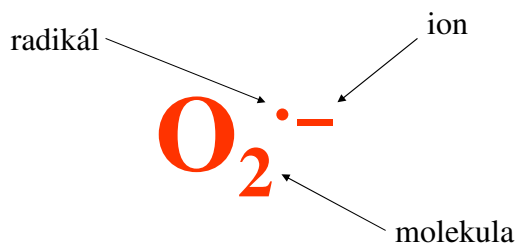


Reaktivní formy kyslíku v lidském těle Výzbroj fagocytů

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

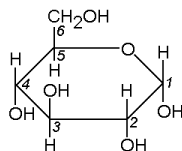
Co je volný radikál ?

- 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



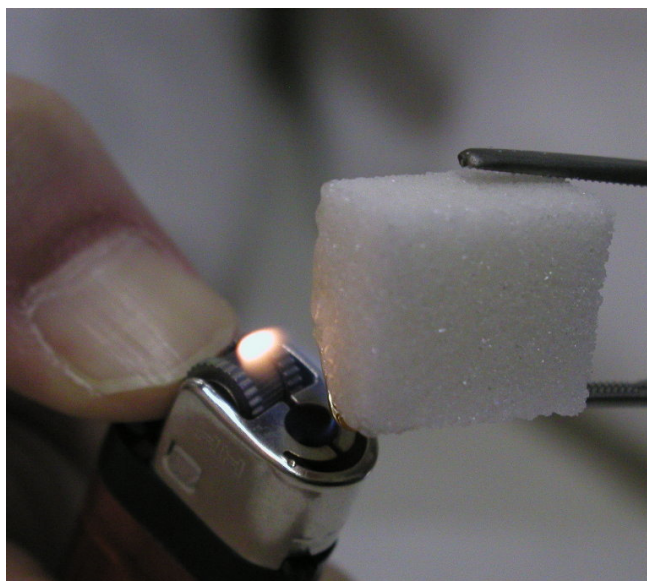
Př. Glukosa:

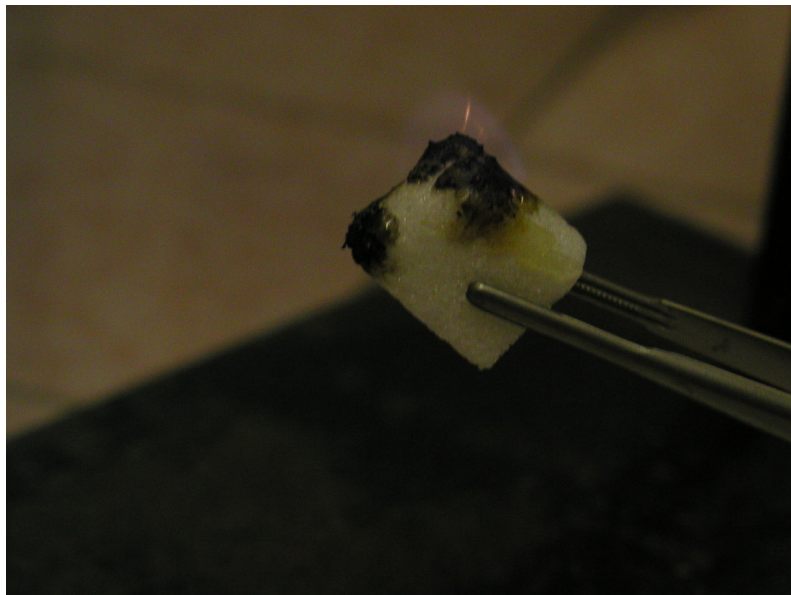
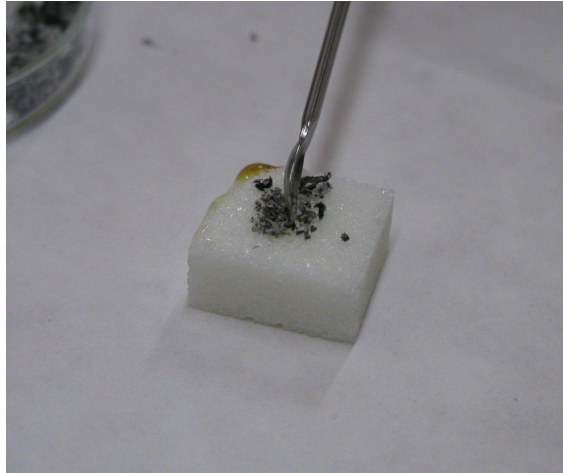


$$\Delta G^\circ = -2820 \text{ kJ/mol (180 g glukosy)}$$

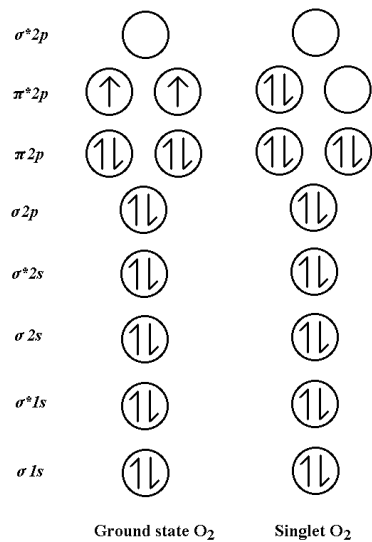
Reaktivitu kyslíku lze navíc regulovat katalýzou přechodnými kovy (železo, měď)

Hoří cukr ?

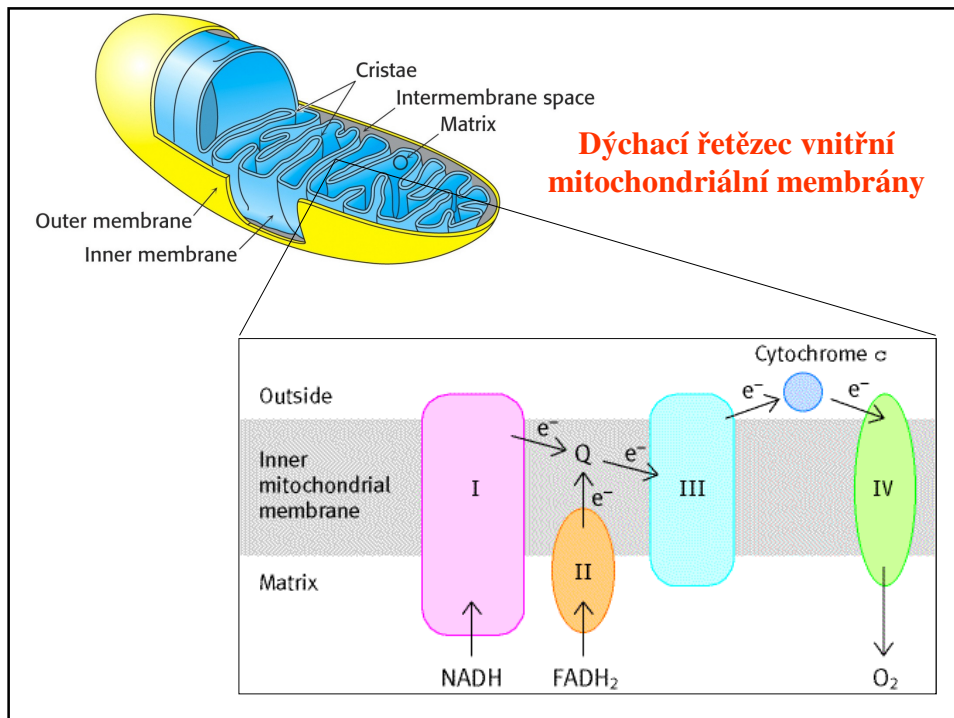




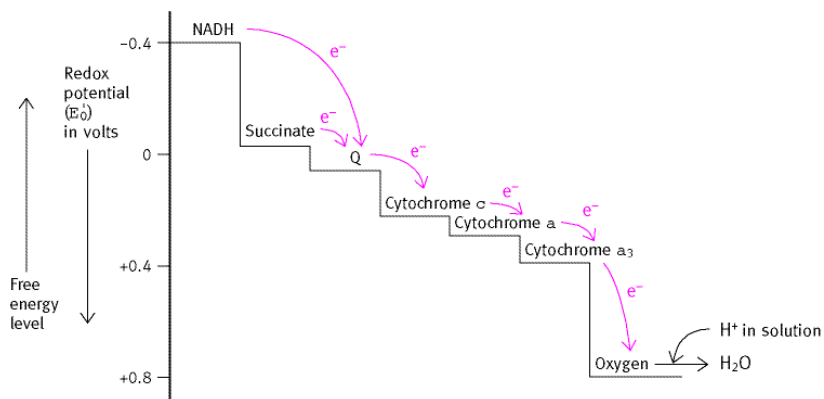
Spinová restrikce kyslíku



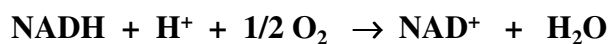
- Normální (triplet) O_2 je biradikál, s vysokou afinitou k elektronům
- Ale příjem elektronu vyžaduje aby jeden ze stávajících nepárových elektronů změnil svůj spin, což je relativně pomalý proces.
- Bez této restrikce bychom v kyslíkaté atmosféře planety okamžitě shořeli.
- Singletový O_2 je excitovaná,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



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

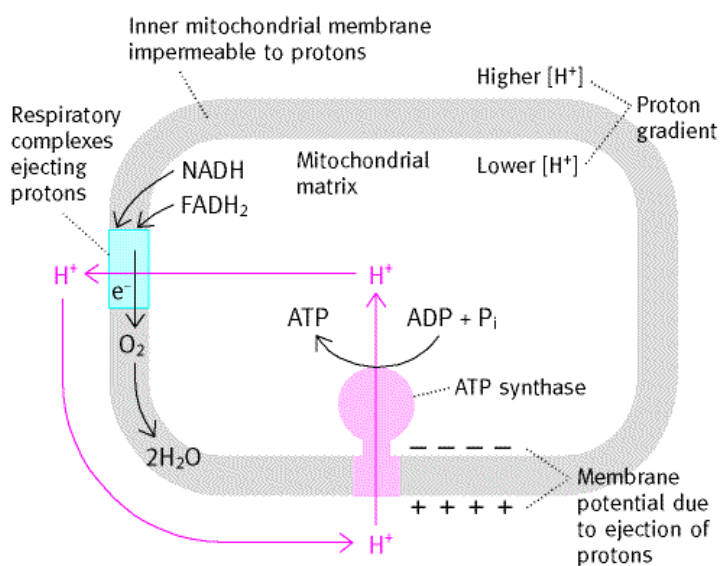


celková reakce:

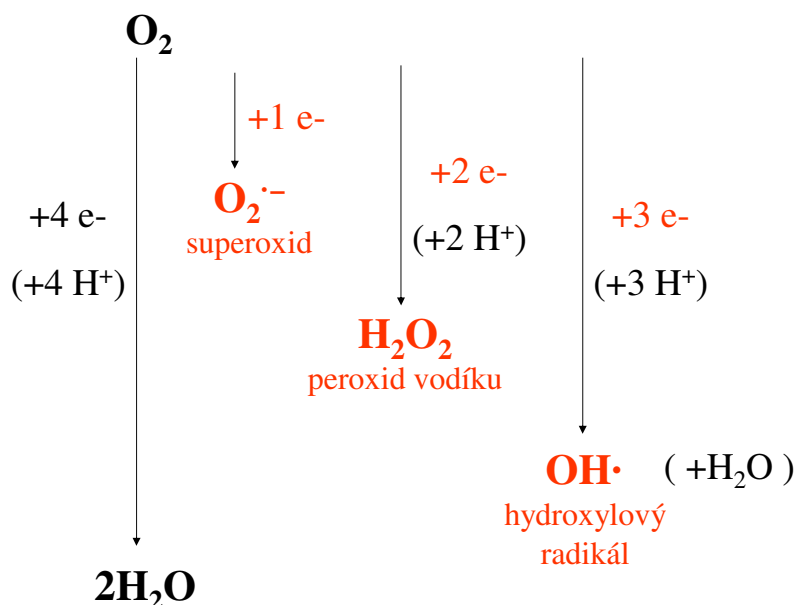


$$\Delta G^{\circ'} = -219.25 \text{ kJ mol}^{-1}$$

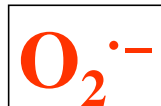
Zároveň s proudem elektronů se pumpují protony a vzniklý protonový gradient pak pohání syntézu ATP



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



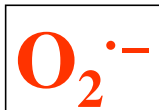
Superoxid



• 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)

Superoxid

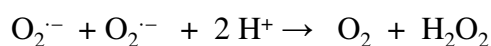


- **Vlastnosti:**

- 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:**

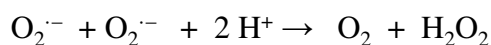


Peroxid vodíku



- **Tvorba v těle:**

- Dismutace superoxidu (spontánní nebo katalyzovaná superoxiddismutase)



- Přímo činností některých enzymů:

- Xanthinoxidasa
- Monoaminoxidasa (MAO)

Peroxid vodíku

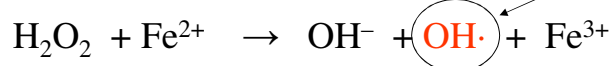


- **Vlastnosti:**

- 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



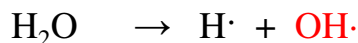
– **Bezpečné odstranění** glutathionperoxidasou, peroxiredoxinem nebo katalasou

Hydroxylový radikál



- **Vznik v těle:**

– Ionizační záření:

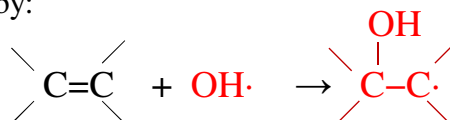


– Fentonova reakce:



- **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)

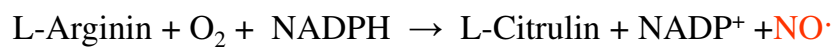
- Radikály:
 - Superoxid, $O_2 \cdot^-$
 - Hydroperoxyl, $HO_2 \cdot$
 - Hydroxylový radikál, $OH \cdot$
 - Peroxyl, $ROO \cdot$
 - Alkoxyl, $RO \cdot$
- Ne-radikály:
 - Peroxid vodíku, H_2O_2
 - Kyselina chlorná, $HClO$
 - Ozón, O_3
 - Singletový kyslík, 1O_2

Oxid dusnatý

NO $\cdot$

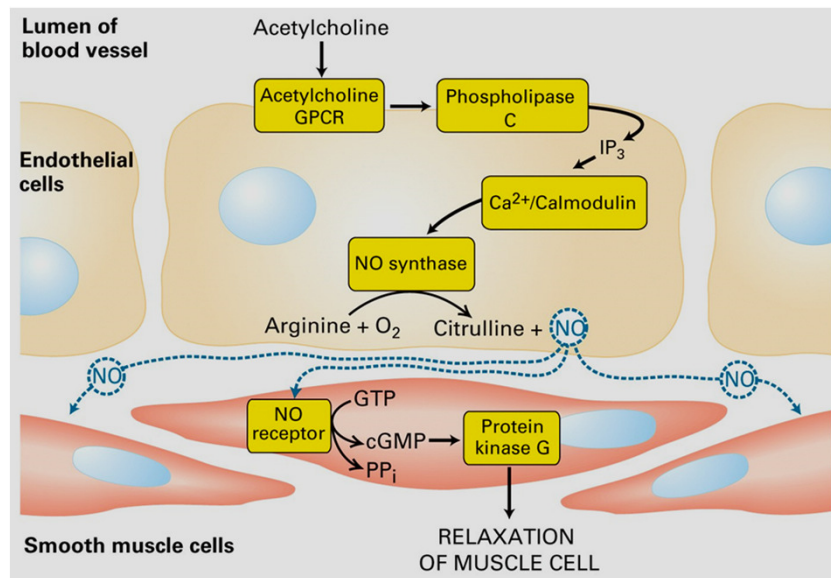
• *Vznik v těle:*

- NO synthasová reakce:



- Tři různé NO synthasy:
 - NOS I (neuronální, konstitutivní)
 - NOS II (fagocyty, inducibilní)
 - NOS III (endoteliální, konstitutivní)

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

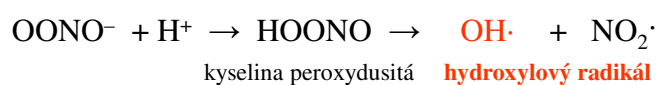


Oxid dusnatý

NO[•]

• *Vlastnosti:*

- Plynný radikál
- Reakce s hemovým železem guanylátcyklasy (...**fyziologické účinky**, relaxace hladkého svalstva atd.)
- Reakce s hemovým železem hemoglobinu (...**fyziologická inaktivace**)
- Reakce se sulfhydrylovou skupinou glutathionu atd. na nitrosothiol (...**transport NO**)
- Reakce se superoxidem na peroxynitrit a konečně hydroxylový radikál (...**toxická**):

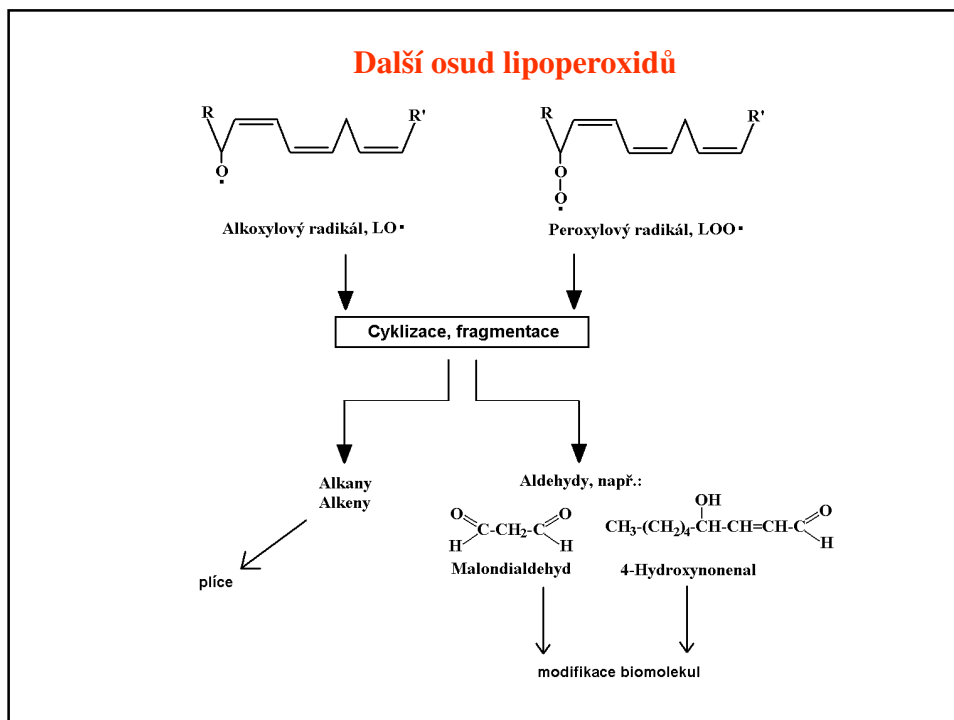
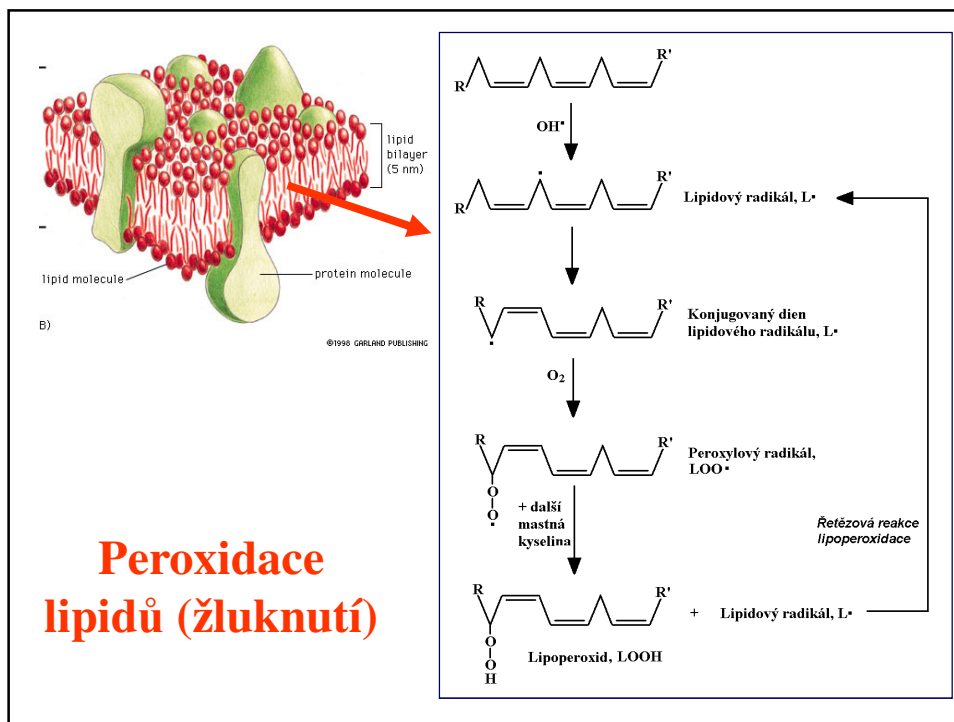


Reaktivní formy dusíku (Reactive Nitrogen Species, RNS)

- 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

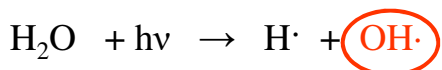
Oxidační poškození biomolekul

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



Ionizační záření:

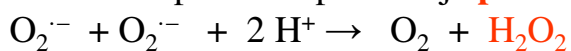
Hydroxylový radikál vzniká ionizací vody:



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)
- Ribonukleotidreduktasa (...syntéza DNA)
- Syntéza prostanoidů (enzymatická lipoperoxidace)
- Užitečné hemové peroxidasy

Kde jsou RONS prospěšné:

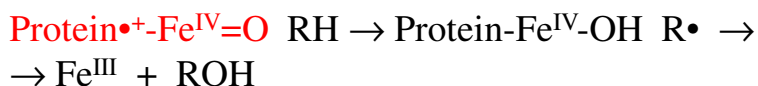
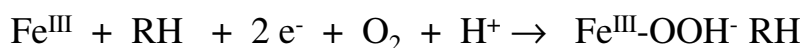
I. Aktivní centra enzymů

- **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)

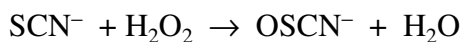
- **Užitečné hemové peroxidasy:**

- Thyreoperoxidasa ve štítné žláze:



- Myeloperoxidasa neutrofilů

- Laktoperoxidasa v mléku, hlenu dýchacích cest a ve slinách:



(hypothiokyanát OSCN^- je baktericidní)

Kde jsou RONS prospěšné:

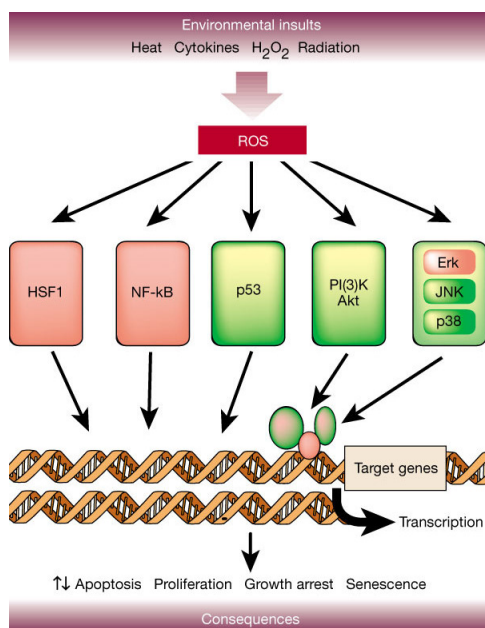
II. Signalizace

- 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

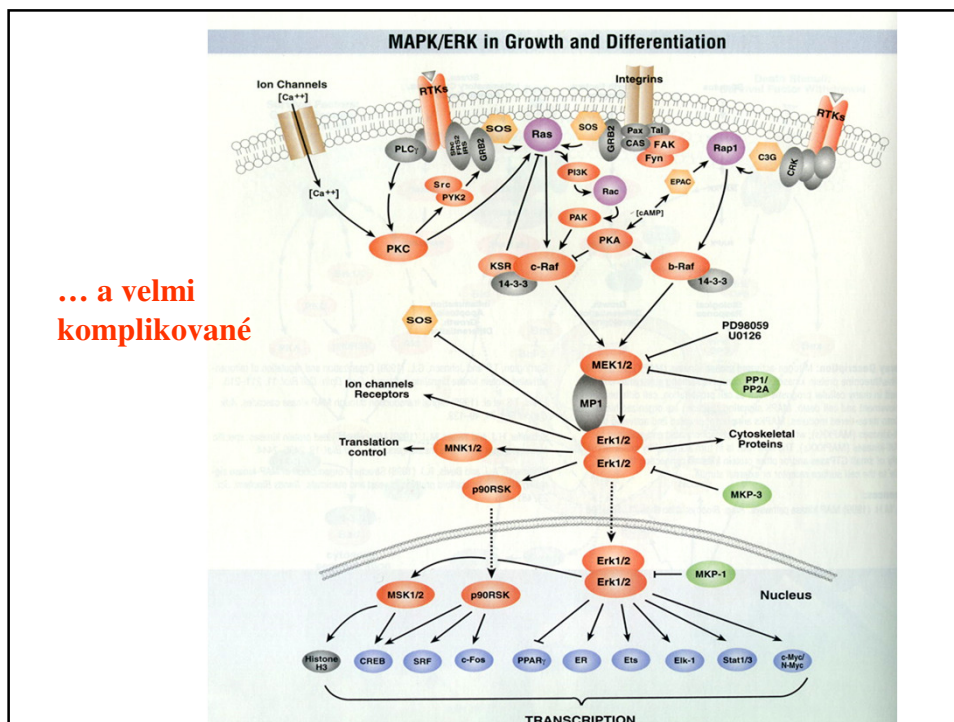
- H_2O_2 jako intracelulární signální molekula
- Redoxní prostředí buňky - přibližně dáno poměrem GSH/GSSG a NADH/NAD
- Redoxní sensory na proteinech:
 - kritické -SH skupiny
 - Fe-S centra
- Cíle redoxní signalizace:
 - transkripční faktory
 - proteinkinasy a fosfatasy



Redoxní signalizace

- Oxidační stres aktivuje určité protein kinasy a transkripční faktory
- Výsledný efekt: např. stimulace proliferace, senescence (stárnutí) buněk
- **Působení ROS/antioxidantů v buňce může být velmi specifické**

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



Kde jsou RONS prospěšné:

III. Fagocytóza

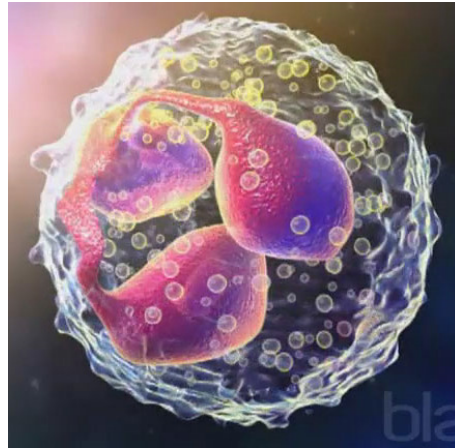
- Neutrofily, eosinofily, monocyty, makrofágy, mikroglie
- Často je potřeba cílovou částici označit (opsonizace)
- Úkolem fagocytujících buňky je cílovou částici:
 - Rozpoznat
 - Pohltit
 - Zabít
 - Strávit



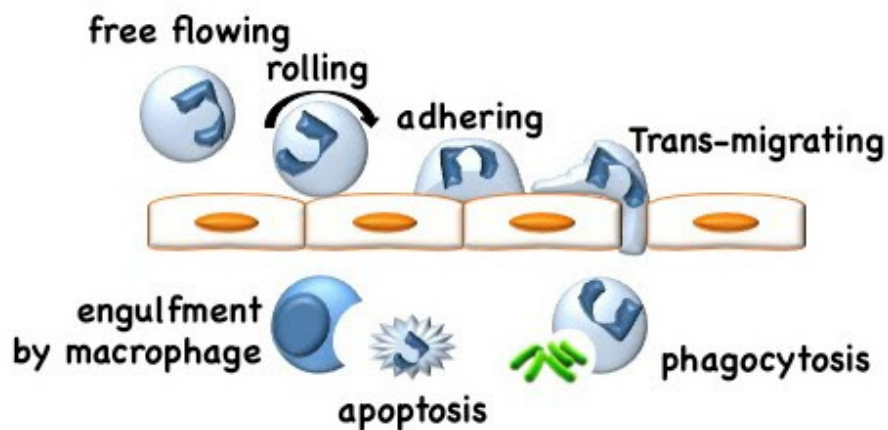
© 1998 Garland Publishing

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

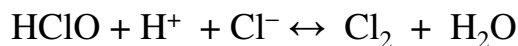
Myeloperoxidasa

- 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

HClO

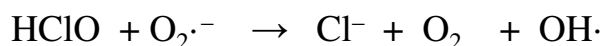
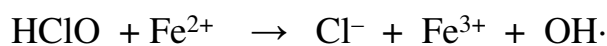
- Slabá kyselina ($\text{pK}_a = 7.5$; $\text{HClO} \leftrightarrow \text{ClO}^- + \text{H}^+$)
- V kyselém prostředí se snadno rozkládá na plynný chlor:



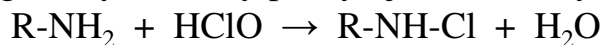
- Silné oxidační činidlo:



- Reakce s Fe^{2+} nebo superoxidem generuje hydroxylový radikál:



- S organickými aminy poskytuje chloraminy:

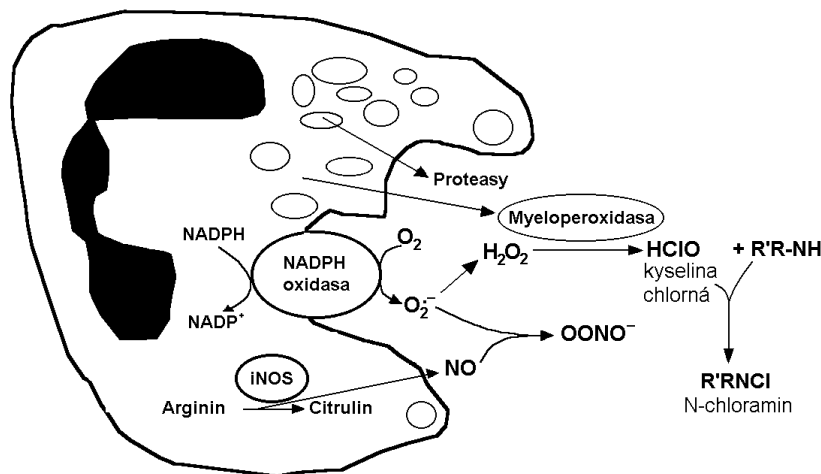


Další zbraně neutrofilů

- 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.

Leukocytární ROS v (zubní) medicíně

- Peroxid vodíku („kysličník“):
3 % H_2O_2 se užívá k dezinfekci povrchových ran,
léčba zánětů dásní
- Chlornan sodný NaClO (Savo):
Ošetřování kořenových kanálků (endodoncie)
- Chloramin-T:
Všeobecná dezinfekce nemocničních podlah...