosinových reziduích, což způsobí konformační změnu v SH2 doméně, což vede k aktivaci PLC $\gamma$ 1. Nadměrná exprese růstových faktorů v několika typech nádorů způsobí hyperaktivaci PLC $\gamma$ 1 a pozitivně tak podpoří buněčnou proliferaci. Navíc aktivní PLC $\gamma$ 1 dále aktivuje PKC, které komunikují s řadou buněčných obvodů, včetně Akt a signální kaskády RAS-RAF-ERK a podporují metastázy [98].

Prostřednictvím dráhy JAK/STAT mohou PLC regulovat přežití a proliferaci nádorových buněk, konkrétně SH2 doména PLC $\gamma$ 1 může interagovat se zbytkem tyrosinu STAT3, což následně vede k její aktivaci. Pokud jde o ostatní PLC, prokázalo se, že ztráta PLC $\beta$ 3 může podpořit vývoj a růst nádoru, kdy ztráta PLC $\beta$ 3 vede ke zvýšení krvetvorných kmenových buněk a snížení STAT5, což vyvolá zvýšenou buněčnou proliferaci, přežití a myeloidní diferenciaci [96].

### 3.2.6 JAK-STAT

Signální dráha JAK-STAT se skládá z komplexů ligand-receptor. Rodina JAK je tvořena 4 členy: JAK1, JAK2, JAK3 a TYK2. Rodina STAT se skládá ze 7 členů: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b a STAT6 [99].

Ligandy, zejména cytokiny a růstové faktory, poskytují počáteční stimul pro aktivaci dráhy. Cytokiny se vážou na odpovídající podjednotky transmembránových receptorů, což vede k multimerizaci s jinými podjednotkami a k interakcím JAK asociovaných s receptorem, které se aktivují transfosforylací, jakmile jsou umístěny v těsné blízkosti. Aktivované JAK fosforylují tyrosinové zbytky v cytoplazmatické oblasti cytokinového receptoru, čímž poskytnou dokovací místa pro SH2 doménu proteinů STAT. Vazba STAT na intracelulární doménu fosforylovaného receptoru vede k fosforylaci tyrosinu zprostředkované JAK a aktivaci STAT. Aktivovaný STAT dimerizuje a translokuje do jádra, kde slouží jako transkripční faktor indukující expresi genů, které regulují buněčnou proliferaci, přežití a invazi. STAT, kromě STAT4, mohou vstoupit do mitochondrií a podporovat oxidativní fosforylaci a permeabilitu membrány, STAT3 může vstoupit do endoplazmatického retikula a pomáhat odolávat apoptóze vyvolané oxidačním stresem [99, 100].

Na rozvoji nádorových onemocnění se podílí hyperaktivace STAT, zejména STAT3. Mutace JAK2<sup>V617F</sup> se často vyskytuje u myeloproliferativních novotvarů. Častěji dráha JAK-STAT slouží jako mediátor zvýšeného množství cytokinů, které indukují transkripci genů [99, 100].

### 3.2.7 Proteinkináza C

Proteinkináza C je skupina vápník-fosfolipidově dependentních serin/threonin kináz. Rodina PKC se skládá z 11 izoenzymů, které se rozdělují na základě strukturních charakteristik a způsobu aktivace do 3 podčeledí: konvenční, nové a atypické PKC. Všechny PKC se skládají z regulační, jež je rozdělena na autoinhibiční doménu a dvě membránové cílové domény (C1 a C2), a z katalytické domény. C1 a C2 domény se vážou na diacylglycerol a  $\text{Ca}^{2+}$ . C3 a C4 v katalytické doméně se vážou na ATP a jeho cílový substrát. PKC izoenzymy hrají klíčovou roli v proliferaci, diferenciaci, přežití, migraci, invazi, apoptóze a rezistenci nádorových buněk na protinádorové léky [101].

Abnormální exprese PKC je charakteristická pro neoplazii, příčinné vztahy mezi změnou v expresi PKC a procesem transformace nebo progresí nemoci nejsou zcela jasné. Geny pro PKC se zdají být odlišné od klasických protoonkogenů, jelikož mutace v genech PKC nevede k jejich aktivaci anebo k indukci buněčné transformace. Avšak kvůli roli, kterou PKC hraje při udržování buněčných homeostatických mechanismů, je možné, že změněná regulace PKC přispívá k rozvoji nádorového onemocnění tím, že indukuje chybné vyjadřování protoonkogenů nebo synergizuje s onkogeny a mění signální dráhy, které řídí chování buněk. Regulace mediována c-Raf, může přispět k transformaci buněk, jelikož c-Raf serin/threoninová kináza je hlídačem signální dráhy MAPK, která reguluje expresi genů řídící buněčný cyklus [102].

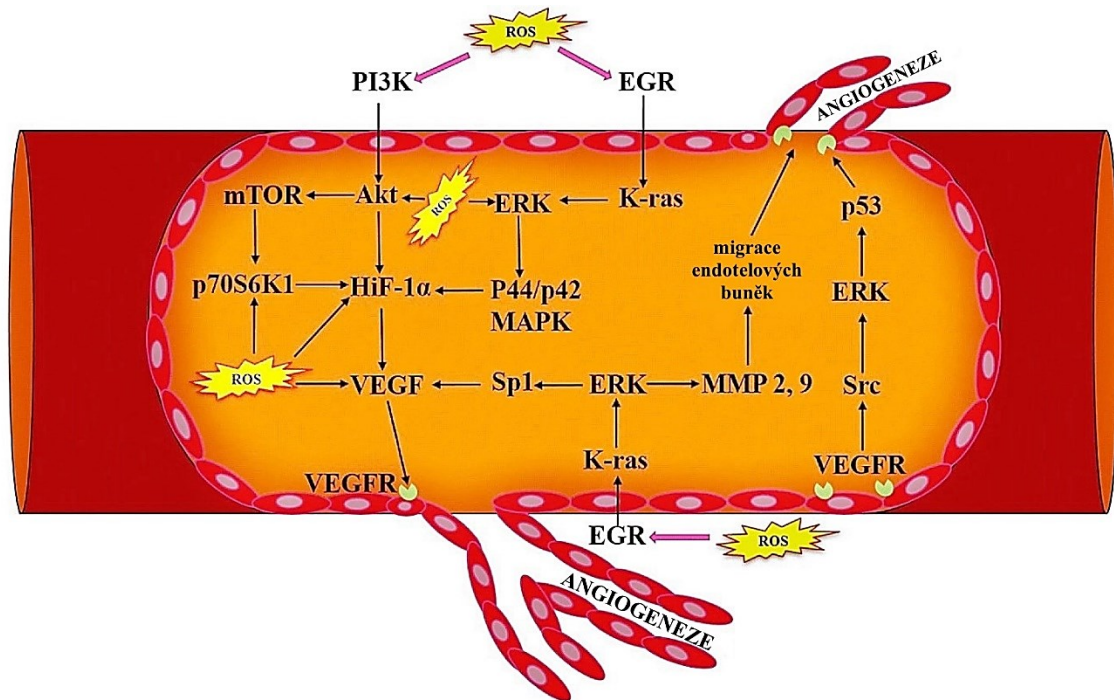
## 3.3 Progrese nádorového onemocnění

Zvýšené hladiny ROS podporují jak proliferaci nádorů, tak progresi nádorů. Angiogeneze, invaze a metastázy jsou charakteristickými znaky a patří mezi hlavní příčiny úmrtí na nádorové onemocnění [103].

### 3.3.1 ROS a angiogeneze

Angiogeneze označuje proces, při kterém dochází k růstu nových kapilár ze stávajících. Zahrnuje vícestupňový proces, který lze jednoduše popsat několika kroky. Nejprve angiogenní podněty způsobí zvýšenou propustnost endotelových buněk a buněčnou proliferaci, následně dochází k proteolýze složek bazální membrány, čímž se podpoří invaze endoteliálních buněk do stromatu sousední tkáně, kde migrované endoteliální buňky spouští tvorbu lumen. Nakonec se vytvoří nový kapilární kanál, který je stabilizován díky výstavbě bazální membrány a adherentními spoji. Angiogeneze je charakteristická pro hojení ran a fungování menstruačního cyklu, zároveň i růst nádoru je spojen s novými krevními cévami [104].

Nádor větší než 2 mm potřebuje výživu, vyměňovat plyny a odvádět odpadní látky, tudíž nemůže přežít bez krevního zásobení. Během oxidačního stresu nádorové buňky využívají několik modulátorů, které iniciují angiogenezi pro přežití a udržení nádoru. Aktivačními dráhami angiogeneze vyvolané ROS (viz obr. 9) se zabývá mnoho studií. ROS aktivuje zvýšenou signalizaci ERK-Akt, která se podílí na aktivaci angiogenních molekul HIF-1 $\alpha$  a vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF), což bylo zaznamenáno v buněčných liniích rakoviny prsu a vaječníků. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by mohl podporovat angiogenezi modulací aktivity p44/42 MAPK. Zároveň zvýšená hladina EGF vyvolává tvorbu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, který následně stimuluje P70S6 kinázu 1 prostřednictvím PI3K-Akt a zvyšuje tak expresi HIF-1 $\alpha$  a VEGF. Prostřednictvím dráhy PI3K-Akt je podporována angiogeneze v buněčné linii rakovinné jaterní tkáně HepG2. V poslední době je také mutantní p53 považován za angiogenní podnět a zároveň zvyšuje expresi HIF-1 $\alpha$  v karcinomu tlustého střeva. Dále bylo zjištěno, že NADPH oxidáza zvyšuje VEGF závislé na Ras, což vede k angiogenezi aktivací specifického proteinu 1 prostřednictvím fosforylace závislé na Ras-ERK. ROS také zvyšuje expresi matrixových metaloproteáz 1; 2 a 9 v nádoru prostaty [103].



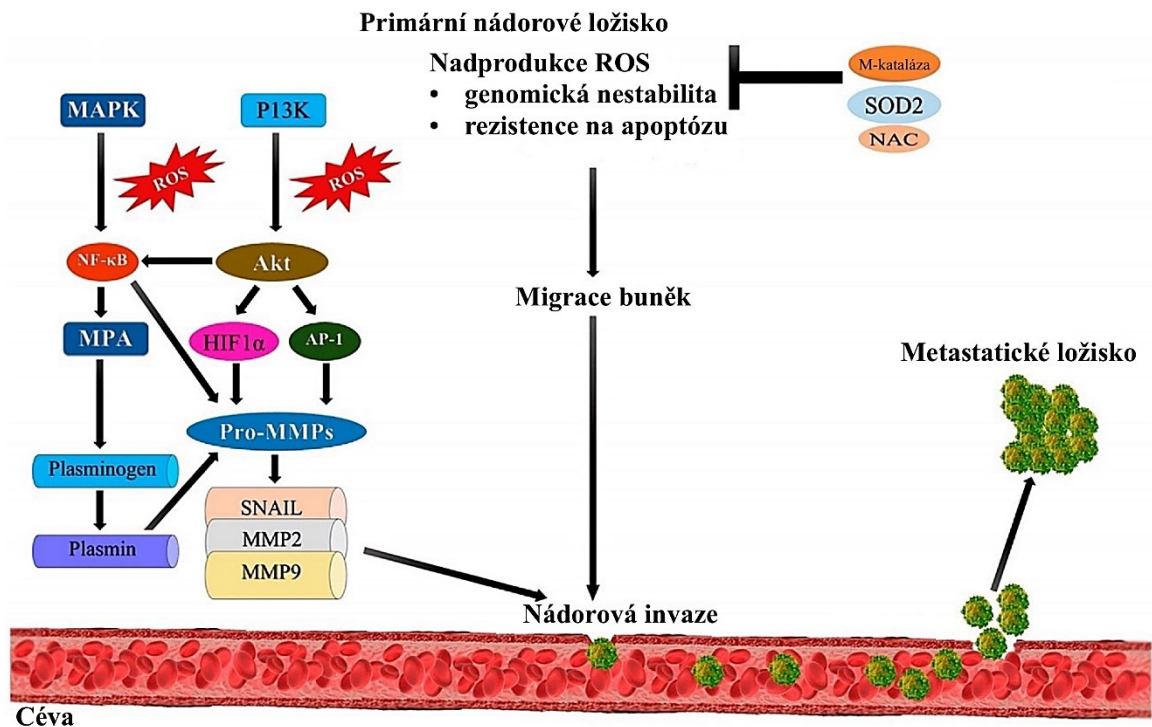
**Obrázek 9** Aktivační dráhy angiogeneze aktivované ROS; upraveno a převzato z [103]

### 3.3.2 ROS a metastáze

Úmrtí na nádorové onemocnění je více spojeno s metastatickým šířením, nikoli lokalizovaným růstem nádoru. Metastázy se podílejí na neurologických komplikacích, respiračním selhání, trombózách a dalších potenciálně smrtelných komplikacích. Při vzniku

metastáz dochází k úniku buněk primárního nádoru, které musí přežít v cirkulaci a usídlit se ve vzdálených orgánech, kde zahájí růst [105].

ROS jsou hlavní příčinou epitelově-mezenchymového přechodu, který se podílí na metastázování nádorů, kdy epitelové buňky ztrácejí polaritu, adhezi mezi buňkami a získávají mobilitu. Metastázování nádorů je podpořeno zvýšením počtu transkripčních faktorů, jako jsou nukleární faktor  $\kappa$ B, Twist, Snail, proteinový aktivátor 1, metaloproteázami, chemokiny a cytokiny (viz obr. 10). Pod vlivem ROS transformující růstový faktor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) reguluje aktivátor plazminogen urokinázy a matrix-metaloproteázu 9, aby usnadnil buněčnou migraci a invazi, zároveň ROS zvyšuje migraci nádoru aktivací matrix-metaloproteáz. Pomocí TGF- $\beta$ 1 se do migrace zapojuje i p53. Mitochondriální dysfunkce reguluje expresi chemokinu CXCL14 prostřednictvím signální dráhy proteinového aktivátoru 1 a zvyšuje mobilitu buněk zvýšením cytosolického  $\text{Ca}^{2+}$  [106].



**Obrázek 10** Vztah mezi ROS a metastázami; upraveno a převzato z [106]

Nadměrná exprese HIF-1 $\alpha$  byla zaznamenána u nádorů se zvýšenými metastázami a mortalitou. K nadměrné expresi HIF dochází vlivem hypoxie, laktátu a genetických změn onkogenů a tumor-supresorových genů. HIF-1 aktivované fibroblasty asociované s nádorem vylučují proteiny remodelace extracelulární matrix, jako jsou kolagenové prolylhydroxylázy a lysylhydroxylázy, které podporují metastázování nádorů [107].

## ZÁVĚR

Reaktivních formy kyslíku a dusíku jsou pro správnou funkci organismu nezbytné. Uplatňují se např. při imunitní odpovědi fagocytů, apoptóze a udržují v normálním stavu sliznice trávicího ústrojí. Jejich zdrojem je mitochondriální dýchací řetězec, NADPH oxidáza a další enzymy a organely. Na jejich vzniku se podílí také exogenní faktory, a to znečištěná voda a ovzduší, UV záření, užívání některých léků, tabákových výrobků a alkoholu.

Pokud množství reaktivních forem kyslíku a dusíku převýší antioxidační ochranu, dochází k rozvoji oxidačního stresu. Antioxidační ochrana je tvořena jak endogenními antioxidanty, především enzymy, tak exogenními antioxidanty, jako jsou vitamíny a minerály. Cílem antioxidantů není eliminovat všechny reaktivní formy kyslíku a dusíku, ale podílet se na regulaci jejich vzniku.

K rozvoji nádorového onemocnění dochází transformací normální buňky do neoplastického stavu procesem karcinogeneze, který zahrnuje 3 fáze: iniciaci, promoci a progresi. Iniciačním krokem je poškození DNA, ke kterému může dojít přímým nebo nepřímým působením reaktivních forem kyslíku a dusíku. Přímé poškození DNA vede k oxidačnímu poškození DNA, při kterém vznikají modifikované báze, z nichž nejreprezentativnější je 8-oxo-2'-deoxyguanosin. Nepřímé poškození DNA zahrnuje oxidační poškození proteinů podílejících se na opravě DNA a oxidační poškození lipidů za vzniku aldehydů reagujících s DNA.

Reaktivní formy kyslíku a dusíku dále ovlivňují buněčné signální dráhy a jejich klíčové proteiny. To následně vede k deregulaci buněčného cyklu, zvýšené proliferaci a k inhibici apoptózy. Přetrvávající zvýšené hladiny reaktivní formy kyslíku a dusíku přispívají k progresi nádorového onemocnění charakterizované angiogenezí a tvorbou metastáz, které jsou hlavní příčinou úmrtí na nádorové onemocnění. Při angiogenezi dochází k ovlivnění buněčné signalizace vedoucí ke zvýšené aktivitě angiogenních molekul, a tak ke vzniku nových krevních cév. Při vzniku metastáz se reaktivní formy kyslíku zapojují do epitelově-mezenchymového přechodu a regulace dalších faktorů podporujících buněčnou migraci a invazi.

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Global cancer burden growing, amidst mounting need for services. *World Health Organization* [online]. 2024, 2024-02-01 [cit. 2024-05-03]. Dostupné z: <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>.
- [2] SIES, Helmut. Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. *Antioxidants* [online]. 2020, **9**(9):852 [cit. 2023-11-18]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: [doi:10.3390/antiox9090852](https://doi.org/10.3390/antiox9090852).
- [3] PISOSCHI, Aurelia Magdalena a Aneta POP. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2015, **97**, 55-74 [cit. 2023-11-18]. ISSN 02235234. Dostupné z: [doi:10.1016/j.ejmech.2015.04.040](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040).
- [4] LEUTI, Alessandro, Mauro MACCARRONE a Valerio CHIURCHIÙ. Proresolving Lipid Mediators: Endogenous Modulators of Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2019, **2019**:8107265 [cit. 2023-11-18]. ISSN 1942-0900. Dostupné z: [doi:10.1155/2019/8107265](https://doi.org/10.1155/2019/8107265).
- [5] LIGUORI, Ilaria, Gennaro RUSSO, Francesco CURCIO, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging* [online]. 2018, **13**, 757-772 [cit. 2023-11-18]. ISSN 1178-1998. Dostupné z: [doi:10.2147/CIA.S158513](https://doi.org/10.2147/CIA.S158513).
- [6] VONA, Rosa, Lucia PALLOTTA, Martina CAPPELLETTI, Carola SEVERI a Paola MATARRESE. The Impact of Oxidative Stress in Human Pathology: Focus on Gastrointestinal Disorders. *Antioxidants* [online]. 2021, **10**(2):201 [cit. 2024-05-04]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: [doi:10.3390/antiox10020201](https://doi.org/10.3390/antiox10020201).
- [7] ARANDA-RIVERA, Ana Karina, Alfredo CRUZ-GREGORIO, Yalith Lyzet ARANCIBIA-HERNÁNDEZ, Estefani Yaquelin HERNÁNDEZ-CRUZ a José PEDRAZA-CHAVERRI. ROS and Oxidative Stress: An Overview of Basic Concepts. *Oxygen* [online]. 2022, **2**(4), 437-478 [cit. 2023-12-02]. ISSN 2673-9801. Dostupné z: [doi:10.3390/oxygen2040030](https://doi.org/10.3390/oxygen2040030).
- [8] FRANSEN, Marc, Celien LISMONT a Paul WALTON. The Peroxisome-Mitochondria Connection: How and Why? *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2017, **18**(6):1126 [cit. 2024-05-04]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: [doi:10.3390/ijms18061126](https://doi.org/10.3390/ijms18061126).

- [9] JOMOVA, Klaudia, Renata RAPTOVA, Suliman Y. ALOMAR, Saleh H. ALWASEL, Eugenie NEPOVIMOVA, Kamil KUCA a Marian VALKO. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Archives of Toxicology* [online]. 2023, **97**(10), 2499-2574 [cit. 2024-05-04]. ISSN 0340-5761. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-023-03562-9.
- [10] DAS, Subir Kumar a Damodaran M. VASUDEVAN. Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sciences* [online]. 2007, **81**(3), 177-187 [cit. 2024-05-04]. ISSN 00243205. Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2007.05.005.
- [11] MOHAMMED, Mustafa Taha, Sura KADHIM, Abdulkadir Mohammed Noori JASSIM a Sarah ISAM. Free radicals and human health. *International Journal of Innovation Sciences and Research*, [online]. 2015, **4**(6), 218-223 [cit. 2024-06-16]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/279535606\\_Free\\_radicals\\_and\\_human\\_health](https://www.researchgate.net/publication/279535606_Free_radicals_and_human_health).
- [12] EL-BAHR, Sabry Mohamed. Biochemistry of Free Radicals and Oxidative Stress. *Science International* [online]. 2013, **1**(5), 111-117 [cit. 2023-12-02]. ISSN 23051884. Dostupné z: doi:10.5567/sciintl.2013.111.117.
- [13] WINTERBOURN, Christine C. Biological chemistry of superoxide radicals. *ChemTexts* [online]. 2020, **6**(1), 7 [cit. 2024-02-01]. ISSN 2199-3793. Dostupné z: doi:10.1007/s40828-019-0101-8.
- [14] HALLIWELL, Barry, Marie Veronique CLEMENT a Lee Hua LONG. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters* [online]. 2000, **486**(1), 10-13 [cit. 2023-12-02]. ISSN 0014-5793. Dostupné z: doi:10.1016/S0014-5793(00)02197-9.
- [15] BAYR, Hülya. Reactive oxygen species. *Critical Care Medicine* [online]. 2005, **33**(12), 498-501 [cit. 2023-12-02]. ISSN 0090-3493. Dostupné z: doi:10.1097/01.CCM.0000186787.64500.12.
- [16] VALKO, Marian, Dieter LEIBFRITZ, Jan MONCOL, Mark T.D. CRONIN, Milan MAZUR a Joshua TELSNER. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [online]. 2007, **39**(1), 44-84 [cit. 2023-12-02]. ISSN 13572725. Dostupné z: doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001.
- [17] TIAN, Fengshou, Yan JIA, Yanan ZHANG, et al. A HClO-specific near-infrared fluorescent probe for determination of Myeloperoxidase activity and imaging

- mitochondrial HClO in living cells. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2016, **86**, 68-74 [cit. 2023-12-02]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2016.06.039.
- [18] WINTERBOURN, Christine C a Anthony J KETTLE. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2000, **29**(5), 403-409 [cit. 2024-02-01]. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/S0891-5849(00)00204-5.
- [19] MARTÍNEZ, M. Carmen a Ramarason ANDRIANTSITOHAINA. Reactive Nitrogen Species: Molecular Mechanisms and Potential Significance in Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling* [online]. 2009, **11**(3), 669-702 [cit. 2023-12-06]. ISSN 1523-0864. Dostupné z: doi:10.1089/ars.2007.1993.
- [20] PACHER, Pál, Joseph S. BECKMAN a Lucas LIAUDET. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological Reviews* [online]. 2007, **87**(1), 315-424 [cit. 2024-01-30]. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00029.2006.
- [21] FERRER-SUETA, Gerardo a Rafael RADI. Chemical Biology of Peroxynitrite: Kinetics, Diffusion, and Radicals. *ACS Chemical Biology* [online]. 2009, **4**(3), 161-177 [cit. 2024-01-28]. ISSN 1554-8929. Dostupné z: doi:10.1021/cb800279q.
- [22] KIRSCH, Michael, Hans-Gert KORTH, Reiner SUSTMANN a Herbert de GROOT. The Pathobiochemistry of Nitrogen Dioxide. *Biological Chemistry* [online]. 2002, **383**(3-4), 389-399 [cit. 2024-01-31]. ISSN 1431-6730. Dostupné z: doi:10.1515/BC.2002.043.
- [23] BORODKIN, Gennady Ivanovich a Vyacheslav SHUBIN. Nitrosonium cation in chemical and biochemical reactions: achievements and prospects. *Russian Chemical Reviews* [online]. 2017, **86**(1), 18-46 [cit. 2024-01-31]. ISSN 0036-021X. Dostupné z: doi:10.1070/RCR4662.
- [24] KOTHA, Raghavendhar R., Fakir Shahidullah TAREQ, Elif YILDIZ a Devanand L. LUTHRIA. Oxidative Stress and Antioxidants—A Critical Review on In Vitro Antioxidant Assays. *Antioxidants* [online]. 2022, **11**(12):2388 [cit. 2024-02-02]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox11122388.
- [25] YOUNUS, Hina. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *International Journal of Health Sciences* [online]. 2018, **12**(3), 88-93 [cit. 2024-02-02]. ISSN 1658-363. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5969776/>.

- [26] GLORIEUX, Christophe, Marcel ZAMOCKY, Juan Marcelo SANDOVAL, Julien VERRAX a Pedro Buc CALDERON. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2015, **87**, 84-97 [cit. 2024-02-02]. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.017.
- [27] GLORIEUX, Christophe a Pedro Buc CALDERON. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological Chemistry* [online]. 2017, **398**(10), 1095-1108 [cit. 2024-02-02]. ISSN 1437-4315. Dostupné z: doi:10.1515/hsz-2017-0131.
- [28] COUTO, Narciso, Jennifer WOOD a Jill BARBER. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2016, **95**, 27-42 [cit. 2024-02-05]. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028.
- [29] BENHAR, Moran. Roles of mammalian glutathione peroxidase and thioredoxin reductase enzymes in the cellular response to nitrosative stress. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2018, **127**, 160-164 [cit. 2024-02-06]. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.028.
- [30] OESTREICHER, Julian a Bruce MORGAN. Glutathione: subcellular distribution and membrane transport. *Biochemistry and Cell Biology* [online]. 2019, **97**(3), 270-289 [cit. 2024-02-06]. ISSN 0829-8211. Dostupné z: doi:10.1139/bcb-2018-0189.
- [31] RAIZNER, Albert E. Coenzyme Q10. *Methodist DeBakey Cardiovascular Journal* [online]. 2019, **15**(3), 185-191 [cit. 2024-05-04]. ISSN 1947-6108. Dostupné z: doi:10.14797/mdcj-15-3-185.
- [32] HARGREAVES, Iain, Robert A. HEATON a David MANTLE. Disorders of Human Coenzyme Q10 Metabolism: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(18):6695 [cit. 2024-05-04]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21186695.
- [33] KOEKKOEK, W. A. C. (Kristine) a Arthur R. H. VAN ZANTEN. Antioxidant Vitamins and Trace Elements in Critical Illness. *Nutrition in Clinical Practice* [online]. 2016, **31**(4), 457-474 [cit. 2024-02-13]. ISSN 0884-5336. Dostupné z: doi:10.1177/0884533616653832.
- [34] KAŻMIERCZAK-BARAŃSKA, Julia, Karolina BOGUSZEWSKA, Angelika ADAMUS-GRABICKA a Bolesław T. KARWOWSKI. Two Faces of Vitamin C—

- Antioxidative and Pro-Oxidative Agent. *Nutrients* [online]. 2020, **12**(5):1501 [cit. 2024-02-07]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu12051501.
- [35] MIYAZAWA, Taiki, Gregor C. BURDEOS, Mayuko ITAYA, Kiyotaka NAKAGAWA a Teruo MIYAZAWA. Vitamin E: Regulatory Redox Interactions. *IUBMB Life* [online]. 2019, **71**(4), 430-441 [cit. 2024-02-09]. ISSN 1521-6543. Dostupné z: doi:10.1002/iub.2008.
- [36] LEE, Ga a Sung HAN. The Role of Vitamin E in Immunity. *Nutrients* [online]. 2018, **10**(11):1614 [cit. 2024-02-09]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu10111614.
- [37] MILANI, Alireza, Marzieh BASIRNEJAD, Sepideh SHAHBAZI a Azam BOLHASSANI. Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. *British Journal of Pharmacology* [online]. 2017, **174**(11), 1290-1324 [cit. 2024-02-10]. ISSN 0007-1188. Dostupné z: doi:10.1111/bph.13625.
- [38] JAROSZ, Magdalena, Magdalena OLBERT, Gabriela WYSZOGRODZKA, Katarzyna MŁYNIĘC a Tadeusz LIBROWSKI. Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF- $\kappa$ B signaling. *Inflammopharmacology* [online]. 2017, **25**(1), 11-24 [cit. 2024-02-10]. ISSN 0925-4692. Dostupné z: doi:10.1007/s10787-017-0309-4.
- [39] KURŠVIETIENĖ, Lolita, Aušra MONGIRDIENĖ, Jurga BERNATONIENĖ, Jurgita ŠULINSKIENĖ a Inga STANEVIČIENĖ. Selenium Anticancer Properties and Impact on Cellular Redox Status. *Antioxidants* [online]. 2020, **9**(1):80 [cit. 2024-02-10]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox9010080.
- [40] PANIERI, Emiliano a Massimo M, SANTORO. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death & Disease* [online]. 2016, **7**(6):2253 [cit. 2024-02-16]. ISSN 2041-4889. Dostupné z: doi:10.1038/cddis.2016.105.
- [41] SINGH, Nitin, Deepak BABY, Jagadish Prasad RAJGURU, Pankaj B PATIL, Savita S THAKKANNAVAR a Veena Bhojaraj PUJARI. Inflammation and cancer. *Annals of African Medicine* [online]. 2019, **18**(3), 121-126 [cit. 2024-02-16]. ISSN 1596-3519. Dostupné z: doi:10.4103/aam.aam\_56\_18.
- [42] KLAUNIG, James E. Oxidative Stress and Cancer. *Current Pharmaceutical Design* [online]. 2019, **24**(40), 4771-4778 [cit. 2024-02-17]. ISSN 13816128. Dostupné z: doi:10.2174/1381612825666190215121712.

- [43] JELIC, Marija Dragan, Aljosa D. MANDIC, Slobodan M. MARICIC a Branislava U. SRDJENOVIC. Oxidative stress and its role in cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* [online]. 2021, **17**(1), 22-28 [cit. 2024-02-20]. ISSN 0973-1482. Dostupné z: doi:10.4103/jcrt.JCRT\_862\_16.
- [44] LIOU, Geou-Yarh a Peter STORZ. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research* [online]. 2010, **44**(5), 479-496 [cit. 2024-02-18]. ISSN 1071-5762. Dostupné z: doi:10.3109/10715761003667554.
- [45] PIZZINO, Gabriele, Natasha IRRERA, Mariapaola CUCINOTTA, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2017, **2017**:8416763 [cit. 2024-03-23]. ISSN 1942-0900. Dostupné z: doi:10.1155/2017/8416763.
- [46] MINCHIN, Steve a Julia LODGE. Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. *Essays in Biochemistry* [online]. 2019, 2019-10-16, **63**(4), 433-456 [cit. 2024-03-27]. ISSN 0071-1365. Dostupné z: doi:10.1042/EBC20180038.
- [47] CARUSILLO, Antonio a Claudio MUSSOLINO. DNA Damage: From Threat to Treatment. *Cells* [online]. 2020, **9**(7):1665 [cit. 2024-03-27]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells9071665.
- [48] POETSCH, Anna R. The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis. *Computational and Structural Biotechnology Journal* [online]. 2020, **18**, 207-219 [cit. 2024-04-04]. ISSN 20010370. Dostupné z: doi:10.1016/j.csbj.2019.12.013.
- [49] RENAUDIN, Xavier. Reactive oxygen species and DNA damage response in cancer. In: *Chromatin and Genomic Instability in Cancer* [online]. Elsevier, 2021, s. 139-161 [cit. 2024-04-04]. International Review of Cell and Molecular Biology. ISBN 9780323855617. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1937644821000496>.
- [50] CHATGILIALOGLU, Chryssostomos, Carla FERRERI, Marios G. KROKIDIS, Annalisa MASI a Michael A. TERZIDIS. On the relevance of hydroxyl radical to purine DNA damage. *Free Radical Research* [online]. 2021, **55**(4), 384-404 [cit. 2024-04-05]. ISSN 1071-5762. Dostupné z: doi:10.1080/10715762.2021.1876855.
- [51] CHIORCEA-PAQUIM, Ana-Maria. 8-oxoguanine and 8-oxodeoxyguanosine Biomarkers of Oxidative DNA Damage: A Review on HPLC–ECD Determination.

- Molecules* [online]. 2022, **27**(5):1620 [cit. 2024-04-06]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27051620.
- [52] MARMIY, Natalia V. a Dmitry Stanislavovich ESIPOV. Biological role of 8-oxo-2'-deoxyguanosine. *Moscow University Biological Sciences Bulletin* [online]. 2015, **70**(4), 168-172 [cit. 2024-04-06]. ISSN 0096-3925. Dostupné z: doi:10.3103/S0096392515040070.
- [53] GIORGIO, Marco, Gaetano Ivan DELLINO, Valentina GAMBINO, Niccolo' RODA a Pier Giuseppe PELICCI. On the epigenetic role of guanosine oxidation. *Redox Biology* [online]. 2020, **29**:101398 [cit. 2024-04-06]. ISSN 22132317. Dostupné z: doi:10.1016/j.redox.2019.101398.
- [54] SHANDIZ, Fatemeh Homaei, Kamran GHAFFARZADEGAN, Saeed Jahani FARIMAN, Mahdi AKBARZADEH, Sepideh ELYASI a Amir Hooshang MOHAMMADPOUR. Evaluation of serum levels of 8-oxo-2'-deoxyguanosine as a prognostic factor in nonmetastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Management* [online]. 2017, **6**(2), 71-79 [cit. 2024-04-06]. ISSN 1758-1923. Dostupné z: doi:10.2217/bmt-2017-0009.
- [55] GORINI, Francesca, Giovanni SCALA, Marcus S. COOKE, Barbara MAJELLO a Stefano AMENTE. Towards a comprehensive view of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: Highlighting the intertwined roles of DNA damage and epigenetics in genomic instability. *DNA Repair* [online]. 2021, **97**:103027 [cit. 2024-04-06]. ISSN 15687864. Dostupné z: doi:10.1016/j.dnarep.2020.103027.
- [56] PLA, Luis, Félix SANCENÓN, M. Carmen MARTÍNEZ-BISBAL, et al. A new 8-oxo-7,8-2'-deoxyguanosine nanoporous anodic alumina aptasensor for colorectal cancer diagnosis in blood and urine. *Nanoscale* [online]. 2021, **13**(18), 8648-8657 [cit. 2024-04-06]. ISSN 2040-3364. Dostupné z: doi:10.1039/D0NR07948K.
- [57] KRUCHININ, Alexander A., Polina N. KAMZEEVA, Dmitry O. ZHARKOV, Andrey V. ARALOV a Alena V. MAKAROVA. 8-Oxoadenine: A «New» Player of the Oxidative Stress in Mammals? *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2024, **25**(2):1342 [cit. 2024-04-13]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms25021342.
- [58] ANDRÉS, Celia María Curieses, José Manuel Pérez de la LASTRA, Celia Andrés JUAN, Francisco J. PLOU a Eduardo PÉREZ-LEBEÑA. Chemical Insights into

- Oxidative and Nitrative Modifications of DNA. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2023, **24**(20):15240 [cit. 2024-04-13]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms242015240.
- [59] PHANIENDRA, Alugoju, Dinesh Babu JESTADI a Latha PERIYASAMY. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* [online]. 2015, **30**(1), 11-26 [cit. 2024-04-07]. ISSN 0970-1915. Dostupné z: doi:10.1007/s12291-014-0446-0.
- [60] BUDZINSKI, Edwin E., Helen B. PATRZYC, Jean B. DAWIDZIK, et al. Pyrimidine base damage is increased in women with BRCA mutations. *Cancer Letters* [online]. 2013, **338**(2), 267-270 [cit. 2024-04-08]. ISSN 03043835. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2013.04.001.
- [61] DIZDAROGLU, Miral. Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease. *Cancer Letters* [online]. 2012, **327**(1-2), 26-47 [cit. 2024-04-07]. ISSN 03043835. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2012.01.016.
- [62] WANG, Yafen, Xiong ZHANG, Guangrong ZOU, Shuang PENG, Chaoxing LIU a Xiang ZHOU. Detection and Application of 5-Formylcytosine and 5-Formyluracil in DNA. *Accounts of Chemical Research* [online]. 2019, **52**(4), 1016-1024 [cit. 2024-04-09]. ISSN 0001-4842. Dostupné z: doi:10.1021/acs.accounts.8b00543.
- [63] DOUKI, Thierry. Oxidative Stress and Genotoxicity in Melanoma Induction: Impact on Repair Rather Than Formation of DNA Damage? *Photochemistry and Photobiology* [online]. 2020, **96**(5), 962-972 [cit. 2024-04-08]. ISSN 0031-8655. Dostupné z: doi:10.1111/php.13278.
- [64] JIN, Seung-Gi, Dean PETTINGA, Jennifer JOHNSON, Peipei LI a Gerd P. PFEIFER. The major mechanism of melanoma mutations is based on deamination of cytosine in pyrimidine dimers as determined by circle damage sequencing. *Science Advances* [online]. 2021, **7**(31):eabi6508 [cit. 2024-04-08]. ISSN 2375-2548. Dostupné z: doi:10.1126/sciadv.abi6508.
- [65] MINCHIN, Steve a Julia LODGE. Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. *Essays in Biochemistry* [online]. 2019, **63**(4), 433-456 [cit. 2024-04-13]. ISSN 0071-1365. Dostupné z: doi:10.1042/EBC20180038.

- [66] FIMOGNARI, Carmela. Role of Oxidative RNA Damage in Chronic-Degenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2015, **2015**, 358713 [cit. 2024-04-14]. ISSN 1942-0900. Dostupné z: doi:10.1155/2015/358713.
- [67] HEMAGIRRI, Manisekaran a Sreenivasan SASIDHARAN. Biology of aging: Oxidative stress and RNA oxidation. *Molecular Biology Reports* [online]. 2022, **49**(6), 5089-5105 [cit. 2024-04-14]. ISSN 0301-4851. Dostupné z: doi:10.1007/s11033-022-07219-1.
- [68] GUO, Cheng, Qin CHEN, Jiani CHEN, Jiekai YU, Yiqiu HU, Suzhan ZHANG a Shu ZHENG. 8-Hydroxyguanosine as a possible RNA oxidative modification marker in urine from colorectal cancer patients: Evaluation by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* [online]. 2020, **1136**:12193 [cit. 2024-04-14]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2019.121931.
- [69] KHAN, Rizwan Hasan, Mohammad Khursheed SIDDIQI a Parveen SALAHUDDIN. Protein structure and function. In: *Basic Biochemistry* [online]. Austin Publications, 2017 [cit. 2024-04-27]. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/316139245>.
- [70] REZAYIAN, Maryam, Vahid NIKNAM a Hassan EBRAHIMZADEH. Oxidative damage and antioxidative system in algae. *Toxicology Reports* [online]. 2019, **6**, 1309-1313 [cit. 2024-04-27]. ISSN 22147500. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxrep.2019.10.001.
- [71] THANAN, Raynoo, Shinji OIKAWA, Yusuke HIRAKU, et al. Oxidative Stress and Its Significant Roles in Neurodegenerative Diseases and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2015, **16**(1), 193-217 [cit. 2024-04-28]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms16010193.
- [72] FEDOROVA, Maria, Ravi Chand BOLLINENI a Ralf HOFFMANN. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies. *Mass Spectrometry Reviews* [online]. 2014, **33**(2), 79-97 [cit. 2024-04-28]. ISSN 0277-7037. Dostupné z: doi:10.1002/mas.21381.
- [73] LIU, Juan, Cen ZHANG, Wenwei HU a Zhaohui FENG. Tumor suppressor p53 and its mutants in cancer metabolism. *Cancer Letters* [online]. 2015, **356**(2), 197-203 [cit. 2024-04-30]. ISSN 03043835. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2013.12.025.

- [74] TANAKA, Toshimichi, Masahiko WATANABE a Keishi YAMASHITA. Potential therapeutic targets of TP53 gene in the context of its classically canonical functions and its latest non-canonical functions in human cancer. *Oncotarget* [online]. 2018, **9**(22), 16234-16247 [cit. 2024-04-30]. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.24611.
- [75] BABAMOHAMADI, Mehregan, Esmaeil BABAEI, Burhan AHMED SALIH, Mahshid BABAMOHAMMADI, Hewa JALAL AZEEZ a Goran OTHMAN. Recent findings on the role of wild-type and mutant p53 in cancer development and therapy. *Frontiers in Molecular Biosciences* [online]. 2022, **9**:903075 [cit. 2024-04-30]. ISSN 2296-889X. Dostupné z: doi:10.3389/fmolb.2022.903075.
- [76] ZAWACKA-PANKAU, Joanna E. The Role of p53 Family in Cancer. *Cancers* [online]. 2022, **14**(3):823 [cit. 2024-04-30]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers14030823.
- [77] LIU, Juan, Cen ZHANG, Wenwei HU a Zhaohui FENG. Tumor suppressor p53 and its mutants in cancer metabolism. *Cancer Letters* [online]. 2015, **356**(2), 197-203 [cit. 2024-04-30]. ISSN 03043835. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2013.12.025.
- [78] BUTTURINI, Elena, Giovanna BUTERA, Raffaella PACCHIANA, Alessandra CARCERERI DE PRATI, Sofia MARIOTTO a Massimo DONADELLI. Redox Sensitive Cysteine Residues as Crucial Regulators of Wild-Type and Mutant p53 Isoforms. *Cells* [online]. 2021, **10**(11):3149 [cit. 2024-05-01]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells10113149.
- [79] CORDANI, Marco, Giovanna BUTERA, Raffaella PACCHIANA, Francesca MASETTO, Nidula MULLAPPILLY, Chiara RIGANTI a Massimo DONADELLI. Mutant p53-Associated Molecular Mechanisms of ROS Regulation in Cancer Cells. *Biomolecules* [online]. 2020, **10**(3):361 [cit. 2024-05-01]. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom10030361.
- [80] PERRI, Francesco, Salvatore PISCONTI a Giuseppina DELLA VITTORIA SCARPATI. P53 mutations and cancer: a tight linkage. *Annals of Translational Medicine* [online]. 2016, **4**(24):522 [cit. 2024-05-01]. ISSN 23055839. Dostupné z: doi:10.21037/atm.2016.12.40.
- [81] GILLE, Benedikt, Christina E. GALUSKA, Beate FUCHS a Shahaf PELEG. Recent Advances in Studying Age-Associated Lipids Alterations and Dietary Interventions in

- Mammals. *Frontiers in Aging* [online]. 2021, **2**:773795 [cit. 2024-05-01]. ISSN 2673-6217. Dostupné z: doi:10.3389/fragi.2021.773795.
- [82] ENDALE, Hiwot Tezera, Winta TESFAYE a Tiget Ayelgn MENGSTIE. ROS induced lipid peroxidation and their role in ferroptosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. 2023, **11**:1226044 [cit. 2024-05-02]. ISSN 2296-634X. Dostupné z: doi:10.3389/fcell.2023.1226044.
- [83] GASPAROVIC, Ana Cipak, Lidija MILKOVIC, Suzana Borovic SUNJIC a Neven ZARKOVIC. Cancer growth regulation by 4-hydroxynonenal. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2017, **111**, 226-234 [cit. 2024-05-02]. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.030.
- [84] GENTILE, Fabrizio, Alessia ARCARO, Stefania PIZZIMENTI, et al. DNA damage by lipid peroxidation products: implications in cancer, inflammation and autoimmunity. *AIMS Genetics* [online]. 2021, **04**(02), 103-137 [cit. 2024-05-02]. ISSN 2377-1143. Dostupné z: doi:10.3934/genet.2017.2.103.
- [85] ROSSIN, Daniela, Simone CALFAPIETRA, Barbara SOTTERO, Giuseppe POLI a Fiorella BIASI. HNE and cholesterol oxidation products in colorectal inflammation and carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2017, **111**, 186-195 [cit. 2024-05-03]. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.017.
- [86] JAKOVČEVIĆ, Antonia, Kamelija ŽARKOVIĆ, Danica JAKOVČEVIĆ, Zoran RAKUŠIĆ, Drago PRGOMET, Georg WAEG, Suzana Borović ŠUNJIĆ a Neven ŽARKOVIĆ. The Appearance of 4-Hydroxy-2-Nonenal (HNE) in Squamous Cell Carcinoma of the Oropharynx. *Molecules* [online]. 2020, **25**(4):868 [cit. 2024-05-03]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25040868.
- [87] SAIEVA, Calogero, Marco PELUSO, Domenico PALLI, et al. Dietary and lifestyle determinants of malondialdehyde DNA adducts in a representative sample of the Florence City population. *Mutagenesis* [online]. 2016, **31**(4), 475-480 [cit. 2024-05-03]. ISSN 0267-8357. Dostupné z: doi:10.1093/mutage/gew012.
- [88] LEPARA, Zahid, Orhan LEPARA, Almir FAJKIĆ, Damir REBIĆ, Jasmin ALIĆ a Hajrudin SPAHOVIĆ. Serum malondialdehyde (MDA) level as a potential biomarker of cancer progression for patients with bladder cancer. *Romanian Journal of Internal*

- Medicine* [online]. 2020, **58**(3), 146-152 [cit. 2024-05-31]. ISSN 2501-062X. Dostupné z: doi:10.2478/rjim-2020-0008.
- [89] WEE, Ping a Zhixiang WANG. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers* [online]. 2017, **9**(5):52 [cit. 2024-03-02]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers9050052.
- [90] SIGISMUND, Sara, Daniele AVANZATO a Letizia LANZETTI. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Molecular Oncology* [online]. 2018, **12**(1), 3-20 [cit. 2024-03-02]. ISSN 1574-7891. Dostupné z: doi:10.1002/1878-0261.12155.
- [91] WANG, Zhehai a Shu FANG. EGFR mutations as a prognostic and predictive marker in non-small-cell lung cancer. *Drug Design, Development and Therapy* [online]. 2014, (8), 1595-1611 [cit. 2024-03-22]. ISSN 1177-8881. Dostupné z: doi:10.2147/DDDT.S69690.
- [92] SAJADIMAJD, Soraya a Mozafar KHAZAEI. Oxidative Stress and Cancer: The Role of Nrf2. *Current Cancer Drug Targets* [online]. 2018, **18**(6), 538-557 [cit. 2024-03-04]. ISSN 15680096. Dostupné z: doi:10.2174/1568009617666171002144228.
- [93] REZATABAR, Setareh, Ansar KARIMIAN, Vahid RAMESHKANIA, et al. RAS/MAPK signaling functions in oxidative stress, DNA damage response and cancer progression. *Journal of Cellular Physiology* [online]. 2019, **234**(9), 14951-14965 [cit. 2024-03-11]. ISSN 0021-9541. Dostupné z: doi:10.1002/jcp.28334.
- [94] ULLAH, Rahim, Qing YIN, Aidan H. SNELL a Lixin WAN. RAF-MEK-ERK pathway in cancer evolution and treatment. *Seminars in Cancer Biology* [online]. 2022, **85**, 123-154 [cit. 2024-03-11]. ISSN 1044579X. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcancer.2021.05.010.
- [95] KARIMIAN, Ansar, Sayed Mostafa MIR, Hadi PARSIAN, Sona REFIEYAN, Mohammad MIRZA-AGHAZADEH-ATTARI, Bahman YOUSEFI a Maryam MAJIDINIA. Crosstalk between Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway with DNA damage response and oxidative stress in cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. 2019, **120**(6), 10248-10272 [cit. 2024-03-13]. ISSN 0730-2312. Dostupné z: doi:10.1002/jcb.28309.
- [96] OWUSU OBENG, Eric, Isabella RUSCIANO, Maria Vittoria MARVI, et al. Phosphoinositide-Dependent Signaling in Cancer: A Focus on Phospholipase C

- Isozymes. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(7):2581 [cit. 2024-03-14]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21072581.
- [97] BILL, Colin A. a Charlotte M. VINES. Phospholipase C. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2020, 2020-10-24, (1131), 215-242. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. ISBN 978-3-030-12456-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-12457-1\_9.
- [98] MANDAL, Supratim, Shrabasti BANDYOPADHYAY, Komal TYAGI a Adhiraj ROY. Recent advances in understanding the molecular role of phosphoinositide-specific phospholipase C gamma 1 as an emerging onco-driver and novel therapeutic target in human carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* [online]. 2021, **1876**(2):188619 [cit. 2024-03-14]. ISSN 0304419X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbcan.2021.188619.
- [99] HU, Xiaoyi, Jing LI, Maorong FU, Xia ZHAO a Wei WANG. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Signal Transduction and Targeted Therapy* [online]. 2021, **6**(1):402 [cit. 2024-03-16]. ISSN 2059-3635. Dostupné z: doi:10.1038/s41392-021-00791-1.
- [100] QURESHY, Zoya, Daniel E. JOHNSON a Jennifer R. GRANDIS. Targeting the JAK/STAT Pathway in Solid Tumors. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment* [online]. 2020, **6**(27):27 [cit. 2024-03-16]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7845926/>.
- [101] KAWANO, Takahito, Junichi INOKUCHI, Masatoshi ETO, Masaharu MURATA a Jeong-Hun KANG. Protein Kinase C (PKC) Isozymes as Diagnostic and Prognostic Biomarkers and Therapeutic Targets for Cancer. *Cancers* [online]. 2022, **14**(21):5425 [cit. 2024-03-17]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers14215425.
- [102] ISAKOV, Noah. Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. *Seminars in Cancer Biology* [online]. 2018, **48**, 36-52 [cit. 2024-03-17]. ISSN 1044579X. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcancer.2017.04.012.
- [103] KASHYAP, Dharambir, Hardeep Singh TULI, Katrin SAK, Vivek Kumar GARG, Neelam GOEL, Sandeep PUNIA a Ashun CHAUDHARY. Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression. *Current Pharmacology Reports* [online]. 2019, **5**(2), 79-86 [cit. 2024-05-05]. ISSN 2198-641X. Dostupné z: doi:10.1007/s40495-019-00171-y.

- [104] YOO, So Young a Sang Mo KWON. Angiogenesis and Its Therapeutic Opportunities. *Mediators of Inflammation* [online]. 2013, **2013**:127170 [cit. 2024-05-05]. ISSN 0962-9351. Dostupné z: doi:10.1155/2013/127170.
- [105] FAUBERT, Brandon, Ashley SOLMONSON a Ralph J. DEBERARDINIS. Metabolic reprogramming and cancer progression. *Science* [online]. 2020, **368**(6487):eaaw5473 [cit. 2024-05-05]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.aaw5473.
- [106] AGGARWAL, Vaishali, Hardeep TULI, Ayşegül VAROL, et al. Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements. *Biomolecules* [online]. 2019, **9**(11):735 [cit. 2024-05-05]. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom9110735.
- [107] BALAMURUGAN, Kuppusamy. HIF -1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. *International Journal of Cancer* [online]. 2016, **138**(5), 1058-1066 [cit. 2024-05-01]. ISSN 0020-7136. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.29519.