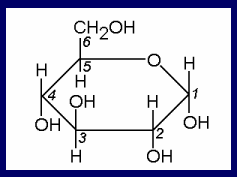
Antioxidanty v lidském těle z pohledu biologie a medicíny kyslíkových radikálů

MUDr. Jan Pláteník, PhD
Ústav lékařské biochemie 1.LF UK

K čemu vlastně potřebujeme kyslík?

Přenos elektronů (oxidace) z organických látek na kyslík uvolňuje obrovské množství energie

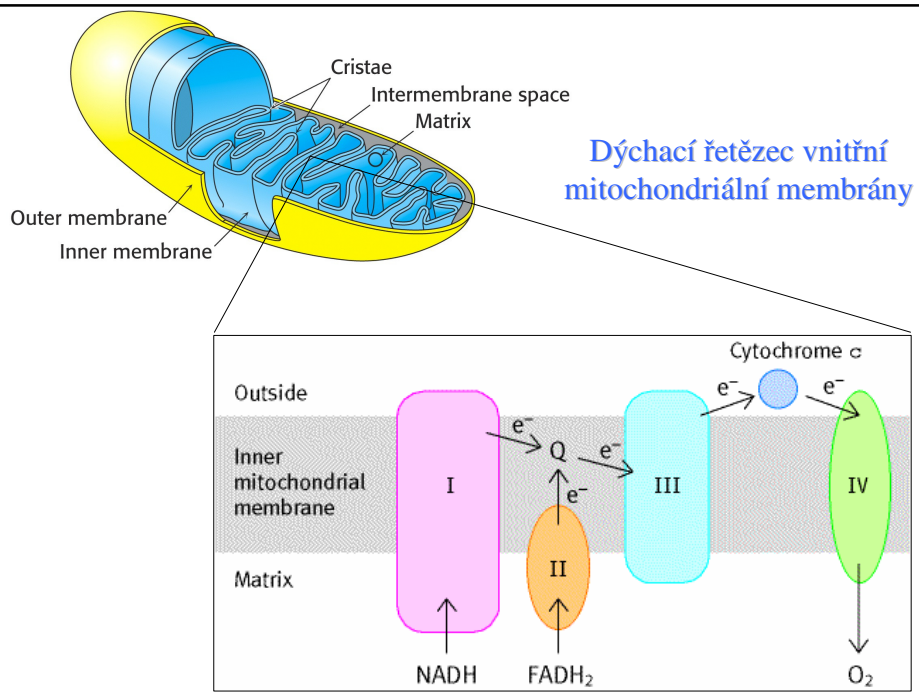
Př. Glukosa:



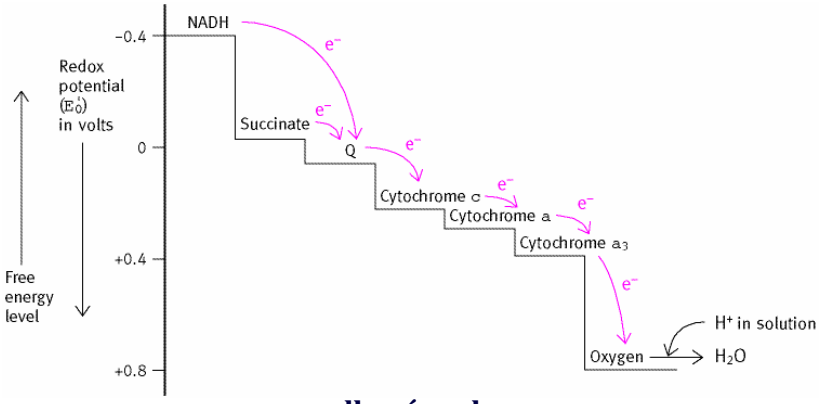
$$C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \rightarrow 6\,CO_2 + 6\,H_2O$$

$\Delta G^{o\prime} = -2820$ **kJ/ mol** (180 g glukosy)

Reaktivitu kyslíku lze navíc regulovat katalýzou přechodnými kovy (železo, měď)



..elektrony proudí po spádu redoxního potenciálu a končí na kyslíku

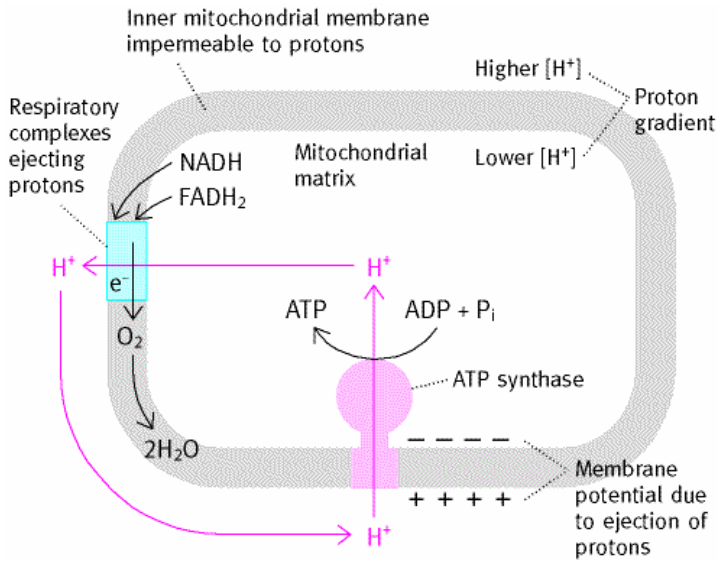


celková reakce:

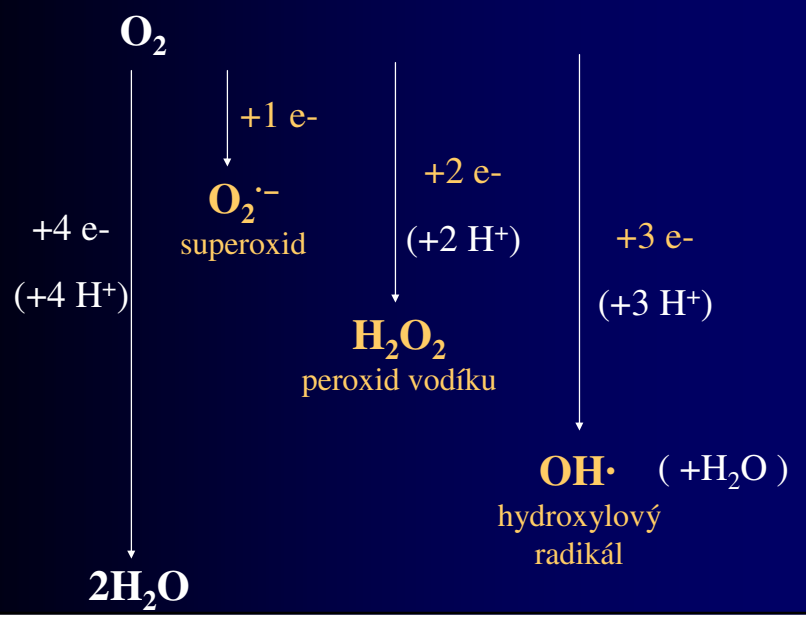
$$NADH + H^+ + 1/2\ O_2 \rightarrow NAD^+ + H_2O$$

$\Delta G^{o\prime} = -219.25\ kJ\ mol^{-1}$

Zároveň s proudem elektronů se pumpují protony a vzniklý protonový gradient pak pohání syntézu ATP



Reaktivní formy kyslíku (ROS, „kyslíkové radikály“) lze odvodit od meziproduktů redukce kyslíku na vodu:



Ionizační záření:

Hydroxylový radikál vzniká ionizací vody:

$H_2O + h\nu \rightarrow H^{\cdot} + OH^{\cdot}$

Reaktivní formy kyslíku v organismu:

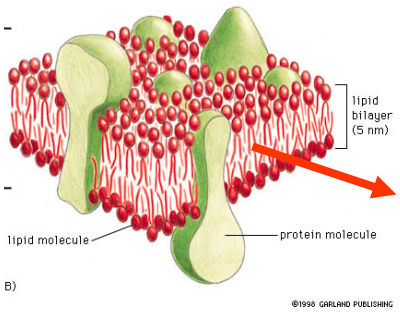
Jednoelektronovou redukcí kyslíku (mitochondrie, NADPH oxidasa) vzniká superoxid $O_2^{\cdot -}$

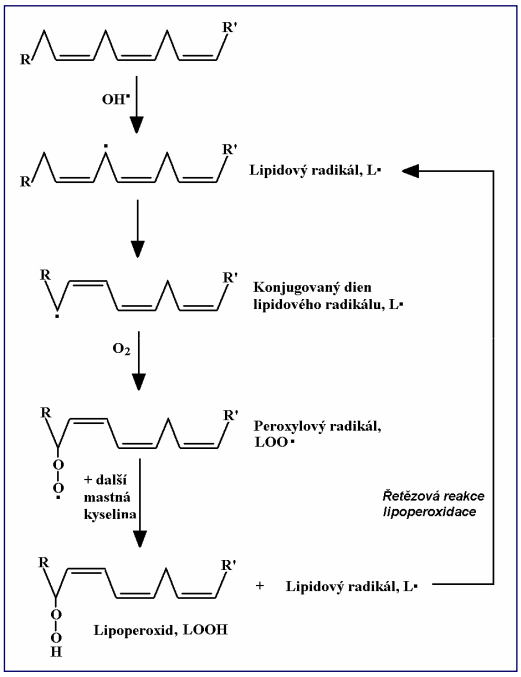
Dismutace superoxidu produkuje peroxid vodíku:

$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2\,H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$

Fentonova reakce s Fe nebo Cu vytvoří z peroxidu hydroxylový radikál:

$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^- + OH^{\cdot} + Fe^{3+}$



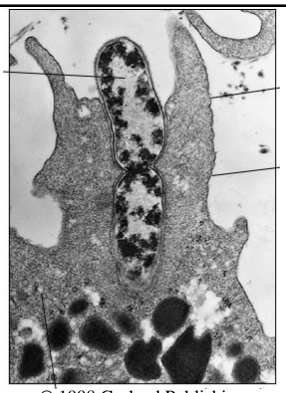


Peroxidace lipidů (žluknutí)

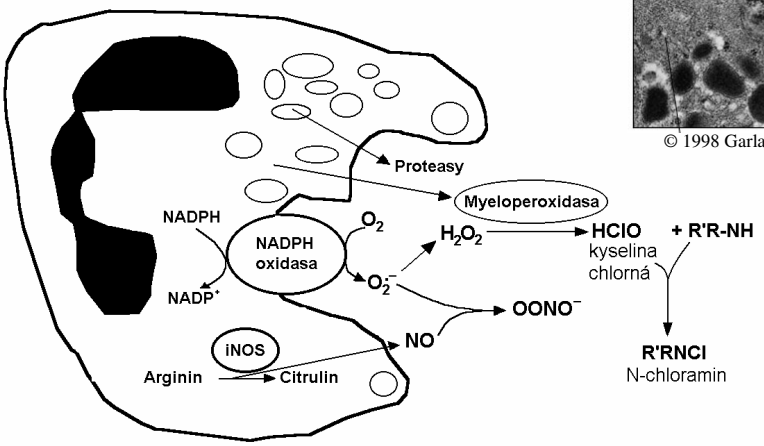
Oxidační poškození biomolekul

- **Lipidy:** peroxidace polynenasycených mastných kyselin v membránách,
- **Proteiny:** oxidace -SH, karbonylace -NH_2, hydroxylace/nitrosylace aromatických AMK, cross-linking, degradace
- **Nukleové kyseliny:** zlomy v řetězci DNA, hydroxylace basí ... mutace, kancerogenese

Příklad prospěšnosti ROS: Respirační vzplanutí neutrofilního granulocytu

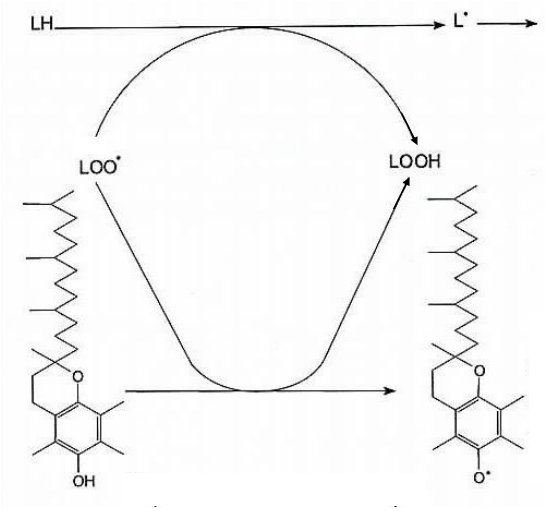


© 1998 Garland Publishing



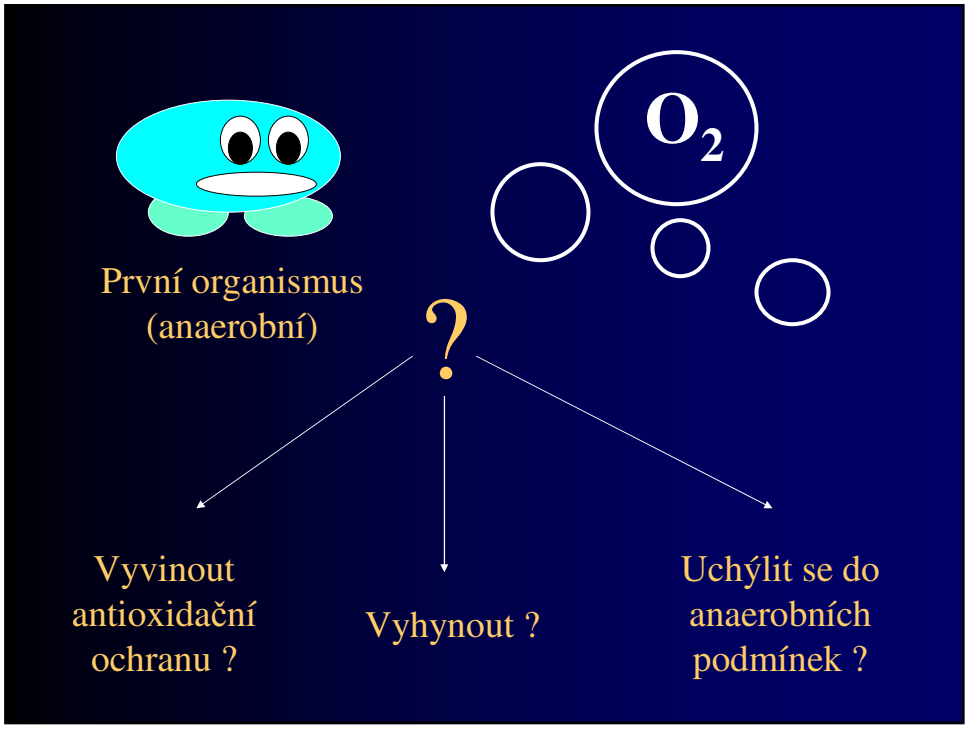
Antioxidant v chemii potravin

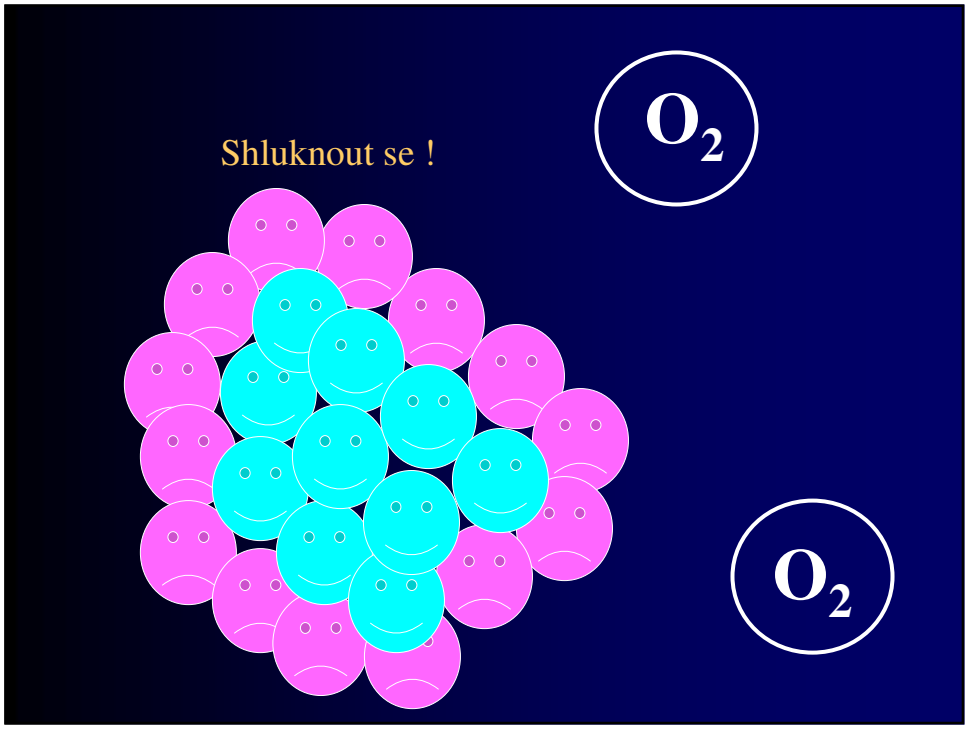
- Redukční činidlo schopné zastavit řetězovou reakci lipoperoxidace …“chain-breaking” ...
- Např.:
  - Butylovaný hydroxytoluen (BHT)
  - Butylovaný hydroxyanisol (BHA)
  - Tokoferol (Vitamín E)



Antioxidační ochrana lidského těla

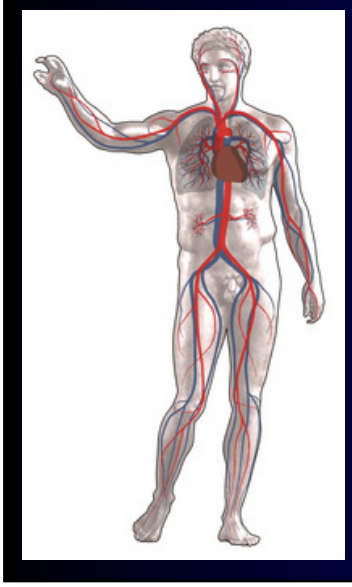
- Anatomické uspořádání regulující hladinu kyslíku ve tkáních
- Antioxidační enzymy
- Sekvestrace redoxně aktivních kovů
- Antioxidační substráty
- Stresová reakce
- (Reparace oxidačního poškození DNA, proteinů a lipidů)


O_2
První organismus
(anaerobní)
?
Vyvinout
antioxidační
ochranu ?
Vyhynout ?
Uchýlit se do
anaerobních
podmínek ?


O_2
Shluknout se !
O_2

Antioxidační ochrana I

Regulace O_2 ve tkáních



Vdechovaný vzduch:	160 mmHg O_2
Plicní kapiláry:	100 mmHg O_2
Arteriální krev:	85 mmHg O_2
Arterioly:	70 mmHg O_2
Kapiláry:	50 mmHg O_2
Buňky:	1-10 mmHg O_2
Mitochondrie:	< 0,5 mmHg O_2

Obr: Wikipedie

Antioxidační ochrana II

Antioxidační enzymy

- Superoxiddismutasa:

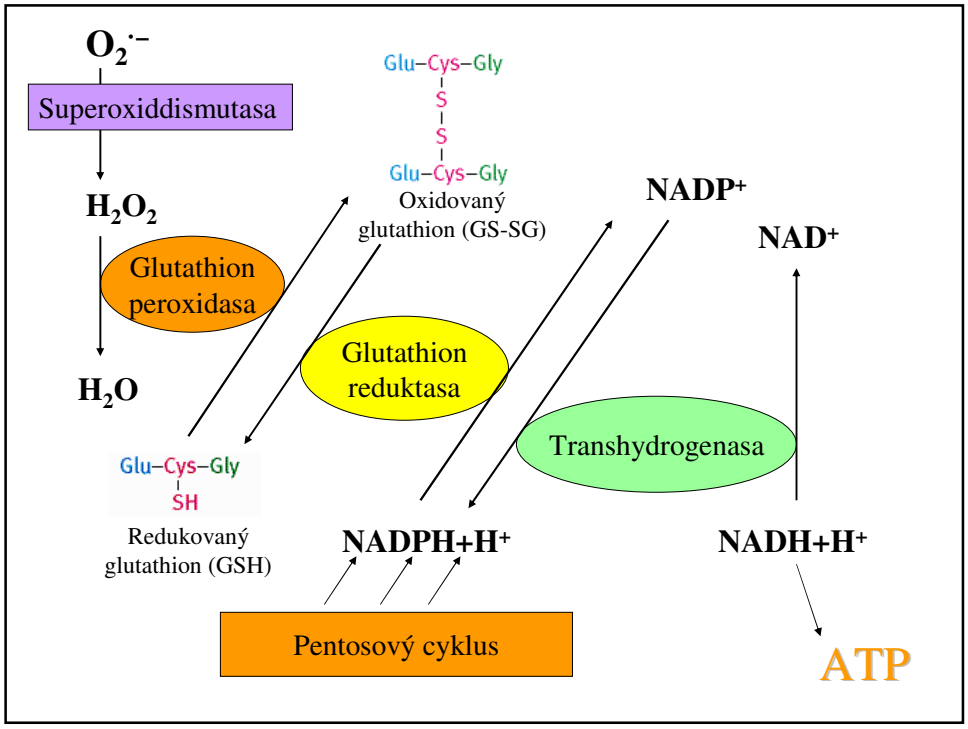
$$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2\,H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$$

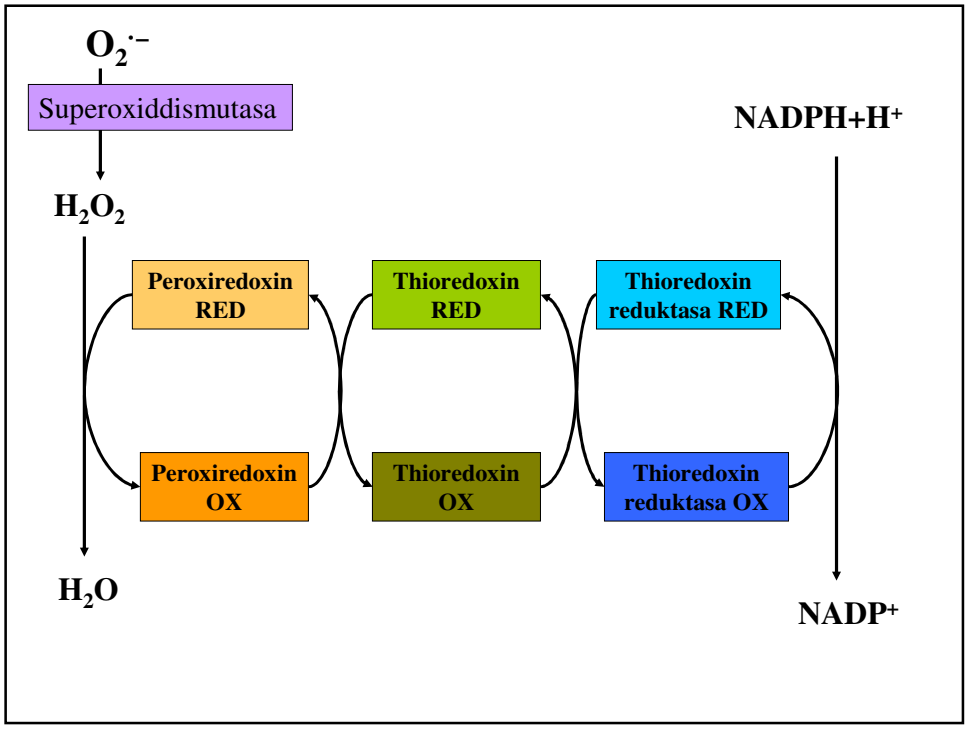
- Katalasa:

$$2\,H_2O_2 \rightarrow 2\,H_2O + O_2$$

- Glutathionperoxidasa, peroxiredoxin:

$$H_2O_2 + ROOH \rightarrow H_2O + ROH + O_2$$


$O_2^{\cdot-}$
Superoxiddismutasa
H_2O_2
Glutathion peroxidasa
H_2O
Glu–Cys–Gly
S
S
Glu–Cys–Gly
Oxidovaný glutathion (GS-SG)
Glutathion reduktasa
Glu–Cys–Gly
SH
Redukovaný glutathion (GSH)
$NADP^+$
NAD^+
Transhydrogenasa
$NADPH+H^+$
$NADH+H^+$
Pentosový cyklus
ATP


$O_2^{\cdot-}$
Superoxiddismutasa
H_2O_2
H_2O
Peroxiredoxin RED
Peroxiredoxin OX
Thioredoxin RED
Thioredoxin OX
Thioredoxin reduktasa RED
Thioredoxin reduktasa OX
$NADPH+H^+$
$NADP^+$

Antioxidační ochrana III

Sekvestrace železa a mědi

- Redoxně aktivní přechodné kovy (Fe, Cu) přijímají/dávají jeden elektron snadno
  - ... obcházejí spinovou restrikci kyslíku
  - ... kovy jsou v aktivních centrech všech proteinů pracujících s kyslíkem
- Ale, tytéž vlastnosti Fe, Cu jsou škodlivé pokud nejsou kontrolovány
  - Fentonova reakce:

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^- + OH\cdot + Fe^{3+}$$

oxidativní poškození biomolekul

Antioxidační ochrana III

Sekvestrace železa a mědi

- Proteiny zacházející s železem a/nebo mědí:
  - transferin: váže 2 atomy Fe^{3+} (transport)
  - laktoferin: analogický transferinu, ale Fe neuvolňuje (... jen sekvestrace), leukocyty
  - feritin: H a L podjednotky, H je ferroxidasa, skladování Fe (až 4500 atomů Fe^{3+})
  - haptoglobin: váže hemoglobin v cirkulaci
  - hemopexin: váže hem v cirkulaci
  - ceruloplasmin: obsahuje Cu, funkce: ferroxidasa (export Fe z buněk)
  - albumin: transport Cu

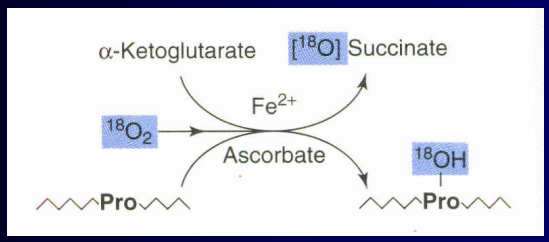
ICT	ECT
~~Superoxid~~ ~~Peroxid~~ Fe/Cu	Superoxid Peroxid ~~Fe/Cu~~
Superoxiddismutasa Glutathionperoxidasa Katalasa Glutathion Tokoferol Askorbát	*Antioxidační enzymy & hladiny glutathionu velmi nízké* Tokoferol Askorbát Karotenoidy, kyselina močová, albumin, glukosa, bilirubin...
Low-molecular-weight Fe přítomno	Sekvestrace železa a mědi: - transferin, laktoferin - hemopexin - haptoglobin - ceruloplasmin (ferroxidasa) - Cu vázáno na albumin

Antioxidační ochrana IV

Nízkomolekulární antioxidační substráty

- THIOLY:
  - Glutathion
  - Thioredoxin
- DALŠÍ ENDOGENNÍ METABOLITY:
  - Bilirubin
  - Kyselina močová
  - Kyselina lipoová
- Z DIETY:
  - Askorbát (Vitamín C)
  - α-Tokoferol (Vitamín E)
  - Karotenoidy
  - Rostlinné fenoly

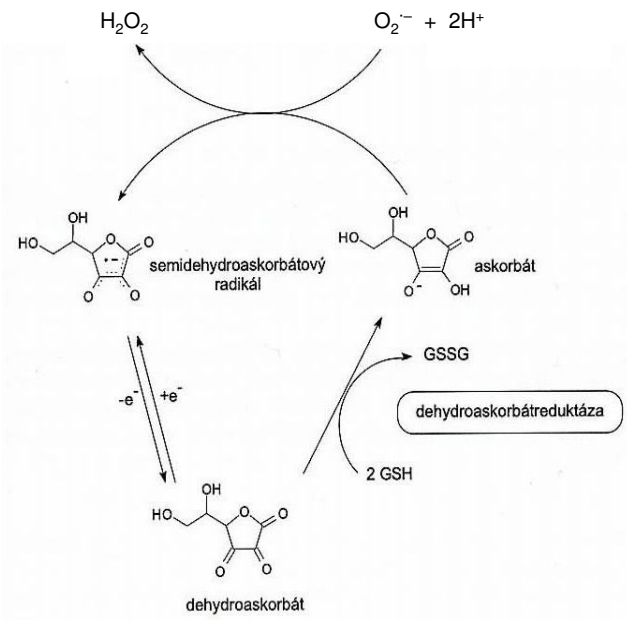
Hlavní funkce askorbátu v těle: kofaktor hydroxylas

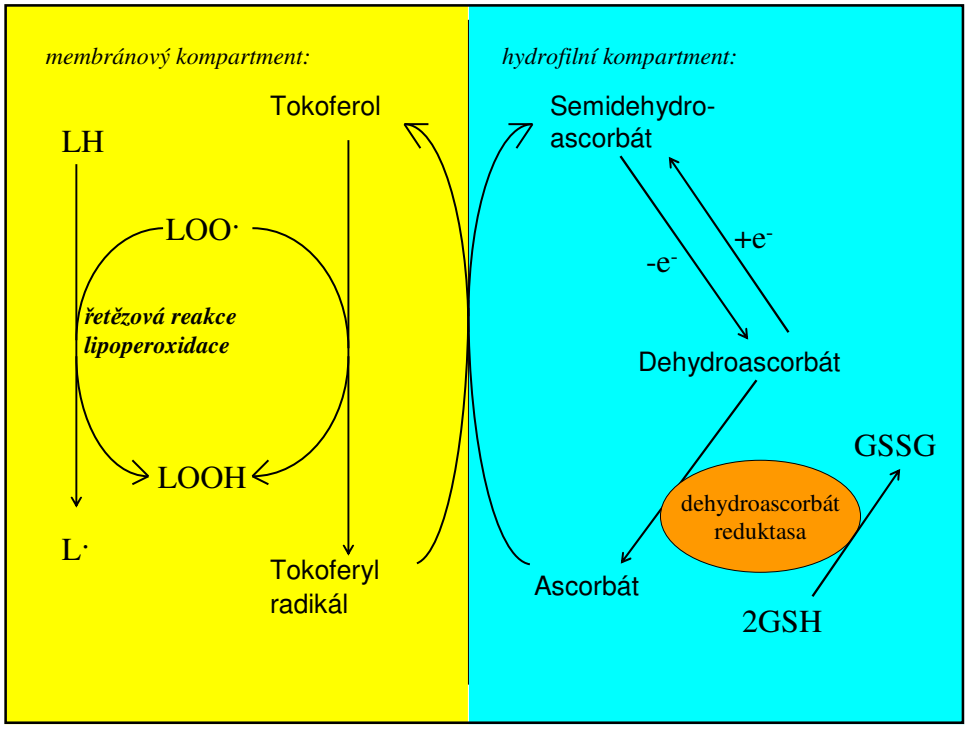


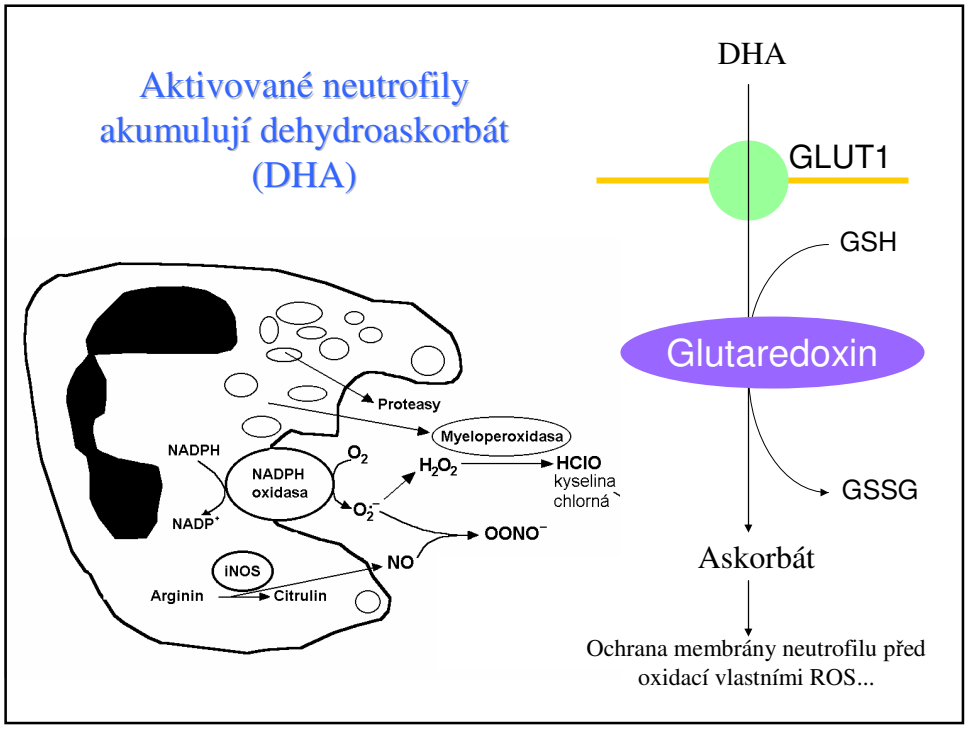
- Hydroxylace Pro a Lys při syntéze kolagenu
- Syntéza noradrenalinu z dopaminu
- Syntéza karnitinu (… úloha v oxidaci tuků)
- Aktivace hypotalamických peptidových hormonů amidací (CRH, GRH, oxytocin, vasopresin, substance P)

Askorbát jako scavenger radikálů ?

- In vitro redukuje (zháší) $O_2^{\cdot -}$, OH·, ROO·, HOCl atd.
- In vivo ?




membránový kompartment:
hydrofilní kompartment:
Tokoferol
LH
LOO·
řetězová reakce lipoperoxidace
LOOH
L·
Tokoferyl radikál
Semidehydro-ascorbát
-e-
+e-
Dehydroascorbát
GSSG
dehydroascorbát reduktasa
Ascorbát
2GSH


Aktivované neutrofily akumulují dehydroaskorbát (DHA)
Proteasy
Myeloperoxidasa
NADPH
NADPH oxidasa
NADP+
O2
H2O2
HClO
kyselina chlorná
O2-
OONO-
NO
iNOS
Arginin
Citrulin
DHA
GLUT1
GSH
Glutaredoxin
GSSG
Askorbát
Ochrana membrány neutrofilu před oxidací vlastními ROS...

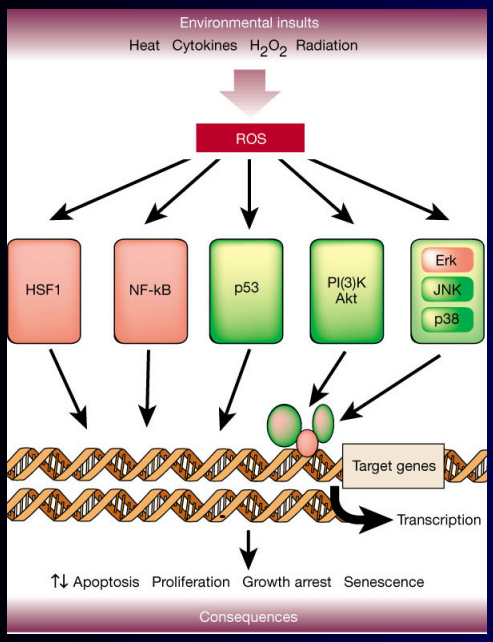
Askorbát jako prooxidant ?

- Udenfriendův systém pro generování OH· in vitro:

Askorbát + FeIII-EDTA →
→ Semidehydroaskorbát + FeII-EDTA

H_2O_2 + FeII-EDTA → FeIII-EDTA
+ OH^- + OH·

- In vivo snad u přetížení železem ?



(T. Finkel & N.J. Holbrook, Nature 408 (2000), 239-247)

Koncept redoxní signalizace

- Redoxní sensory na proteinech:
  - kritické -SH skupiny
  - Fe-S centra
- Cíle redoxní signalizace:
  - transkripční faktory
  - proteinkinasy a fosfatasy
- Komplexní odpověď buňky:
  - proliferace
  - indukce antioxidační ochrany
  - apoptóza

Antioxidační ochrana V
Stresová reakce

Oxidace nebo nitrosylace kritických -SH skupin

↓

Transkripční faktory (NFκB, Nrf-2…):
aktivace, translokace do jádra

↓

Indukce genové exprese:
- chaperony (heat shock proteiny)
- enzymy antioxidační ochrany
- metalothionein
- hemoxygenasa 1

…→ vyšší odolnost vůči dalšímu oxidačnímu stresu

Volné radikály v patogenesi lidských onemocnění

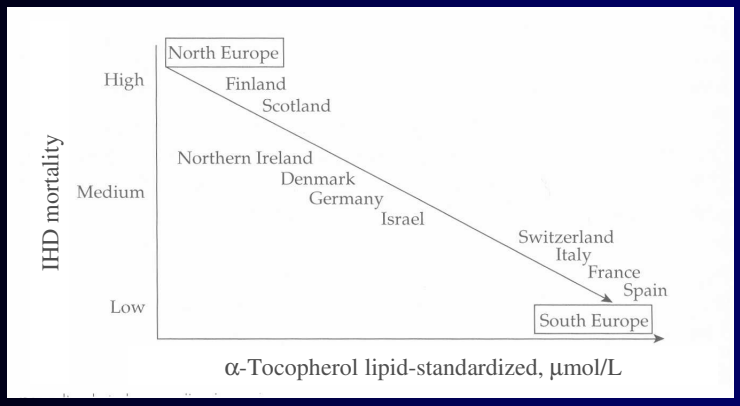
- **Příčina chorobného stavu, např.:**
  - cancerogenese v důsledku expozice ionizačnímu záření
  - retinopatie novorozenců (fibroplasia retrolentalis)
  - iron-overload disease
- **Významný podíl na patogenesi, např.:**
  - chronický zánět (např. revmatoidní artritis)
  - ARDS
  - aterosclerosa
  - mozkové trauma/hemoragie
  - diabetes mellitus
  - koncept ischemie/reperfuse
  - stárnutí
- **Jen epifenomenon** (obecný důsledek tkáňového poškození)

Radikálová teorie stárnutí (Harman 1956):

- Hromadění oxidačního poškození s věkem
- Vysvětluje vztah mezi intenzitou metabolismu (spotřebou kyslíku) a délkou života různých živočichů
- Stochastický proces, na rozdíl např. od embryogenese není přímo programováno genomem (ale geny hrají roli !)
- Na molekulární úrovni: neschopnost obnovovat správnou strukturu biomolekul neomezeně dlouho

  „systemic molecular disorder“ (Hayflick)
  - … antioxidační ochrana a systémy opravy DNA ve skutečnosti nepracují dokonale

Epidemiologické studie svědčí pro příznivý vliv dietních antioxidantů (vit. E, C, karotenoidy) na lidské zdraví



Gey F et al.: Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology, Am.J. Clin. Nutr. 1991; 53: 326S-34S (Obr. upraven podle B. Halliwell & J.M.C. Gutteridge: Free Radicals in Biology and Medicine, 4th ed., Oxford University Press 2007]

Ale intervenční studie to nepotvrzují..

- CHAOS (Cambridge Heart Antioxidant Study): 2002 pacientů s koronární atherosklerosou +/- α-tokoferol: 50 % pokles incidence nefatálních IM
- Ale další studie přinesly negativní výsledky:
  - GISSI (11324 pacientů)
  - HOPE (9541 pacientů)
  - MRC/BHF (20536 pacientů)
- Možná spíše prevence ..?
  - ASAP studie: kombinace α-tokoferolu s vit. C zpomalila progresi atherosklerosy karotid u 256 mužů, ale ne 264 žen

Antioxidační potravní doplňky mohou dokonce škodit !

- Recentní meta-analýza celkové mortality v 68 studiích s podáváním antioxidačních potravních doplňků (232 606 účastníků, 385 publikací):
  - β-karoten, vitamín A a vitamín E signifikantně zvyšují mortalitu
  - Vitamín C a selen nemají vliv

(Bjelakovic G et al., JAMA 2007; 297: 842-857)

Antioxidační ochrana V

Stresová reakce

Oxidace nebo nitrosylace kritických -SH skupin

↓

Transkripční faktory (NFκB, Nrf-2…):
aktivace, translokace do jádra

↓

Indukce genové exprese:

- chaperony (heat shock proteiny)
- enzymy antioxidační ochrany
- metalothionein
- hemoxygenasa 1

…→ vyšší odolnost vůči dalšímu oxidačnímu stresu

Kalorická restrikce prodlužuje život

- Omezení množství potravy při zachování její biologické kvality
- Funguje i u teplokrevných živočichů s konstantní intenzitou metabolismu
- Organismus „přečkávající“ nepříznivé období věnuje více metabolické energie na údržbu.
- Mechanismus: **sirtuiny** – enzymy deacetylující různé proteiny, inhibované NADH
- U lidí pravděpodobné, ale nebylo ještě přesvědčivě prokázáno … není atraktivní cesta (?)

Stres jako způsob zvyšování odolnosti vůči stresu

- Přiměřená dávka (např. oxidačního) stresu zvyšuje odolnost vůči dalšímu stresu
  (…*co tě nezabije, to tě posílí*…)
  – Mechanismus: např. indukce exprese heat shock proteinů (chaperonů)… stresová reakce
- Příklad: produkce ROS ve svalové tkáni při fyzické aktivitě

http://www.calpoly.edu/~lcimarel/know.htm

Dieta bohatá na ovoce a zeleninu (optim. 5x 80 g denně) je spojena s nižším rizikem kardiovaskulárních chorob, diabetu a některých typů rakoviny (plíce, ústa/hltan)