

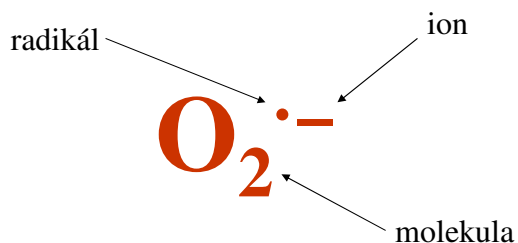
Reaktivní formy kyslíku v lidském těle

Antioxidační ochrana

MUDr. Jan Pláteník, Ph.D.
Ústav lékařské biochemie a
laboratorní diagnostiky 1.LF UK

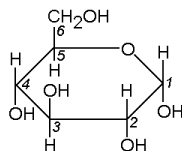
Co je volný radikál ?

- molekula, atom, nebo ion schopný
samostatné existence, který obsahuje alespoň
jeden nepárový elektron



K čemu vlastně potřebujeme kyslík?

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



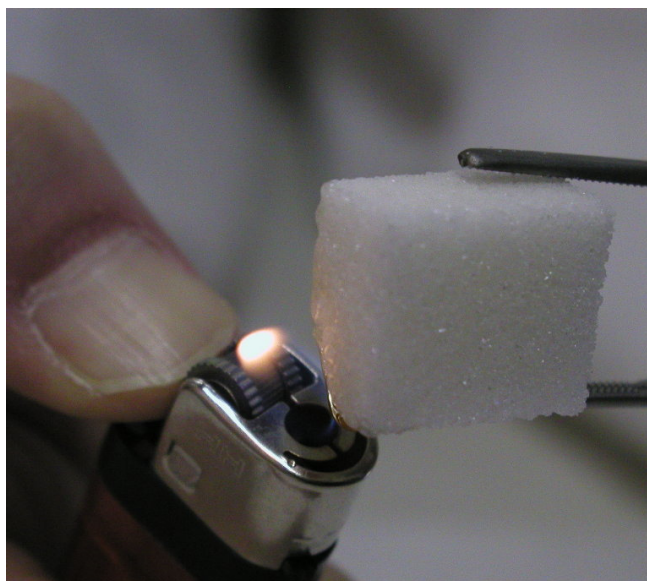
Př. Glukosa:

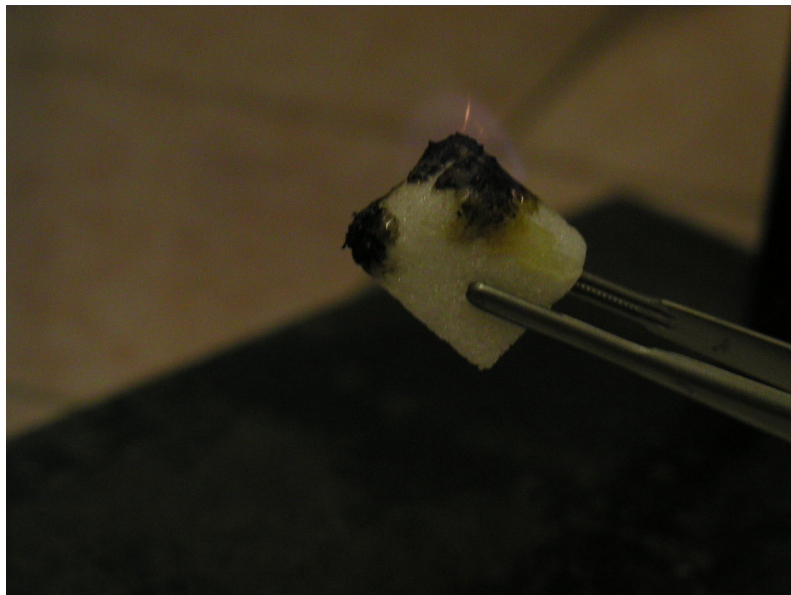
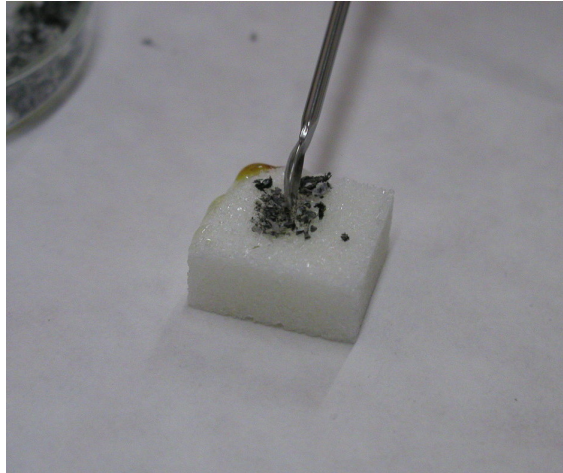


$$\Delta G^\circ = -2820 \text{ kJ/mol (180 g glukosy)}$$

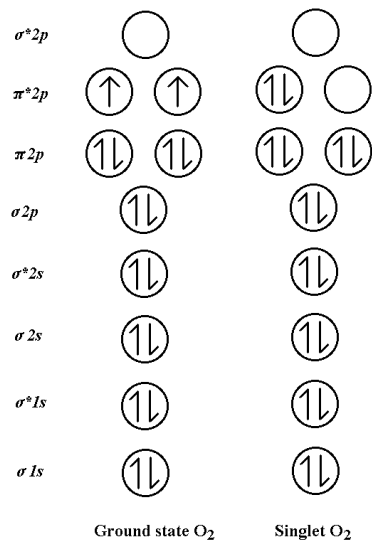
Reaktivitu kyslíku lze navíc regulovat katalýzou přechodnými kovy (železo, měď)

Hoří cukr ?

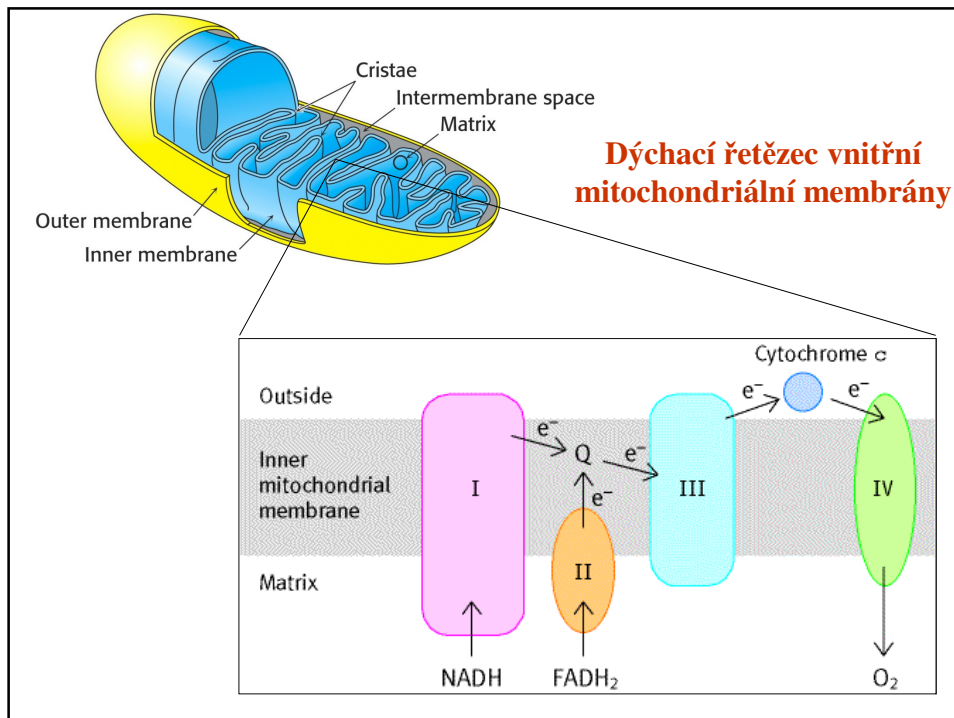




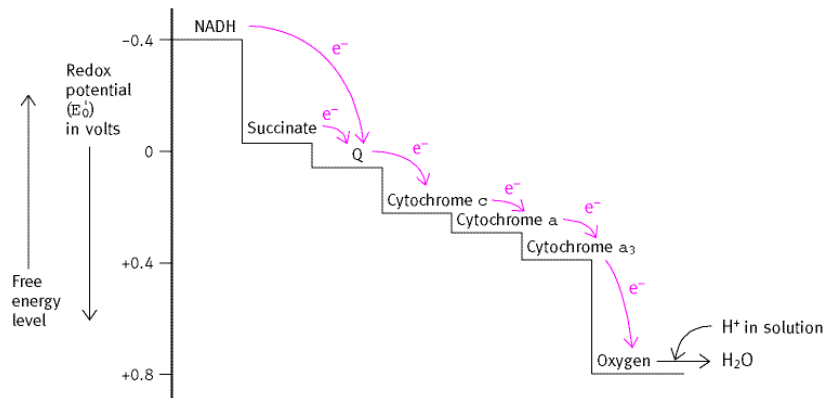
Spinová restrikce kyslíku



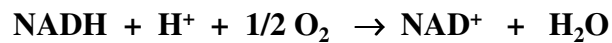
- Normální (triplet) O_2 je biradikál, s vysokou afinitou k elektronům
- Ale příjem elektronu vyžaduje aby jeden ze stávajících nepárových elektronů změnil svůj spin, což je relativně pomalý proces.
- Bez této restrikce bychom v kyslíkaté atmosféře planety okamžitě shořeli.
- Singletový O_2 je excitovaná, vysoce reaktivní forma kyslíku.



Dýchací řetězec: Elektrony proudí po spádu redoxního potenciálu a končí na kyslíku

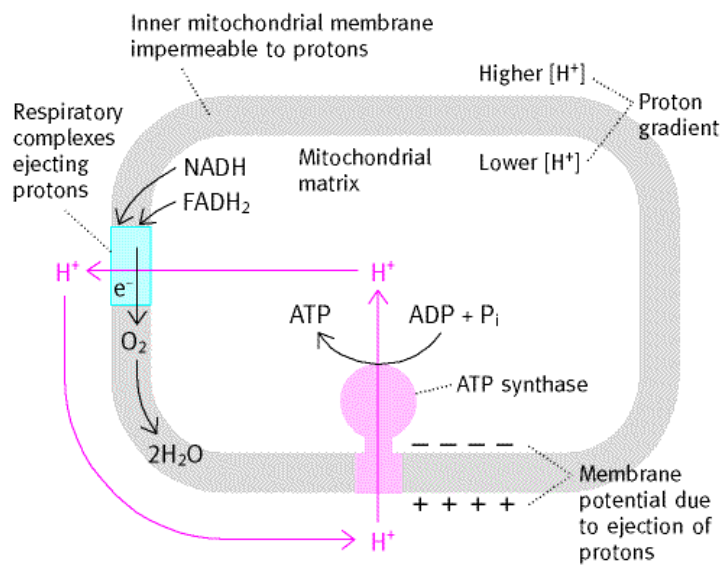


celková reakce:

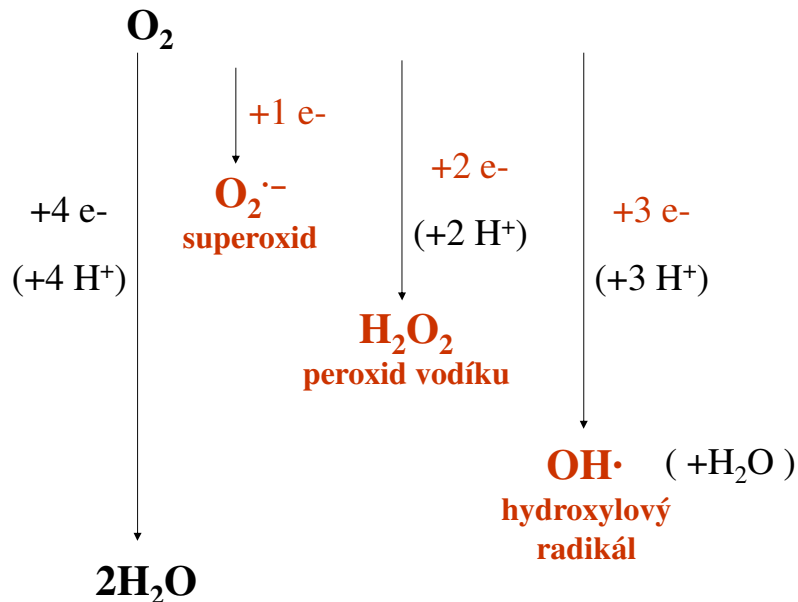


$$\Delta G^{\circ'} = -219.25 \text{ kJ mol}^{-1}$$

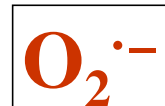
Zároveň s proudem elektronů se pumpují protony a vzniklý protonový gradient pak pohání syntézu ATP



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



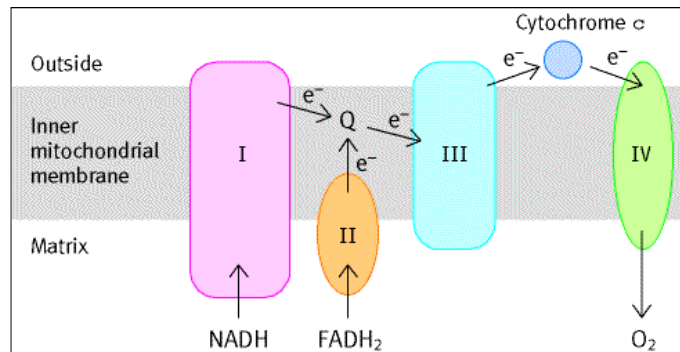
Superoxid



• Zdroje v těle:

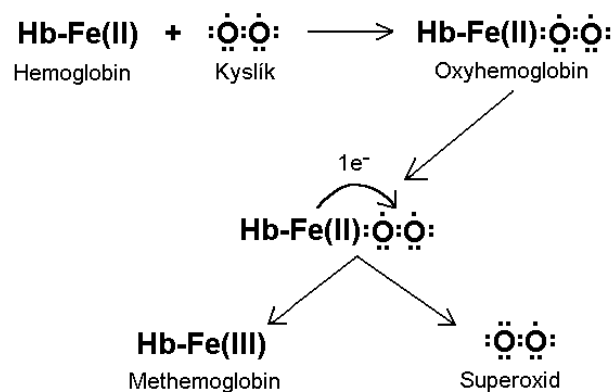
- Únik elektronů na kyslík
 - Dýchací řetězec v mitochondriích
 - Jiné podobné redoxní systémy, např. mikrosomální cytochrom P450 monooxygenasa
- NAD(P)H Oxidasa:
 - Fagocyty ("respiratory burst")
 - Nefagocytární buňky
- Některé enzymy:
 - Xanthinoxidasa
 - Cyklooxygenasa
 - Lipoxigenasa
- Reakce FeII-hemoglobinu s kyslíkem
- Autooxidace (reakce s kyslíkem) různých látek (askorbát, glutathion a jiné thiohy, katecholaminy)

Produkce superoxidu v dýchacím řetězci



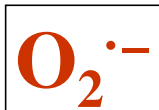
- 1-2 % z celkové spotřeby O_2 dle měření in vitro (v těle určitě méně)
- Únik elektronů z redoxních center komplexů I a III, především ze semiubichinonu

Vznik superoxidu z oxyhemoglobinu



Štípek S et al.: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. Grada Publishing, Praha, 2000.

Superoxid

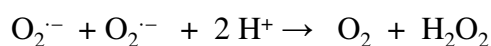


- **Vlastnosti:**

- Nepříliš reaktivní, oxidační i redukční činidlo
- Omezená možnost průchodu přes membrány (jen skrz aniontové kanály nebo ve své protonované formě)
- Uvolňuje železo z Fe-S clusterů

- **Osud:**

- **Dismutace:**



- **Reakce s oxidem dusnatým:**

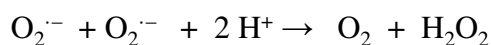


Peroxid vodíku



- **Tvorba v těle:**

- Dismutace superoxidu (spontánní nebo katalyzovaná superoxiddismutase)



- Přímo činností některých enzymů:

- Xanthinoxidasa
- Monoaminoxidasa (MAO)

Peroxid vodíku

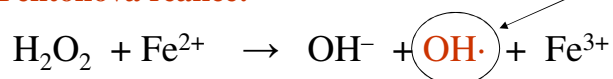


- **Vlastnosti:**

- Není radikál
- Volně prochází skrz biologické membrány
- Sám o sobě celkem nereaktivní
- Ale rychle reaguje s redukovanými přechodnými kovy jako železo a měď (Fentonova reakce)

- **Osud:**

– **Fentonova reakce:** hydroxylový radikál



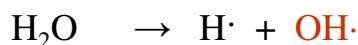
– **Bezpečné odstranění** glutathionperoxidasou, peroxiredoxinem nebo katalasou

Hydroxylový radikál



- **Vznik v těle:**

– Ionizační záření:

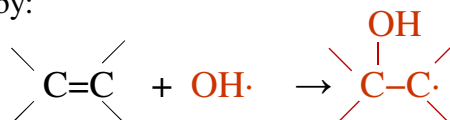


– Fentonova reakce:



- **Vlastnosti:**

- Extrémně reaktivní.
- Odnětí vodíku: $\text{R-H} + \text{OH}\cdot \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{R}\cdot$
- Adice na dvojné vazby:



Reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species, ROS)

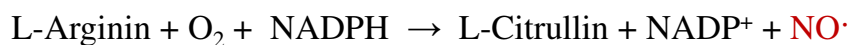
- Radikály:
 - Superoxid, $O_2^{\cdot-}$
 - Hydroperoxyl, $HO_2^{\cdot}$
 - Hydroxylový radikál, $OH^{\cdot}$
 - Peroxyl, $ROO^{\cdot}$
 - Alkoxyl, $RO^{\cdot}$
- Ne-radikály:
 - Peroxid vodíku, H_2O_2
 - Kyselina chlorná, $HClO$
 - Ozón, O_3
 - Singletový kyslík, 1O_2

Oxid dusnatý

NO[•]

• *Vznik v těle:*

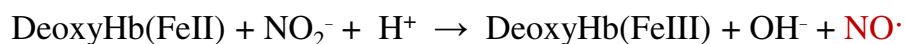
– **Aerobně:** NO syntasová reakce:



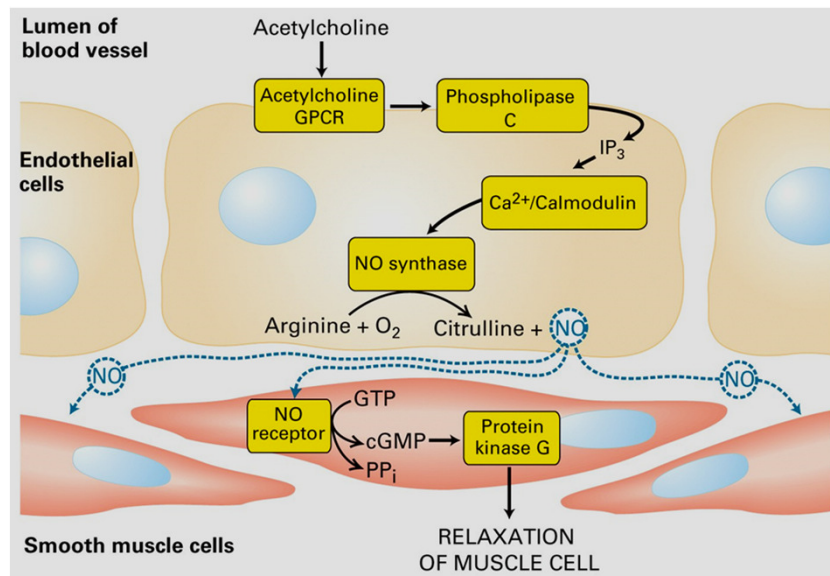
- Tři různé NO synthasy:

- NOS I (neuronální, konstitutivní)
- NOS II (fagocyty, indukibilní)
- NOS III (endoteliální, konstitutivní)

– **Hypoxie:** Redukce dusitanů katalyzovaná hemoglobinem a myoglobinem:



Oxid dusnatý (NO) působí relaxaci hladkého svalstva cévní stěny:

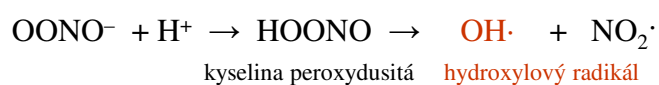


Oxid dusnatý

NO[•]

• Vlastnosti:

- Plynný radikál
- Reakce s hemovým železem guanylátcyklasy (...fyziologické účinky)
- Reakce s oxyhemoglobinem na dusičnan (...inaktivace)
- Reakce se sulfhydrylovou skupinou glutathionu atd. na nitrosothiol R-S-N=O (...transport/skladování)
- Reakce se superoxidem na peroxynitrit a případně hydroxylový radikál (...toxicita):

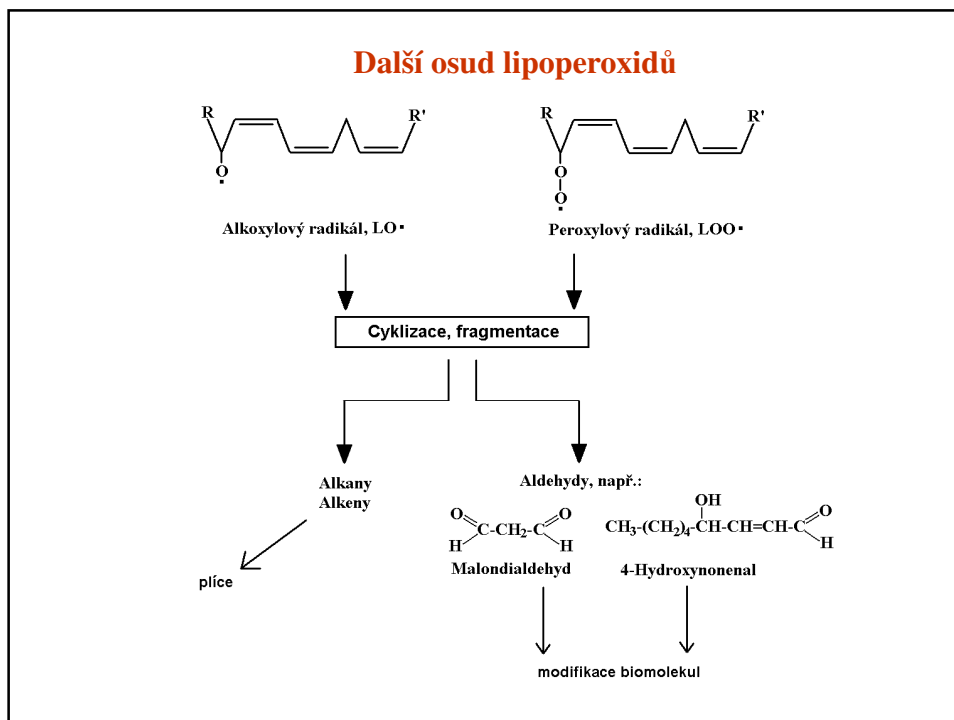
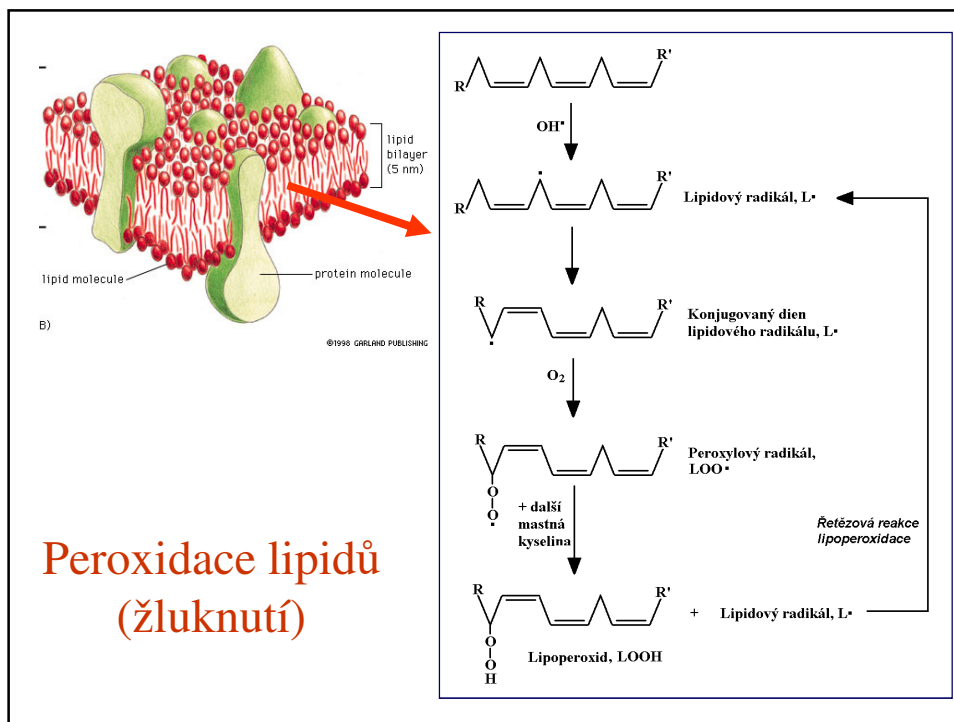


Reaktivní formy dusíku (Reactive Nitrogen Species, RNS)

- Radikály:
 - Oxid dusnatý, $\text{NO}\cdot$
 - Oxid dusičitý, $\text{NO}_2\cdot$
- Ne-radikály:
 - Nitrosonium, NO^+
 - Nitroxyl, NO^-
 - Kyselina dusitá, HNO_2
 - Oxid dusitý, N_2O_3
 - Oxid dusičitý, N_2O_4
 - Nitronium, NO_2^+
 - Peroxynitrit, ONOO^-
 - Alkylperoxynitrit, ROONO

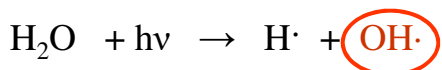
Oxidační poškození biomolekul

- **Lipidy:** peroxidace polynenasycených mastných kyselin v membránách
- **Proteiny:** oxidace $-\text{SH}$, karbonylace $-\text{NH}_2$, hydroxylace/nitrosylace aromatických AMK, cross-linking, degradace
- **Nukleové kyseliny:** hydroxylace basí, zlomy v řetězci DNA ... mutace, kancerogenese



Ionizační záření:

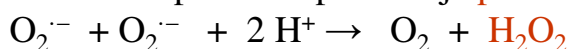
Hydroxylový radikál vzniká ionizací vody:



Reaktivní formy kyslíku v organismu:

Jednoelektronovou redukcí kyslíku (mitochondrie, NADPH oxidasa) vzniká **superoxid** $\text{O}_2^{\cdot-}$

Dismutace superoxidu produkuje **peroxid vodíku**:



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



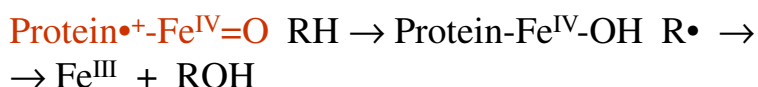
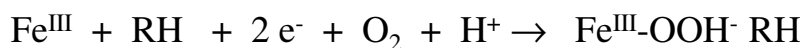
Kde jsou RONS prospěšné: I. Aktivní centra enzymů

• Monooxygenasy (cytochromy P450):

- Detoxikace xenobiotik, syntéza steroidních hormonů a žlučových kyselin, NO synthasy



Mechanismus: **oxidace ferrylovým intermediátem**



Kde jsou RONS prospěšné:

I. Aktivní centra enzymů

- Monooxygenasy (cytochromy P450)
- Ribonukleotidreduktasa (...syntéza DNA)
- Syntéza prostanoidů (enzymatická lipoperoxidace)
- **Užitečné hemové peroxidasy:**
 - Thyreoperoxidasa ve štítné žláze:
 $I^- + H_2O_2 + 2H^+ \rightarrow I^+ + 2H_2O$, I^+ joduje thyreoglobulin
 - Myeloperoxidasa neutrofilů
 - Laktoperoxidasa v mléku, hlenu dýchacích cest a ve slinách:
 $SCN^- + H_2O_2 \rightarrow OSCN^- + H_2O$
(hypothiokyanát $OSCN^-$ je baktericidní)

Kde jsou RONS prospěšné:

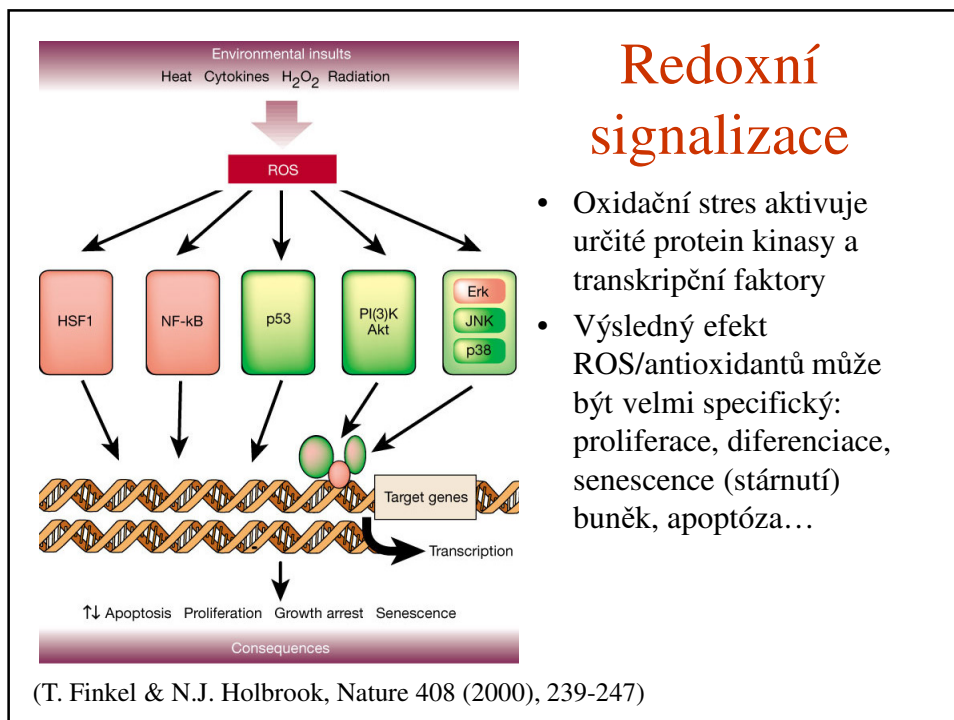
II. Signalizace

- Např. oxid dusnatý, NO:
 - relaxace hladkého svalstva cévní stěny, gastrointestinálního traktu, corpus cavernosum penis,
 - neurotransmitter/ neuromodulátor v CNS, funkce v synaptické plasticitě, učení a paměti,
 - inhibice adheze a agregace trombocytů,
 - inhibice adheze leukocytů
 - (atd.)



Koncept redoxní signalizace

- H_2O_2 jako intracelulární signální molekula
- Redoxní prostředí buňky - přibližně dáno poměrem GSH/GSSG a NADH/NAD
- Redoxní sensory na proteinech:
 - kritické -SH skupiny
 - Fe-S centra
- Cíle redoxní signalizace:
 - transkripční faktory
 - proteinkinasy a fosfatasy



Kde jsou RONS prospěšné: III. Fagocytóza

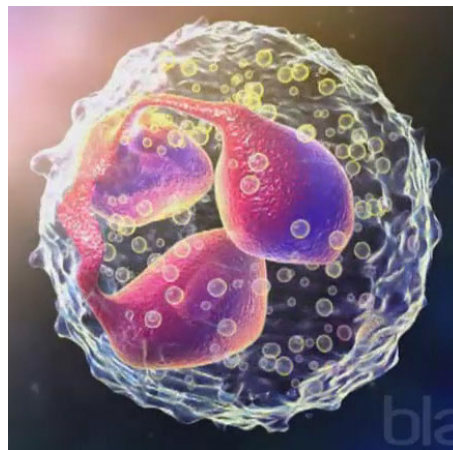
- Neutrofily, eosinofily, monocyty, makrofágy, mikroglie
- Často je potřeba cílovou částici označit (opsonizace)
- Úkolem fagocytujících buněk je cílovou částici:
 - Rozpoznat
 - Pohltit
 - Zabít
 - Strávit



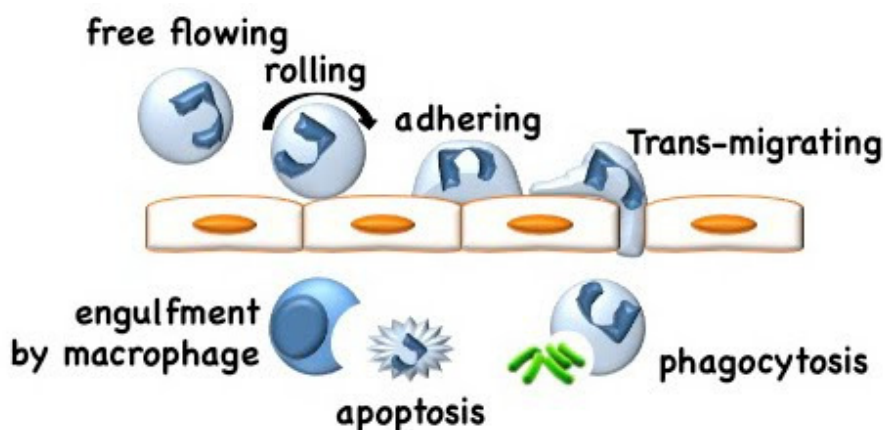
© 1998 Garland Publishing

Neutrofilní granulocyt (polymorfonukleár)

- Segmentované jádro
- Primární (azurofilní) granula: lysozym, defensiny, myeloperoxidasa, proteasy
- Specifická (sekundární) granula: NADPH oxidasa, kobalofilin, laktoferrin, lysozym, kolagenasa
- Terciární granula: gelatinasa a další enzymy



Obr.: <http://blausen.com>



Obr.: http://walchecklab.umn.edu/_/rsrc/1417821135388/research-interests/neutrophil-recruitment

Aktivace fagocytující buňky: Respirační vzplanutí

- Náhlé zvýšení spotřeby kyslíku (pro produkci superoxidu, ne respiraci)
- Náhlé zvýšení spotřeby glukosy (pro pentosový cyklus – dodává NADPH pro NADPH oxidasu)

NADPH oxidasa

- Membránový enzym produkující superoxid vně nebo do fagosomu.
- Katalyzuje reakci:
$$\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{H}^+ + 2\text{O}_2^{\cdot-}$$
- V klidu latentní, sestavuje se z 6 podjednotek na buněčné membráně při aktivaci fagocytu.
- Nezbytná pro schopnost zabít některé pohlcené bakterie (hereditární deficit: **chronická septická granulomatosa**)
- Také na endotelu a mnoha jiných nefagocytárních buňkách

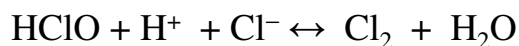
Myeloperoxidasa

- 2 – 5% všech proteinů v neutrofilech
- Hemoprotein zodpovědný za zelenou barvu hnisu
- Nespecifická peroxidasa, v těle katalyzuje především reakci:
$$\text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{HClO} + \text{H}_2\text{O}$$
- Deficit u lidí častý (1 na 2000-4000) a nemá závažné příznaky

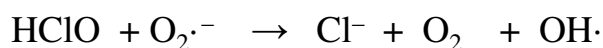
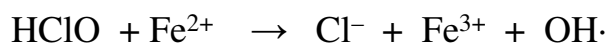
Kyselina chlorná



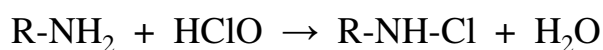
- Slabá kyselina ($\text{pK}_a = 7.5$; $\text{HClO} \leftrightarrow \text{ClO}^- + \text{H}^+$)
- V kyselém prostředí se snadno rozkládá na plynný chlor:



- Silné oxidační činidlo ($2\text{HClO} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Cl}_2$)
- Reakce s Fe^{2+} nebo superoxidem generuje hydroxylový radikál:



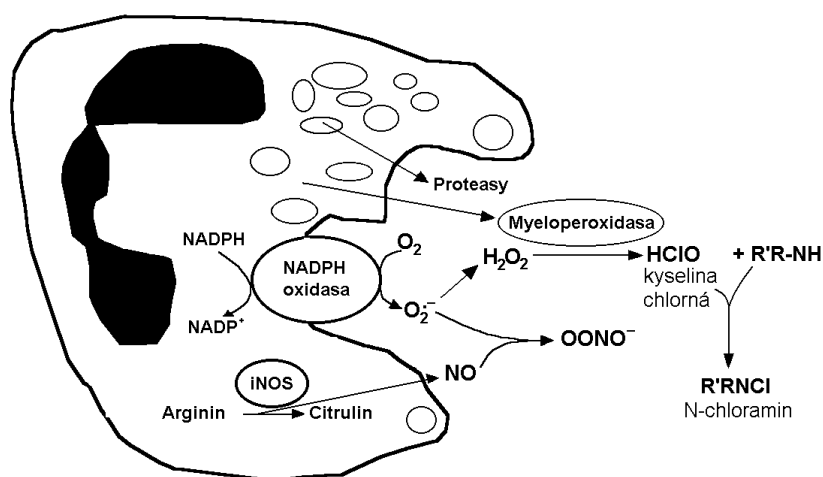
- S organickými aminy poskytuje chloraminy:



Další zbraně neutrofilů

- Velmi účinné proteolytické enzymy: elastasa, kolagenasa, kathepsin G, gelatinasa ad.
- Lysozym: štěpí polysacharid bakteriální stěny Gram+ mikrobů
- Laktoferrin: bere bakteriím železo
- Defensiny: kationické proteiny tvořící kanály v bakteriální membráně
- NETs (neutrophil extracellular traps): vlákna z DNA a serinových proteas, tvořená extracelulárně

Synergie mezi generátory radikálů a dalšími zbraněmi:
např. HClO inhibuje α 1-antitrypsin



RONS ve výbroji fagocytů

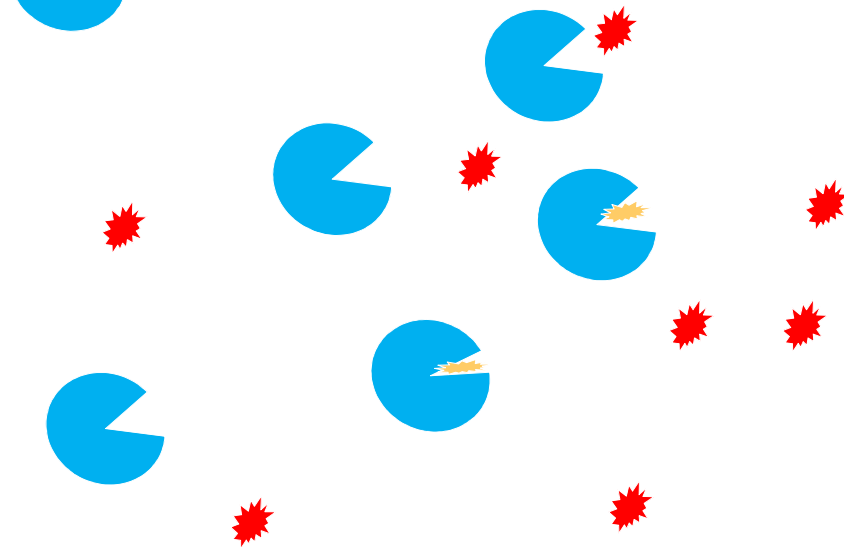
iNOS je důležitá pro makrofágy, ale nevýznamná u lidských neutrofilů. Naopak makrofágy nemají myeloperoxidasu

Antioxidační ochrana

- prevence tvorby ROS/RNS (regulace produkujících enzymů, sekvestrace přechodných kovů)
- vychytávání, lapání a zhášení radikálů
- reparační systémy (fosfolipasy, proteasom, enzymy opravující DNA)

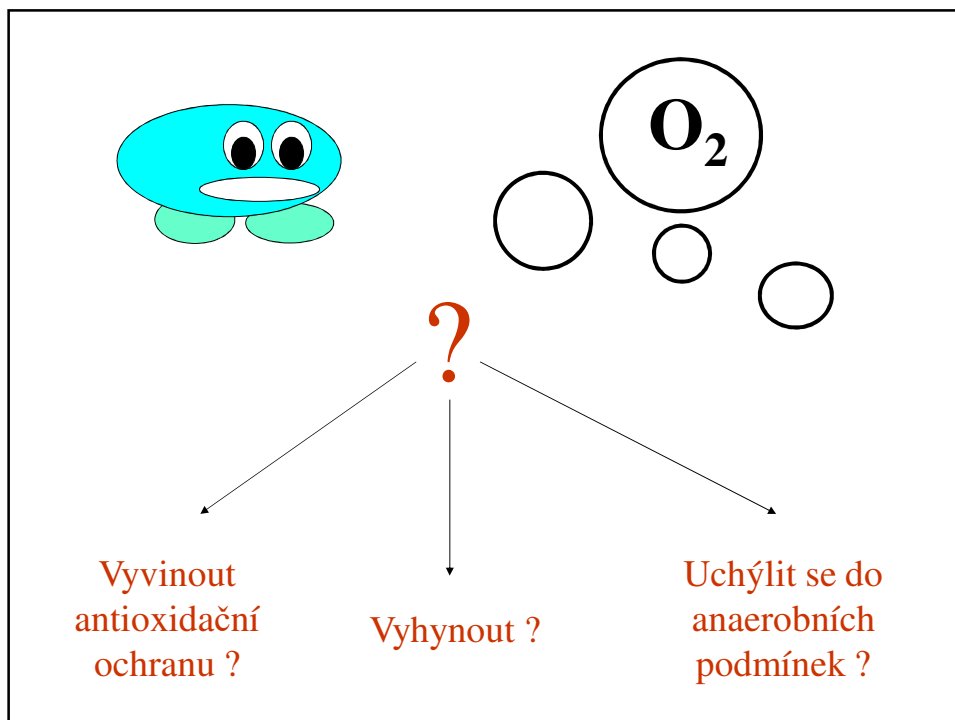
Nezbytná pro život v přítomnosti kyslíku

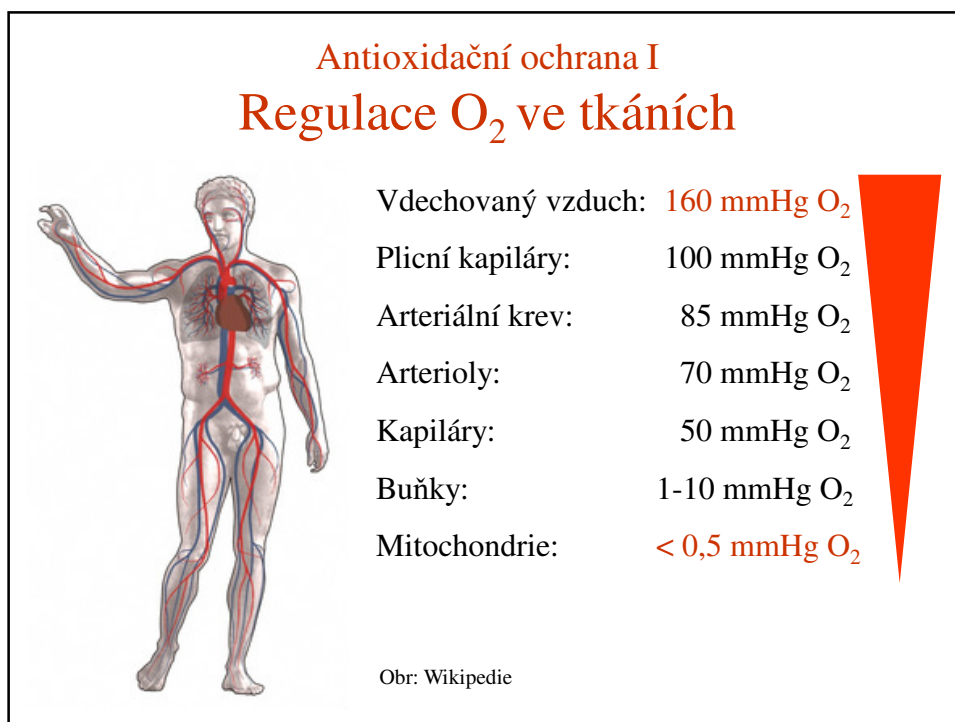
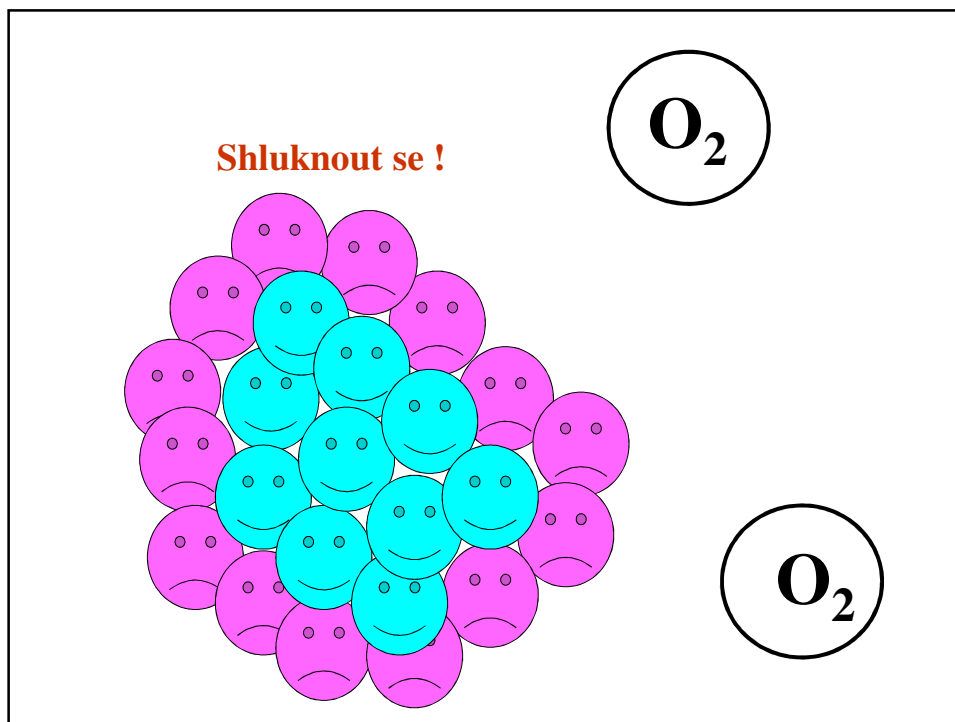
...ale takhle jednoduché to není!



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)





Antioxidační ochrana II

Antioxidační enzymy

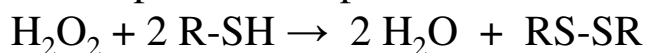
- Superoxiddismutasa:



- Katalasa:

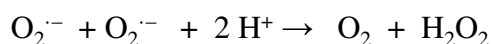


- Glutathionperoxidasa, peroxiredoxin:



Superoxiddismutasa (SOD)

- Katalyzuje dismutaci superoxidu:



- Naprosto nezbytná pro život s kyslíkem
- SOD1: Cu+Zn (cytosol)
- SOD2:
 - Mn (mitochondriální matrix)
 - Fe (prokaryotická)
- EC-SOD: extracelulární, Cu+Zn,
 - MW 135000, vazba na heparansulfát na povrchu cévního lumen

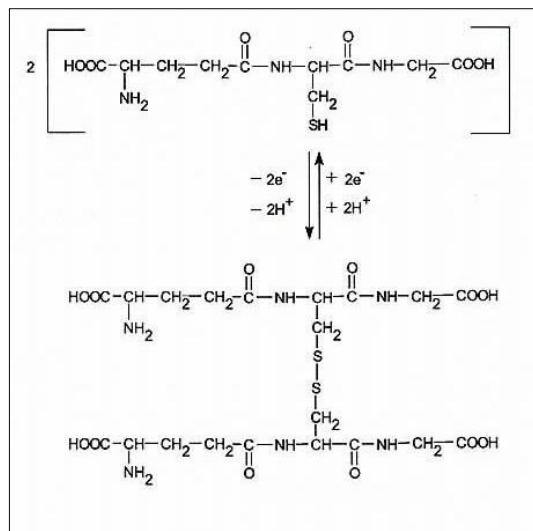
Glutathionperoxidasy (GPX)

- Redukce peroxidů spojená s oxidací glutathionu:

$$2 \text{ GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GS-SG} + 2 \text{H}_2\text{O}$$
 (glutathion je následně regenerován glutathionreduktasami)
- Obsahují selenocystein v aktivním místě
- Cytosolová glutathionperoxidasa (GPX1):
 - redukuje H_2O_2 a LOOH po uvolnění z fosfolipidů
- Fosfolipidhydroperoxid-GSH-peroxidasa (GPX4):
 - redukuje LOOH i v membránách

Glutathion (GSH/GSSG)

- tripeptid, v každé buňce 1-10 mM
- udržuje redukční prostředí ICT
- substrát pro GPX, GST
- neenzymové reakce s ROS... produkty oxidace GSH jsou toxické pro buňku
- při oxidačním stresu export GSSG z buňky



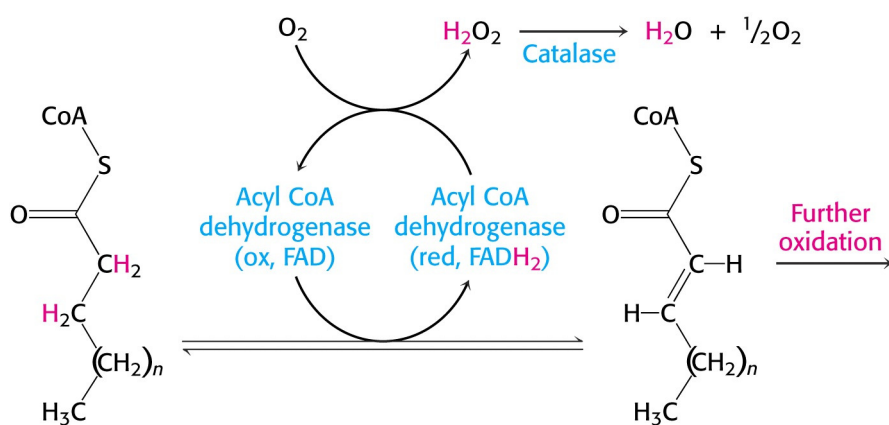
Katalasa

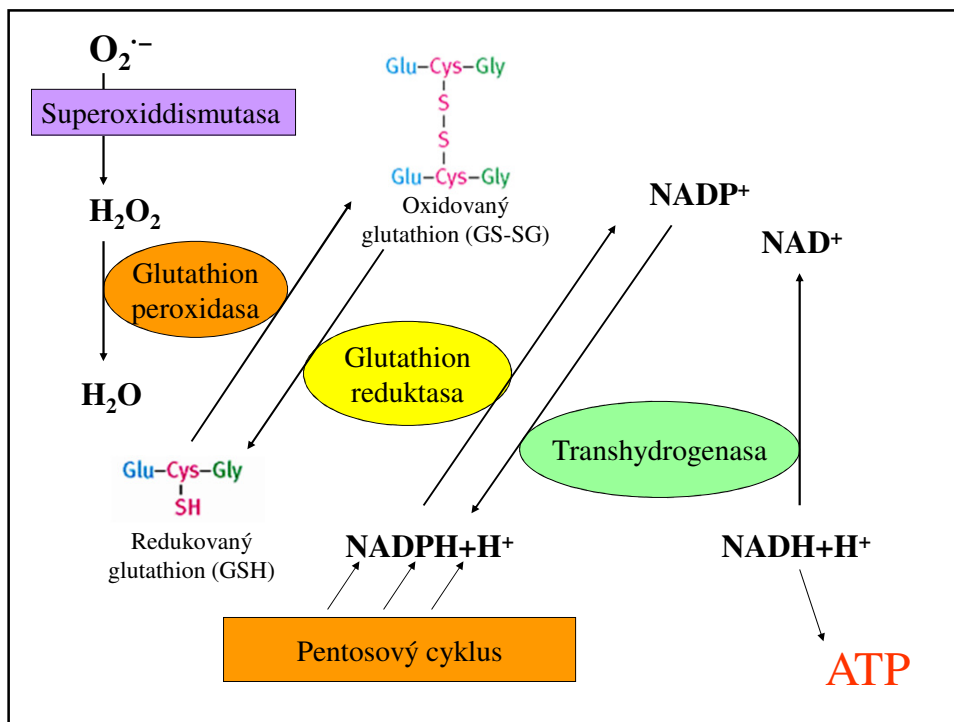
- Tetramer, každá podjednotka obsahuje hem s Fe
- Dismutace peroxidu vodíku:

$$2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$$
- Peroxisomy, erytrocyty
- Těž peroxidasaová aktivita:

$$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{ROOH} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{ROH} + \text{O}_2$$
 (ve srovnání s GPX nevýznamná)

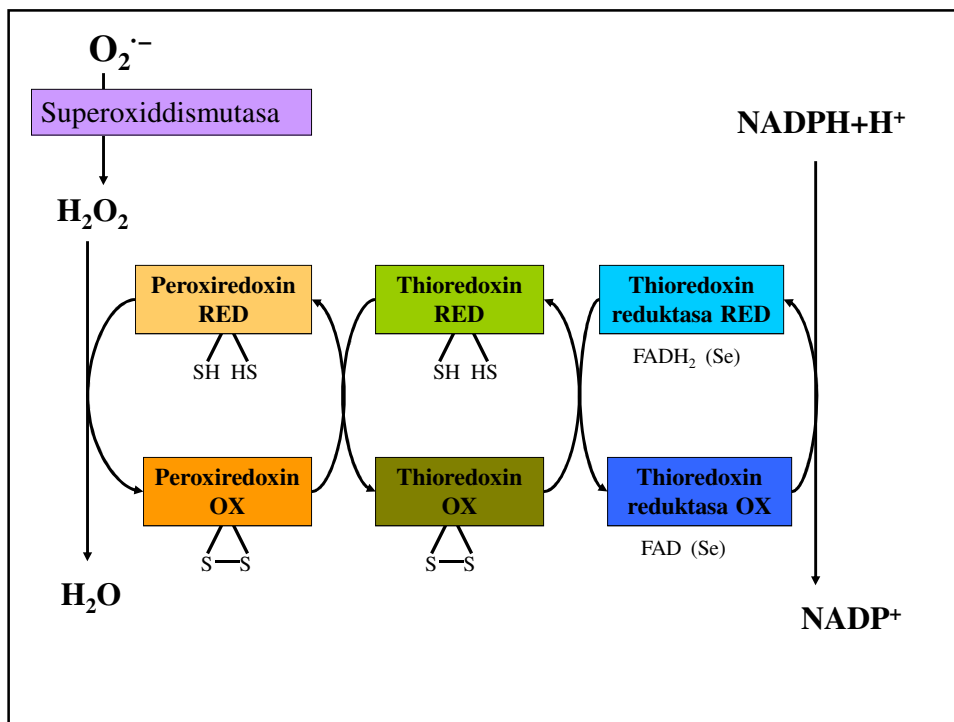
Oxidace dlouhých mastných kyselin v peroxisomech:





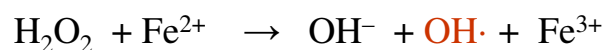
Peroxiredoxin/Thioredoxin

- Nověji objevený antioxidační systém, pro odstraňování peroxidu vodíku v těle je důležitější než GPX



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:



$\swarrow$ $\searrow$ $\swarrow$ $\searrow$
 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

Superoxid Peroxid ICT Fe/Cu	Superoxid Peroxid ECT Fe/Cu
Superoxiddismutasy Peroxiredoxiny Glutathionperoxidasy Katalasa	<i>Antioxidační enzymy & hladiny glutathionu velmi nízké</i>
<i>Přebytek Fe skladován ve feritinu, ale nějaké redoxně aktivní Fe přítomno</i>	Sekvestrace železa a mědi: - transferin, laktoferin - hemopexin - haptoglobin - ceruloplasmin (ferroxidasa) - Cu vázáno na albumin

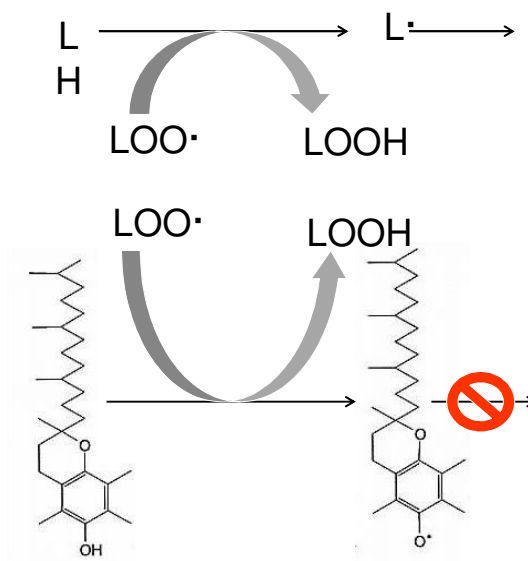
Antioxidační ochrana IV

Nízkomolekulární antioxidační substráty

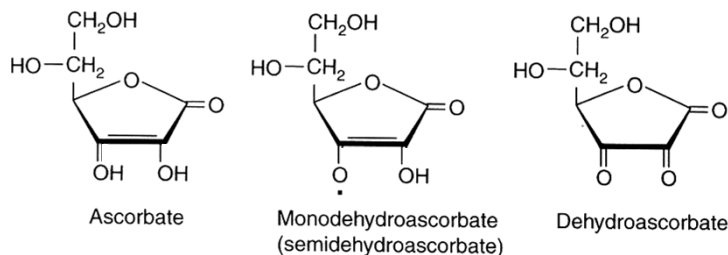
- **THIOLY:**
 - Glutathion
 - Metalothionein
 - Peroxiredoxin
- **DALŠÍ ENDOGENNÍ METABOLITY:**
 - Bilirubin
 - Kyselina močová
 - Kyselina lipoová
- **Z DIETY:**
 - Askorbát (Vitamín C)
 - α -Tokoferol (Vitamín E)
 - Karotenoidy
 - Rostlinné fenoly

Vitamín E

- skupina 8 látek, v těle je nejúčinnější α -tokoferol
- antioxidant membrán (lipofilní)
- “chain-breaking” ... zastavuje řetězovou reakci lipoperoxidace



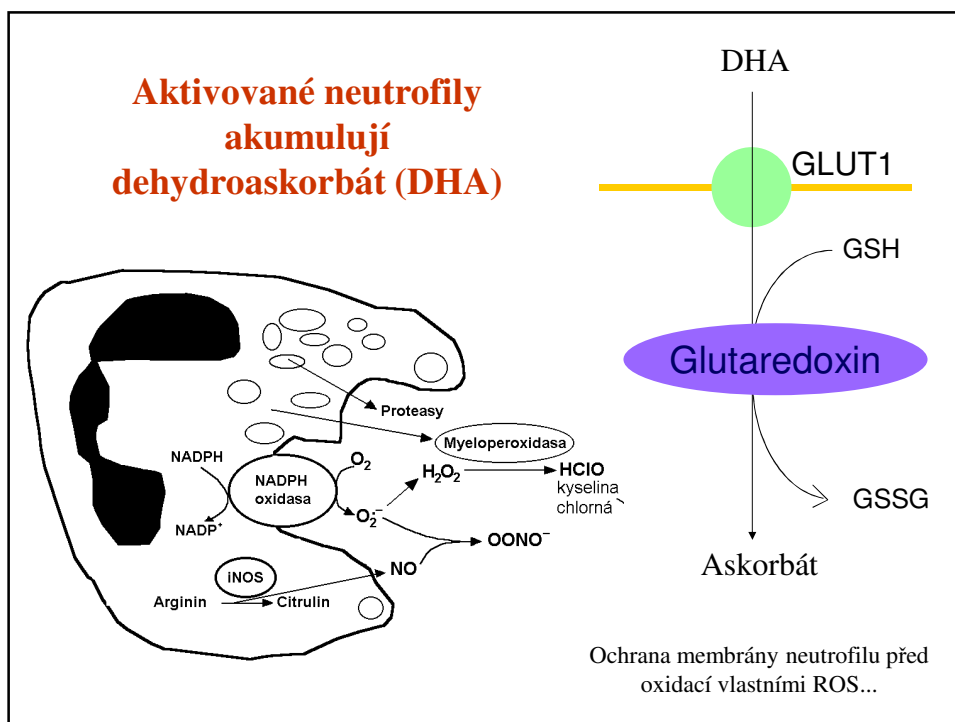
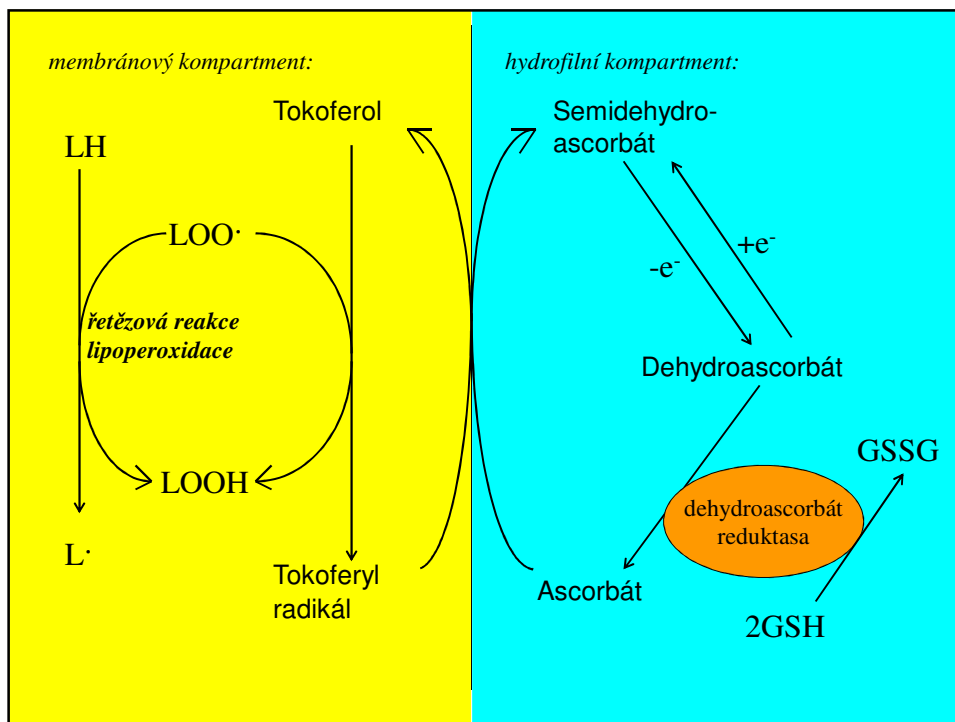
Askorbát (Vitamín C)



- Redoxně aktivní derivát sacharidů
- U většiny živočichů syntetizován z kyseliny glukuronové
- Pro člověka, primáty, netopýry a morčata vitamín
- Deficit způsobuje onemocnění zvané kurděje (skorbut)

Askorbát v těle:

- Hlavní funkce je pro-oxidační: 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)
- Reduktant pro železo: podpora jeho vstřebávání
- Při poruše sekvestrace Fe (hemochromatosa) může být nebezpečný pro-oxidant (?)
- Denní potřeba 70-100 mg, vyšší dávky p.o. se vyloučí močí (renální práh cca 200 mg/24 hod.)



Selen:

- Stopový prvek (denní potřeba 55 µg), možnost deficitu i intoxikace
- Součást řady antioxidačních enzymů (glutathionperoxidasy, thioredoxinreduktasy) a také např. 5'-dejdasy

β-karoten (provitamín A):

- Antioxidant pouze v kůži
- Prekursor pro biosyntézu:
 - Retinal ... vidění
 - Kyselina retinová ...regulátor genové exprese, růstu a diferenciace buněk

Antioxidační ochrana V Stresová reakce

Oxidace nebo nitrosylace kritických -SH skupin



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

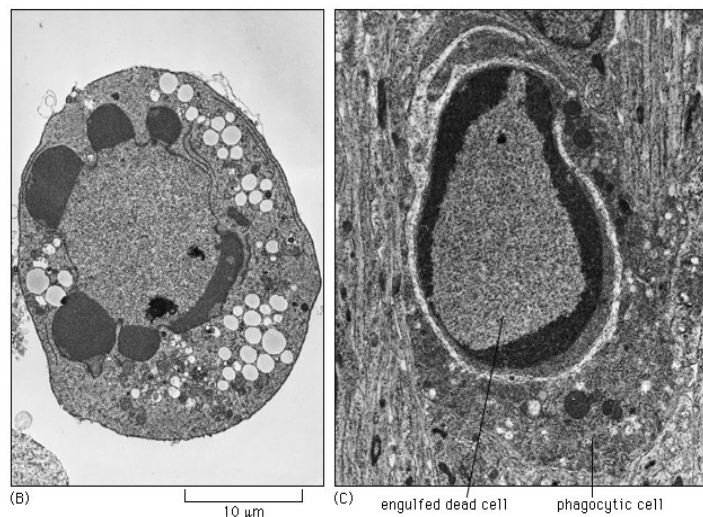


Indukce genové exprese:

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

... → vyšší odolnost vůči
dalšímu oxidačnímu stresu

Poslední úroveň antioxidační ochrany: apoptosa



Oxidační stres

- Hladina reaktivních forem kyslíku je udržována v určitých mezích mechanismy antioxidační ochrany
- Oxidační stres nastává při vychýlení této rovnováhy směrem k oxidaci

Volné radikály v patogenezi lidských onemocnění

- **Příčina chorobného stavu, např.:**
 - kancerogeneze v důsledku expozice ionizačnímu záření
 - retinopatie novorozenců (fibroplasia retrolentalis)
- **Významný podíl na patogenezi, např.:**
 - ateroskleróza
 - diabetes mellitus
 - hypertenze
 - některé typy rakoviny
 - mozkové trauma/hemoragie
 - ischemicko-reperfusní poškození srdce a jiných orgánů
 - Parkinsonova nemoc
 - Alzheimerova nemoc
 - stárnutí
- **Jen epifenomenon** (obecný důsledek tkáňového poškození)