

Oxidační stres, antioxidační ochrana

Autoři

Doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D., prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.

(bousova@faf.cuni.cz)

Katedra biochemických věd

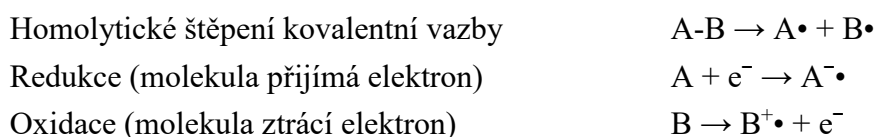
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Výzkumu volných radikálů a reaktivních forem kyslíku/dusíku, jejich vztahu k patogenezi řady onemocnění a způsobu ochrany proti jejich působení je věnováno značné úsilí a pozornost. Často je zdůrazňován právě nepříznivý účinek volných radikálů. Tyto sloučeniny, které v organismu běžně vznikají (např. při metabolických reakcích), však mají nejen značný patogenetický ale i fyziologický význam. Jsou schopné pohotově reagovat s různými biologickými strukturami (např. aminokyselinami, proteiny, mastnými kyselinami, lipidy, nukleotidy), nízkomolekulárními metabolity, koenzymy a dalšími součástmi živé hmoty. Díky tomu se staly významnými prostředníky přenosu energie a faktory imunitní ochrany. Za určitých okolností však působí jako toxické látky a jako dezinformační agenti, schopní organismus poškodit a dokonce ho i usmrtit.

Volné radikály, reaktivní formy kyslíku a dusíku

Volné radikály jsou látky (atomy, molekuly, ionty) schopné samostatné existence, které mají ve svém elektronovém obalu nepárový elektron (ev. více nepárových elektronů). Vznikají z normálních částic ztrátou elektronu (oxidací), přijetím elektronu (redukcí) či homolytickým štěpením kovalentní vazby, při kterém každý fragment získá jeden nepárový elektron. K homolytickému štěpení je třeba značné množství energie (např. ultrafialové nebo ionizační záření, teplota ~ 450-600 °C), proto vznikají volné radikály v biologických systémech většinou energeticky snadnějším způsobem (ztrátou či přijetím elektronu). Volné radikály mohou být neutrální částice, kladně nebo záporně nabitě ionty v závislosti na tom, zda počet protonů v atomovém jádře odpovídá počtu elektronů v orbitalech (neutrální částice) nebo neodpovídá (ionty). Vzorce radikálů se označují tečkou, která indikuje nepárový elektron, a vzorec je doplněn podle počtu a typu náboje znaménkem + či -, pokud je popisovaná částice zároveň iontem.





Volné radikály jsou obvykle málo stabilní a vysoce reaktivní, protože se snaží doplnit si chybějící elektron a dosáhnout tak stabilní elektronové konfigurace. Vznik radikálu může být iniciací celého řetězce dalších reakcí. Chybějící elektron získává volný radikál vytržením z „normální“ molekuly, ze které se tak stává radikál a radikálová reakce se tím propaguje do okolí. Radikálová reakce je ukončena (terminace) buď reakcí dvou radikálů, nebo reakcí s látkou, jejíž radikál je stabilní a může existovat delší dobu (např. α -tokoferol či jiné nízkomolekulární antioxidanty).

Pojem **reaktivní formy kyslíku (ROS)** či **reaktivní formy dusíku (RNS)** je souhrnným označením pro volné radikály a sloučeniny spojené s metabolismem kyslíku nebo dusíku, které nemají nepárový elektron (např. peroxid vodíku či peroxynitrit). V Tab. 1 jsou uvedeny příklady nejvýznamnějších RONS spolu s jejich řádovým biologickým poločasem.

Tab. 1. Reaktivní formy kyslíku a dusíku s řádovým poločasem některých z nich (upraveno ze Štípek 2000)

| Reaktivní formy kyslíku (ROS) | | | | | |
|-------------------------------|-------------------------------|-----|-------------------------|-------------------------------|-----|
| Volné radikály | | | Neradikálové sloučeniny | | |
| Hydroxylový radikál | HO• | ns* | Peroxid vodíku | H ₂ O ₂ | min |
| Superoxid anion radikál | O ₂ ⁻ • | μs | Chlornan | ClO ⁻ | min |
| Peroxylový radikál | ROO• | s | Kyselina chlorná | HOCl | min |
| Alkoxylový radikál | RO• | μs | Ozón | O ₃ | |
| Hydroperoxylový radikál | HO ₂ • | s | Singletový kyslík | ¹ O ₂ | μs |
| Reaktivní formy dusíku (RNS) | | | | | |
| Volné radikály | | | Neradikálové sloučeniny | | |
| Oxid dusnatý | NO• | s | Peroxynitrit | OONO ⁻ | ms |
| Oxid dusičitý | NO ₂ • | | Alkylperoxynitrit | ROONO ⁻ | |
| | | | Nitrosyl | NO ⁺ | |
| | | | Kyselina dusitá | HNO ₂ | |

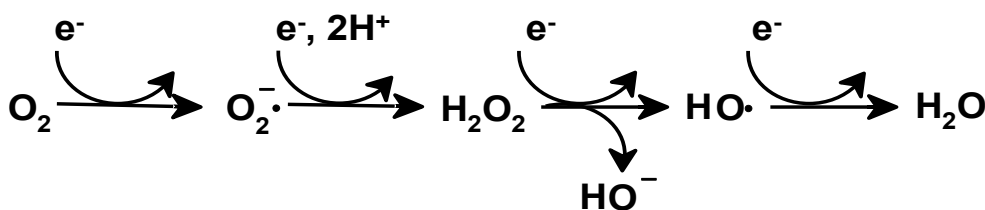
*řádový biologický poločas dané RONS v živém organismu



Reaktivní formy kyslíku

V organismu se nejčastěji setkáváme s volnými radikály odvozenými od kyslíku. Běžnou dvouatomovou molekulu kyslíku (též tripletový dioxygen) můžeme rovněž zařadit mezi radikály, protože ve dvou molekulových orbitalech obsahuje po jednom nepárovém elektronu (je to biradikál), které mají stejné spinové kvantové číslo. Ve srovnání s jinými radikály však reaguje s biomolekulami poměrně pomalu, protože příjem elektronu vyžaduje, aby jeden ze stávajících nepárových elektronů změnil svůj spin (rotaci), což je relativně pomalý proces, a překonal tak tzv. **spinovou restrikcí**. Tato „drobnost“ umožnila živým organismům přežít v kyslíkové atmosféře planety Země, jinak by doslova shořeli. Molekulární kyslík se však může snadno změnit v reaktivnější formu tím, že mu dodáme energii nebo jinak porušíme spinovou restrikcí (změnou počtu elektronů).

Při postupné redukci molekuly kyslíku čtyřmi elektrony vznikají postupně další ROS a nakonec dvě molekuly vody (Obr. 1). Přijetím prvního elektronu vzniká **superoxid anion radikál** ($O_2^{\cdot-}$), což je vůbec nejhojnější volný radikál v živých organismech. Superoxid se přijetím dalšího elektronu redukuje na **peroxid vodíku** (H_2O_2), který se v přítomnosti dalšího elektronu rozpadá na vodu (disociovaná forma hydroxidový ion HO^-) a **hydroxylový radikál** ($HO\cdot$), což je vůbec nejreaktivnější volný radikál v živých organismech s extrémně krátkým biologickým poločasem. Poslední elektron redukuje hydroxylový radikál na molekulu vody (opět ve formě HO^-). Popsaná reakce probíhá např. v aktivním centru cytochrom-c-oxidasy (enzym dýchacího řetězce mitochondrií) a umožňuje finální transformaci energie chemických vazeb živin do ATP.



Obr. 1. Postupná čtyřelektronová redukce molekuly kyslíku

Superoxid má oxidační i redukční vlastnosti a podléhá dismutaci, při které jedna jeho molekula poskytuje elektron druhé, takže $O_2^{\cdot-}$ se vlastně zároveň oxiduje i redukuje. Produkty reakce jsou kyslík a peroxid vodíku. Přestože reakce probíhá ve vodném prostředí velkou rychlostí, v organismu je ještě o čtyři řády urychlena enzymem superoxidodismutase.



Z patobiochemického hlediska stojí za pozornost též **singletový kyslík** ($^1\text{O}_2$), který vzniká excitací jednoho elektronu tripletového kyslíku do stavu s vyšší energetickou hladinou, která je provázena změnou spinu tohoto elektronu. Tato změna uspořádání elektronů, díky které je odstraněna spinová restrikce, způsobí značný nárůst reaktivity. V organismu vzniká $^1\text{O}_2$ při spontánní dismutaci superoxidu (jedna molekula superoxidu se oxiduje na kyslík a druhá se zároveň redukuje na peroxid vodíku) a po absorpci světla některými pigmenty (tzv. nepřímé **fotosenzitizační reakce**). Takovými pigmenty (fotosenzitizéry) jsou např. retinal, bilirubin či porfyriny, které jsou po absorpci světla o vhodné vlnové délce excitovány a mohou přenést excitační energii na sousední molekulu kyslíku, ze které se stává $^1\text{O}_2$, a fotosenzitizér se vrací do základního energetického stavu. Singletový kyslík pak napadá buď molekulu fotosenzitizéru a/nebo jinou přítomnou molekulu, čímž se změní její struktura a vlastnosti (fotodynamický účinek). Některá onemocnění (např. porfyrie) jsou provázána excesivním vznikem $^1\text{O}_2$. Fotodynamické reakce se však používají i k terapii, např. novorozenecké žloutenky, psoriázy či k fotodynamické terapii solidních tumorů.

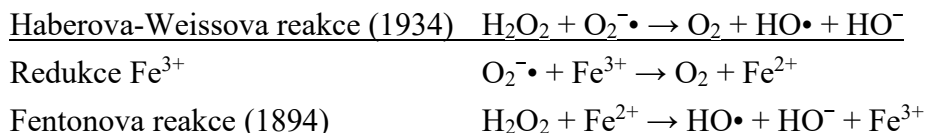
Vznik **kyseliny chlorné** (HOCl) je katalyzován enzymem **myeloperoksidase**, která je přítomná v azurofilních granulech neutrofilních granulocytů (PMN). Jedná se o silný oxidant, který PMN používají jako mikrobicidní prostředek. Při reakci HOCl s aminoskupinami proteinů vznikají chloraminy, které jsou stabilnější, ale mají slabší mikrobicidní účinky než HOCl.

Peroxylové ($\text{ROO}\cdot$) a **alkoxylové radikály** ($\text{RO}\cdot$), které vznikají např. během peroxidace lipidů, jsou dobrými oxidačními činidly. Alkoxylové radikály se však v organismu rychle přeměňují na jiné typy radikálů.

Vzájemné přeměny ROS jsou katalyzovány **ionty přechodných kovů**, zejména ionty železa a mědi. Jedná se o prvky z první řady d-prvků (železo, měď, mangan), které mají neúplně obsazenou předposlední valenční slupku elektronového obalu, proto velmi ochotně reagují s ROS. Většina jejich biologických účinků (benefičních i škodlivých) souvisí právě se schopností přijímat a darovat elektrony. V organismu jsou vázány v depotních formách (např. transportní a skladovací proteiny transferin, feritin, ceruloplasmin), kde jsou udržovány v redoxně inaktivním stavu. Příkladem vzájemné přeměny ROS jsou Haberova-Weissova reakce a Fentonova reakce. **Haberova-Weissova reakce** spontánně bez katalýzy neprobíhá, protože $\text{O}_2^{\cdot-}$ ve vodném prostředí spontánně nereaguje ani s H_2O_2 , ani s organickými hydroperoxydy. V přítomnosti železa však reakce H_2O_2 a $\text{O}_2^{\cdot-}$ probíhá velmi snadno, a to ve dvou krocích. Nejprve $\text{O}_2^{\cdot-}$ zredukuje železité ionty na železnaté a ty pak pohotově redukují H_2O_2 na $\text{HO}\cdot$,



který je vysoce toxický. Poslední reakce je známá jako **Fentonova reakce** a jedná se o dlouho známý děj a také nejčastější způsob vzniku toxického HO•.



Reaktivní formy dusíku

Molekulu **oxidu dusnatého** (NO) můžeme zařadit mezi volné radikály, protože obsahuje jeden nepárový elektron. Biologický význam NO je obrovský – je součástí procesů nespecifické imunity, působí jako neurotransmitter v CNS a VNS a ovlivňuje cévní tonus a tím reguluje krevní tlak (léčebné využití při Angině pectoris – NO se uvolňuje z nitroglycerinu či amylnitritu). Přestože se jedná o jednoduchou molekulu, syntetizuje se složitým mechanismem z aminokyseliny L-argininu za katalýzy enzymu **NO-synthasy** (NOS). Existují čtyři typy NOS, které se liší regulací exprese (konstitutivní x indukovatelná), závislostí na Ca^{2+} a primárním místem izolace (endoteliální x neuronální x makrofágová x mitochondriální). NO reaguje s většinou biomolekul velmi pomalu, protože jeho difúze do krve a inaktivace hemoglobinem probíhá mnohem rychleji, dostatečně rychle reaguje jen s jinými radikály a přechodnými kovy. Metabolity NO (např. peroxynitrit) jsou však velmi reaktivní. Při reakci s thiolovými skupinami cysteinu, glutathionu či albuminu vznikají stálejší **nitrosothioly**, které jsou zřejmě transportní formou NO.

Reakcí NO se superoxidem vzniká toxický **peroxynitrit** (ONOO⁻), který je silným cytotoxickým oxidačním agens. *In vivo* vyvolává hydroxylaci a nitraci tyrosinových zbytků a oxidaci methioninových zbytků v proteinech, což vede k inaktivaci enzymů (např. α_1 -antiproteinasy, trombomodulinu, glutathion-S-transferas, cytochromů P450) a interferenci se signální transdukcí (zablokování fosforylace tyrosinových zbytků pomocí tyrosinkinas).

Sírné radikály

V *in vivo* podmínkách vystupují thiolové sloučeniny (zejm. redukovaný glutathion) většinou jako antioxidanty, protože chrání thiolové skupiny proteinů před oxidací a vychytávají kyslíkové radikály a další reaktivní formy (např. HOCl a ONOOH). Thioly (včetně glutathionu) však mohou být rovněž zdrojem radikálů (**thiylové radikály**, RS•). Thiylové radikály vznikají po reakci thiolů s radikálem lokalizovaným na uhlíku nebo kyslíku (HO•, ROO•, RO•), po reakci thiolů s ionty přechodných kovů nebo homolytickým štěpením disulfidových vazeb (i



v proteinech). Thiylové radikály mají značnou reaktivitu, mohou oxidovat další látky za vzniku jiných radikálů (např. askorbylový radikál z askorbátu, $O_2^{\cdot-}$).

Vznik volných radikálů

Volné radikály se dostávají do organismu z vnějšího prostředí, velké množství však vzniká i v průběhu metabolismu. Podle toho rozdělujeme příčiny vzniku volných radikálů na exogenní a endogenní (Tab. 2).

Tab. 2. Exogenní a endogenní příčiny vzniku RONS

| Exogenní | Endogenní |
|--|--|
| Ultrafialové nebo ionizační záření (UV světlo, γ -paprsky, X-paprsky) | Rozpad fagocytů a makrofágů (záněty, sepse, popáleniny) |
| Intoxikace (PCB, CCl_4 , chloroform, parakvat, alkohol – na metabolismu se podílí cytochrom P450) | Vznik kyseliny močové v reakcích katalyzovaných xanthinoxidasou (úrazy, nekrózy, pooperační stavy...) |
| Znečištění ovzduší | Syntéza prostaglandinů |
| Kouření | Hyperglykémie |
| Potrava (tepelná úprava, drcení, vliv světla,...) | Reperfúze po předchozí ischemii (také „kyslíkový dluh“) |
| | Autooxidace thiolů |

Fyziologické funkce RONS

Ve většině publikací je zdůrazňován nepříznivý účinek RONS. Nesmíme však zapomenout, že RONS se účastní celé řady pochodů, které jsou pro přežití buňky/organismu nezbytné. Škodí pouze tehdy, vymknou-li se přísné kontrole, kterou každý aerobní organismus získal v průběhu vývoje biologického systému.

Metabolismus živin a zisk energie

Poslední částí dýchacího řetězce mitochondrií je **cytochrom-c-oxidasa** (komplex IV), která přijímá elektrony pocházející z živin a redukuje jimi molekulární kyslík. Molekula kyslíku je postupně čtyřmi elektrony redukována na dvě molekuly vody a při tomto procesu se uvolní energie pro syntézu ATP. Během redukce vznikají v aktivním centru reaktivní metabolity (viz. Obr. 1), které zůstávají navázány na enzym. Vzhledem k nepředvídatelným



vlastnostem ROS je však zhruba 3-5 % denní spotřeby kyslíku přeměněno na $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HO^{\cdot} a 1O_2 místo kompletní redukce na vodu.

Monooxygenasy, enzymy endoplasmatického retikula, redukují kyslík třemi elektrony na HO^{\cdot} , který využívají k hydroxylačním reakcím, např. při syntéze cholesterolu a žlučových kyselin, při detoxikaci některých xenobiotik (cytochromy P450), při degradaci tryptofanu kynureninovou cestou (indolamin-2,3-dioxygenasa).

Další enzymy, které využívají kyslík, jsou různé oxidasy. Jednou z nich je **xanthindehydrogenasa**, která oxiduje hypoxanthin a xanthin na kyselinu močovou. **Prolyl- a lysylhydroxylasy** jsou enzymy syntézy kolagenu, které využívají molekulární kyslík k posttranslační hydroxylaci prolinových a lysinových zbytků za účasti kofaktorů askorbátu a 2-oxoglutarátu. **Tyrosinhydroxylasa**, která má jako kofaktor tetrahydrobiopterin, zahajuje syntézu katecholaminů zavedením hydroxylové skupiny do pozice 3 na aromatickém jádře tyrosinu.

Při syntéze hormonů štítné žlázy dochází k oxidaci jodidu peroxidem vodíku na elementární jód, který je následně využit k jodaci tyrosinových zbytků v proteinu thyreoglobulinu. Tyto reakce katalyzuje specifická peroxidasa – **thyreoperoxidasa**, zdrojem peroxidu vodíku jsou duální oxidasy DUOX1 a DUOX2, které patří mezi NADPH-oxidasy.

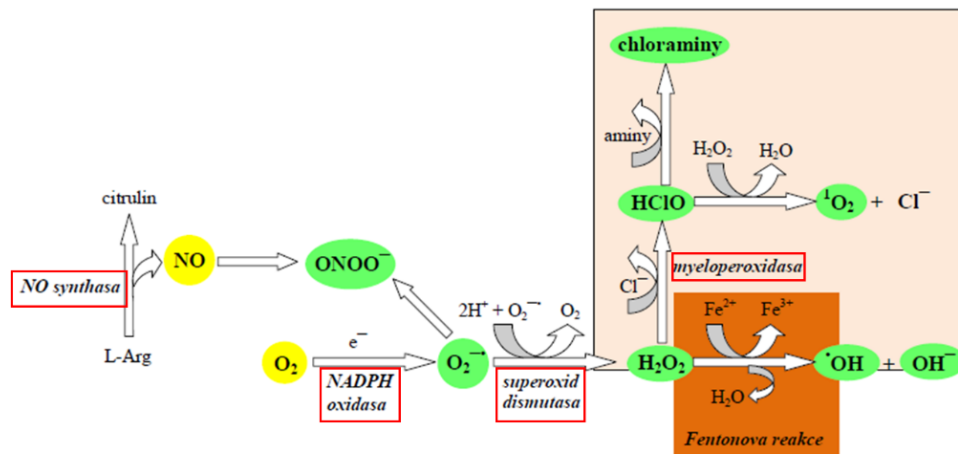
Deoxyribonukleotidy vznikají *in vivo* redukcí ribonukleosiddifosfátů v přítomnosti enzymu **ribonukleotidreduktasy** (též ribonukleosiddifosfátreduktasa). Tento enzym má v aktivním místě přítomný RS^{\cdot} , který se účastní katalýzy reakce. Pro redukcí 2-OH skupiny ribosy se využívá pár thiolových skupin (cysteinových zbytků) v aktivním místě enzymu, který se během reakce oxiduje. Regenerace enzymu probíhá pomocí thioredoxinového nebo glutaredoxinového systému za účasti NADPH jako donoru redukčních ekvivalentů.

Fagocytóza

PMN a makrofágy používají RONS k odstraňování mrtvých buněk a k zabíjení bakterií. Jejich membrána je vybavena enzymovým komplexem – **NADPH-oxidasou**, který po pohlcení cizí částice aktivuje a redukuje kyslík na $O_2^{\cdot-}$, čímž se 10-20 násobně zvýší spotřeba O_2 aktivovanou buňkou („respirační vzplanutí“). Superoxid je **superoxiddismutasou** redukován na peroxid vodíku. Kyselé prostředí fagosomu podporuje uvolnění iontů železa z intracelulárních zásob, takže je k dispozici pro **Fentonovu reakci** a vznik HO^{\cdot} . U aktivovaných PMN je přítomná **myeloperoxidasa**, která katalyzuje vznik $HOCl$ z peroxidu vodíku a chloridových iontů. V makrofázích i PMN je účinkem cytokinů, mikrobů a jejich produktů stimulována exprese **indukovatelné NO-syntasy**, která (v závislosti na dostupnosti



kofaktorů, substrátu a NADPH) ve svém okolí zvyšuje koncentraci NO o několik řádů. Ten pak nestačí být odstraněn difúzí do krve a reaguje ve fagosomu se superoxidem za vzniku baktericidního prostředku ONOO⁻ (Obr. 2).



Obr. 2. Tvorba RONS ve fagocytujících buňkách (upraveno z Krejsek a kol. 2016)

Buněčná signalizace

Indukce tvorby RONS (pouze nízké koncentrace!) významně ovlivňuje aktivitu drah signální transdukce. RONS mohou hrát do určité míry úlohu **druhých posílů** v signálních drahách aktivovaných cytokiny a růstovými faktory. Mezi nejvýznamnější cíle RONS patří modulační aktivita různých transkripčních faktorů (např. Nrf2, AP-1, NF-κB, HIF-1), proteinkinas (např. MAPK, PI(3)K) a fosfatů. Výsledkem je např. stimulace buněčné proliferace, stárnutí (senescence) buněk, modulační apoptózy atd. Významnou signální molekulou je **NO**, který působí jako neurotransmiter a vazodilatační faktor. Tento radikál aktivuje guanylátcyklyzu, která v buňce syntetizuje cGMP.

Antioxidační systém organismu

Antioxidační obrana organismu představuje komplexní systém tvořený několika úrovněmi. Podle vztahu k tvorbě ROS lze tyto obranné mechanismy rozdělit do tří skupin. Primární antioxidant **brání tvorbě volných radikálů** (např. chelátory iontů, inhibitory xanthinoxidasy a NADPH-oxidasy, transportní bílkoviny), sekundární **vychytávají již vytvořené volné radikály** (např. antioxidační enzymy a redukující látky) a terciární **zajišťují opravu a eliminaci** biomolekul poškozených volnými radikály (např. methioninsulfoxidreduktasa, DNA-fotolyasa, fosfolipasy, proteasy, endonukleasy). Ochrana



organismu proti oxidačnímu poškození je systémem, v němž antioxidanty a celá jejich seskupení vzájemně spolupracují. **Funkce jednoho antioxidantu velmi často podmiňuje účinek jiného článku tohoto systému.**

Antioxidační enzymy

Mezi hlavní antioxidační enzymy organismu patří superoxiddismutasa (SOD), katalasa (CAT), glutathionperoxidasa (GPx) a další peroxidasy (Obr. 3).

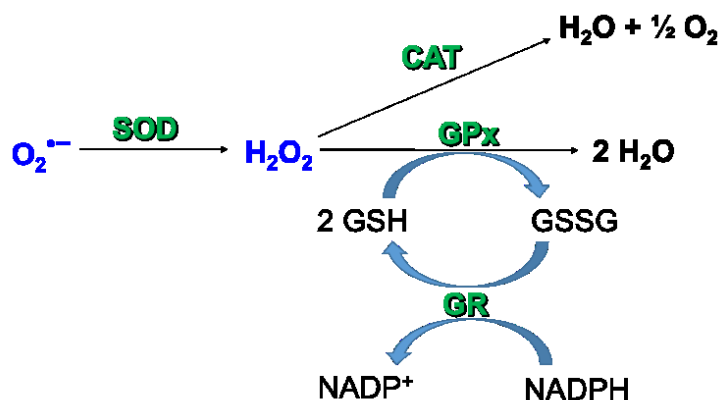
Superoxiddismutasa, která je přítomná v každé aerobní buňce, katalyzuje dismutaci $O_2^{\cdot-}$ na H_2O_2 a O_2 . U člověka se vyskytují tři formy enzymu – Cu,Zn-SOD, EC-SOD a Mn-SOD, které se liší kofaktorem (atom kovu) a lokalizací. Cu,Zn-SOD je přítomná v cytoplasmě buněk. Jedná se o homodimer, jehož každá podjednotka obsahuje po jednom atomu Cu a Zn; měď přenáší elektron z jedné molekuly superoxidu na druhou, zatímco zinek má stabilizační funkci a katalýzy se neúčastní. EC-SOD (extracelulární) je tetramer obsahující v aktivním místě ionty Cu a Zn. Tento enzym se váže prostřednictvím heparansulfátu na luminální povrchu endotelu, odkud může být uvolněn heparinem. Mn-SOD je lokalizována v matrix mitochondrií a má čtyři podjednotky; spolu s Fe-SOD se vyskytuje i v prokaryontních organismech a je tedy fylogeneticky starší než Cu,Zn-SOD. U člověka vede deficit Cu,Zn-SOD k onemocnění zvanému amyotrofičká laterální sklerosa, které je provázeno těžkým postižením motorických neuronů v mozkové kůře a míše.

Peroxid vodíku, který vzniká dismutací $O_2^{\cdot-}$, je toxický, proto se ho organismus snaží co nejrychleji odstranit. K tomuto účelu se vyvinuly dva systémy – katalasa (štěpí H_2O_2 na H_2O a O_2) a peroxidasy (redukce H_2O_2 je provázena oxidací jiného substrátu). U člověka je nejvýznamnější peroxidasou **glutathionperoxidasa**, která redukuje H_2O_2 za současné oxidace glutathionu (GSH). Regeneraci koenzymu GSH zajišťuje **glutathionreduktasa** (GR), která využívá k redukci oxidovaného glutathionu (GSSG) koenzym NADPH. Je tedy závislá na správném fungování pentosového cyklu. U člověka bylo popsáno osm isoenzymů GPx, které se liší strukturou, lokalizací, funkcí a závislostí na selenu. GPx1 se nachází v cytoplasmě prakticky všech buněk (cGPx) a kromě antioxidační úlohy slouží zřejmě i jako zásobárna selenu; GPx2 (GIT) a GPx3 (plasma) jsou lokalizovány extracelulárně. Všechny tři isoformy mají podobnou tetramerní strukturu a obsahují v aktivním centru selenocystein, který slouží jako redoxní centrum enzymu. GPx4 (též fosfolipidová GPx, PHGPx), zřejmě nejvýznamnější antioxidačně působící isoforma, je monomerní enzym vázaný v buněčných membránách všech buněk, kde redukuje kromě H_2O_2 i lipidové hydroperoxydy. GPx5 je hlavním enzymem v nadvarletí, který má tetramerní strukturu a v aktivním centru má cysteinový zbytek místo



slenocysteinu. GPx6 je strukturně blízká GPx3 (homotetramer se selenocysteinem), ale její funkce a kinetické vlastnosti jsou předmětem dalšího studia. GPx7 a GPx8 jsou monomerní enzymy, v nichž je selenocystein nahrazen redoxně aktivním cysteinovým zbytkem. Tyto enzymy jsou lokalizovány v membránách endoplasmatického retikula a podílejí se na skládání nascentních proteinů. Dědičný defekt GPx a defekt tvorby GR se projeví poškozením buněčných membrán s následnou hemolytickou anémií.

Katalasa působí na H_2O_2 až ve vysokých koncentracích, čímž se liší od peroxidas, které působí na nízké koncentrace H_2O_2 . CAT může katalyzovat i peroxidasové reakce, ale vzhledem k nízké aktivitě vůči alkylperoxidům (ROOH) se tato reakce v antioxidační obraně neuplatňuje. Jedná se o hemoprotein se čtyřmi podjednotkami, který vykazuje nejvyšší aktivitu v mitochondriích a peroxisomech hepatocytů a v cytoplasmě erythrocytů. Dědičný deficit CAT je velmi vzácný a nemá závažné klinické projevy.



Obr. 3. Vztahy mezi jednotlivými součástmi antioxidačního systému buňky (upraveno z Racek 2003).

Vysokomolekulární endogenní antioxidanty

Přechodné kovy (zejm. železo a měď) se chovají jako volné radikály a jsou-li volné a v redukované formě podílejí se na vzniku ROS (účastní se Fentonovy reakce). Organismus potřebuje Fe a Cu jako biogenní stopové prvky, musí však zabránit jejich účasti v radikálových reakcích. Ochranou před účastí těchto kovů ve Fentonově reakci je jejich vazba v pevném chelátu (např. transportní a skladovací proteiny) nebo oxidace na vyšší valenci. Tak je Fe(III) při transportu v plasmě pevně vázáno na **transferin**. V buňkách střevní sliznice a v kostní dřeni je pevně vázáno v molekule **feritinu**, v leukocytech se váže na protein **laktoferin**. Železo se sice vstřebává jako dvoumocné, avšak feritin vykazuje ferooxidasovou aktivitu, která udržuje skladované Fe v oxidované formě. Stejně tak v krvi zajišťuje oxidaci železa **ceruloplasmin**,



jehož hlavním funkcí není transport Cu, ale právě oxidace Fe před jeho předáním transferinu. Za antioxidant můžeme považovat i **haptoglobin** (vychytává extracelulární hemoglobin) a **hemopexin** (váže uvolněný hem), protože uvolněný hemoglobin a hem představují prooxidačně nebezpečnou formu Fe. Reaktivitu volných radikálů významně ovlivňují také thiolové skupiny některých proteinů (např. **albumin**, **metalothioneiny**), které chelatují ionty kovů.

Nízkomolekulární antioxidanty

Antioxidant můžeme definovat jako sloučeninu, která – je-li přítomná v nízkých koncentracích v porovnání s množstvím oxidovatelného substrátu – je schopná jeho oxidaci značně zpomalit nebo jí zabránit. Podle upravené definice, která je vhodná pouze pro nízkomolekulární antioxidanty, by „ideální“ antioxidant měl být: netoxický; vstřebáván z potravy a dostupný po absorpci; přeměněn v buňkách a tkáních na redukovanou formu, aby mohl vystupovat jako donor protonů nebo elektronů; schopen zničit volné radikály a vykazovat řadu antioxidantních vlastností včetně interakce s dalšími antioxidanty přítomnými v membráně nebo ve vodné fázi.

Nízkomolekulární antioxidanty můžeme dělit podle jejich původu (endogenní x exogenní; přirozené x umělé), lokalizace (intracelulární x extracelulární) či rozpustnosti (hydrofilní x lipofilní x amfifilní). Přehled nízkomolekulárních antioxidantů je uveden v Tab. 3.

Tab. 3. Přehled nízkomolekulárních antioxidantů

| | Endogenní | Exogenní |
|-------------------|--|---|
| Hydrofilní | Glutathion Kyselina močová Bilirubin | Askorbát Polyfenoly (<i>trans</i> -resveratrol) Bioflavonoidy (kyanidin, kvercetin, rutin aj.) |
| Lipofilní | Koenzym Q ₁₀ Estrogeny | α-Tokoferol Karotenoidy |
| Amfifilní | Melatonin Kyselina α-lipoová | Lazaroidy (21-aminosteroidy) Bioflavonoidy (epikatechin, prenylované flavonoidy) |

Prolomení antioxidantní ochrany organismu, oxidační stres

V živém organismu je vznik RONS a jejich odstraňování antioxidantním systémem v přibližné rovnováze. Převaha jedné či druhé složky vede k poruchám, které mohou



organismus vážně ohrozit. Častější je případ, kdy převládají RONS, ať je to způsobeno jejich zvýšenou tvorbou, sníženou činností AOX systému, nebo kombinací obou příčin. Při porušení této rovnováhy ve prospěch RONS vzniká stav, který se označuje termínem **oxidační stres**. I výrazná převaha AOX může mít nepříznivé následky, protože blokuje fyziologické a pro organismus nezbytné účinky RONS.

Prakticky kterákoliv biomolekula může být napadena a poškozena RONS. Nejzávažnější je poškození fosfolipidů biomembrán, vedoucí k poruše esenciálních membránových dějů či dokonce k zániku buňky, dále poškození nukleových kyselin (mutageneze, karcinogeneze, zánik buňky) a proteinů (inaktivace enzymů a dalších významných proteinů) (Tab. 4).

Tab. 4. Hlavní buněčné cílové struktury pro RONS (upraveno ze Štípek 2000)

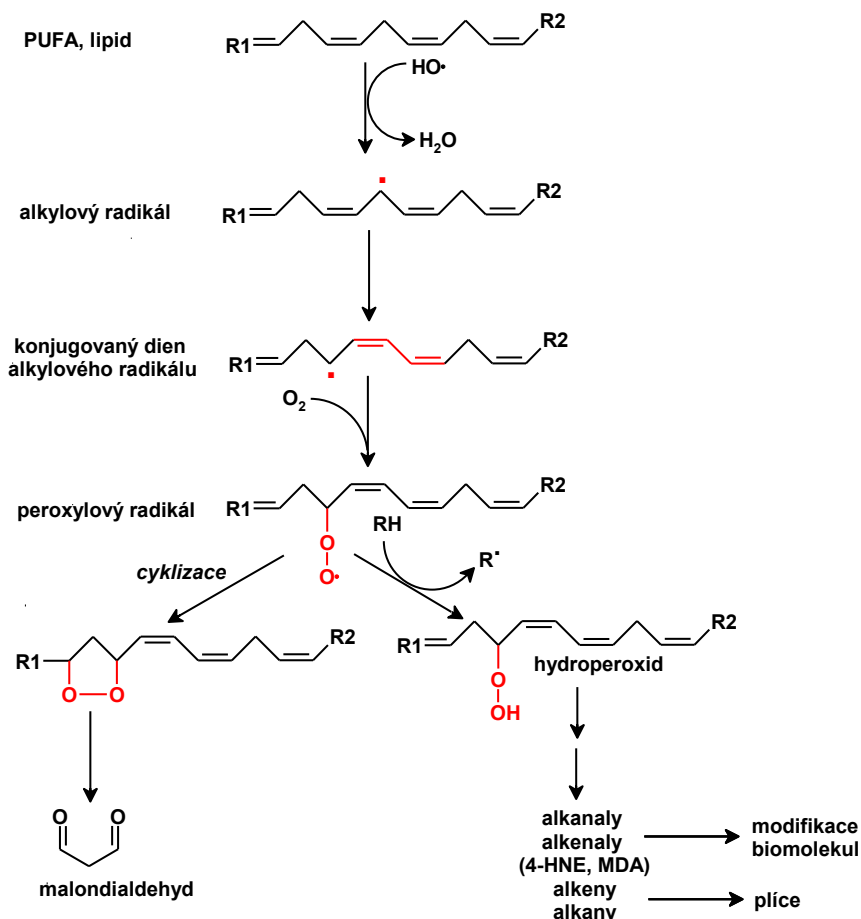
| Cíl | Poškození | Následky |
|--|--|---|
| Nenasycené MK v lipidech (PUFA) | <ul style="list-style-type: none"> • ztráta dvojných vazeb, • vznik reaktivních metabolitů (peroxydy, aldehydy) | <ul style="list-style-type: none"> • změna fluidity lipidů • změny v propustnosti membrán • vliv na membránově vázané enzymy • tvorba chemoatraktantů pro makrofágy |
| Proteiny | <ul style="list-style-type: none"> • agregace a síťování • fragmentace a štěpení • modifikace SH- skupin a benzenových jader AK • reakce s hemovým železem | <ul style="list-style-type: none"> • změny v transportu iontů • vstup Ca^{2+} do cytosolu • změny v aktivitě enzymů |
| DNA | <ul style="list-style-type: none"> • štěpení kruhu deoxyribosy • modifikace a poškození bazí • zlomy řetězce • křížové vazby řetězců | <ul style="list-style-type: none"> • mutace • translační chyby • inhibice proteosyntézy |

Peroxidace lipidů (lipoperoxidace)

V biologických systémech jsou nejčastěji napadeny polynenasycené mastné kyseliny (PUFA). Peroxidace lipidů (Obr. 4) je typickým příkladem řetězové reakce, kde lze rozlišit iniciaci, propagaci a terminaci. Proces začíná (**iniciace**) vytržením vodíkového atomu z methylenové skupiny PUFA působením $HO\cdot$, $RO\cdot$ nebo $ROO\cdot$ a mastná kyselina/lipid se stává uhlíkovým radikálem, v němž dvojná vazba přesmykuje tak, že vytváří konjugovaný dien. Ten se snadno konjuguje s kyslíkem za vzniku peroxylového radikálu ($ROO\cdot$), který je dostatečně reaktivní, aby byl schopen napadnout další molekulu PUFA a vytvořit z ní radikál (**propagace**). Z původních $ROO\cdot$ vznikají hydroperoxydy ($ROOH$), které se cyklizují. Může



dojít k rozštěpení řetězce cyklického peroxidu a uvolnění alkanů (etan, pentan), které vydechujeme, a reaktivních aldehydů, zejm. malondialdehydu (MDA) a 4-hydroxynonenalu (4-HNE). Řetězová reakce končí vznikem stabilní sloučeniny (**terminace**), např. při setkání radikálu PUFA s jiným radikálem nebo s lipofilním antioxidantem (zejm. α -tokoferol, koenzym Q₁₀).



Obr. 4. Schéma peroxidace polynenasycené mastné kyseliny (upraveno ze Štípek 2000 a Racek 2003)

V organismu probíhají dva typy lipoperoxidace – enzymová a neenzymová. **Enzymová lipoperoxidace** probíhá v aktivních centrech hydro- a endoperoxidas (cyklooxygenasa, lipoxygenasa) a jejím výsledkem je vznik stereospecifických a biologicky aktivních látek – eikosanoidů. Volné radikály, které při jejich syntéze vznikají, však nejsou z enzymu uvolňovány, takže neškodí. Naproti tomu **neenzymová lipoperoxidace** je vyvolána nespecifickým a mnohdy patologickým podnětem a probíhá výše zmíněným mechanismem.



Vznikající reaktivní aldehydy MDA a 4-HNE se pevně vážou na proteiny a mění jejich funkci a životnost. Výsledkem tohoto procesu jsou změny ve fluiditě membrán, vedoucí ke zvýšení jejich propustnosti pro ionty, což vyvolává lýzu buněk a snížení membránového potenciálu. Peroxidy vzniklé v membráně mohou být redukovány na příslušné alkoholy působením GPx, nebo mohou být z membrány odstraněny působením fosfolipas.

Poškození proteinů (<http://www.ias.ac.in/article/fulltext/jbsc/040/02/0419-0439>)

Proteiny mohou být při oxidačním stresu poškozeny buď přímo – působením RONS, nebo nepřímo – vlivem produktů lipoperoxidace. Některé RONS jsou schopné bezprostředně **oxidovat aminokyselinové zbytky**, např. methionin je oxidován na methioninsulfoxid a následně methioninsulfon působením HO•, H₂O₂, ¹O₂, ONOO⁻ a HOCl; tyrosinové, fenylyalaninové a tryptofanové zbytky jsou nitrovány peroxynitritem či hydroxylovány pomocí HO•; oxidace prolinových a argininových zbytků je provázána vznikem glutamát-5-semialdehydu atd. Oxidace jednotlivých aminokyselinových zbytků není provázána řetězovou reakcí, jako tomu bylo v případě lipoperoxidace. V případě **oxidace kostry polypeptidu** však řetězová reakce probíhá a může dojít i k rozštěpení polypeptidu. **Nepřímé poškození** proteinů je způsobeno produkty lipoperoxidace (např. RO• a ROO•). Reaktivní aldehydy MDA a 4-HNE se kovalentně vážou na volné aminoskupiny lysinu za vzniku Schiffovy báze. Tato reakce vede k tvorbě příčných vazeb mezi sousedními řetězci proteinů, což způsobuje jejich agregaci a síťování. Při reakci 4-HNE s histidinovými, lysinovými či cysteinovými zbytky vznikají karbonylové sloučeniny, které jsou ukazatelem míry oxidačního poškození proteinů.

Cílem oxidačního poškození jsou nejen enzymy, ale i receptory a transportní proteiny. Následky těchto reakcí jsou závažné – enzymy mění svou aktivitu, iontové pumpy neudrží iontovou homeostázu buňky (v cytoplasmě se hromadí ionty Ca²⁺, které aktivují proteasy, fosfolipasy a endonukleasy), modifikace aminokyselinových zbytků způsobují vznik nových antigenních determinant. Vzniklé poškození proteinů může být částečně opraveno – disulfidové můstky jsou redukovány pomocí glutathionu a thioredoxinu na thiolové skupiny; methioninsulfoxid v proteinech je redukován zpět na methionin enzymem methioninsulfoxidreduktasou. Za *in vivo* podmínek bývají poškozené proteiny rovněž odstraněny proteolytickou degradací, avšak silně oxidované a agregované proteiny jsou vůči ní často rezistentní a v buňce se hromadí.



Poškození DNA

DNA je sama o sobě velmi stálá molekula, ale při jejím vystavení HO• vzniká celá řada oxidačních produktů, protože HO• napadá purinové a pyrimidinové baze i cukerné zbytky. Nej náchylnější k oxidačnímu poškození je guanin. Častými produkty oxidačního poškození **purinových bazí** jsou 8-hydroxyguanin, 8-hydroxyadenin, 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FAPyG) a 4,6-diamino-5-formamidopyrimidin (FAPyA), zatímco z **pyrimidinových bazí** vznikají *cis-* a *trans*-thyminglykoly, 5-hydroxy-5-methylhydantoin, 5-(hydroxymethyl)uracil, cytosinglykol a 5,6-dihydroxycytosin. Při absorpci UV záření (200-300 nm) jsou pyrimidinové baze v DNA excitovány a při reakci se sousední pyrimidinovou bází vytvářejí dimery (nejčastěji thyminové), které jsou chemicky stálé. RNS deaminují adenin na hypoxanthin, guanin na xanthin a cytosin na uracil, což může být příčinou chybného párování bazí a vzniku tranziční mutace. **Cukerné zbytky deoxyribosy** jsou vlivem HO• oxidovány a fragmentovány, přičemž vzniká celá řada produktů včetně karbonylových sloučenin a MDA. Následkem těchto reakcí může docházet k přerušení řetězce DNA (jedno- a dvouřetězcové zlomy) nebo se mohou vytvářet příčné vazby mezi DNA a proteiny.

Následkem oxidačního poškození DNA dochází k chybnému párování bazí při replikaci a zavedení chyby do genetické informace (tranzice v případě deaminace bazí pomocí RNS nebo v přítomnosti thyminglykolu, transverze v přítomnosti 8-hydroxyguaninu). Některé vznikající produkty blokují replikaci DNA (např. FAPyA či thyminglykol). Poškození DNA se projeví apoptózou, mutagenezí, karcinogenezí a stárnutím. Vzhledem k významu DNA pro přežití organismů existuje několik typů DNA reparačních enzymů – přímé odstranění změn (DNA-fotolyasa) a systémy pro excizní úpravy (excinukleasový systém, DNA-glykosylasa). Dimery thyminu i dalších bazí, které vznikají po ozáření DNA UV světlem, jsou rozštěpeny **DNA-fotolyasou**, která je závislá na energii viditelného světla. Chybně spárované, oxidované a deaminované baze jsou z DNA odstraněny buď pomocí **excinukleasového komplexu**, který při větších lézích vyštěpí poškozenou bazi jako součást oligonukleotidu, nebo je poškozená baze odstraněna přímo pomocí **DNA-glykosylasy**. Prázdná místa v DNA jsou pak opravena a doplněna pomocí endonukleasy, DNA-polymerasy a DNA-ligasy.

RONs v patologických procesech

RONs se podílejí na vzniku a rozvoji četných onemocnění a chorobných stavů. Mezi stavy s významnou účastí RONS patří nekróza, apoptóza, ischemicko-reperfuční poškození, stárnutí a zánět. Onemocnění, v jejichž patogenezi hrají RONS významnou úlohu, jsou někdy



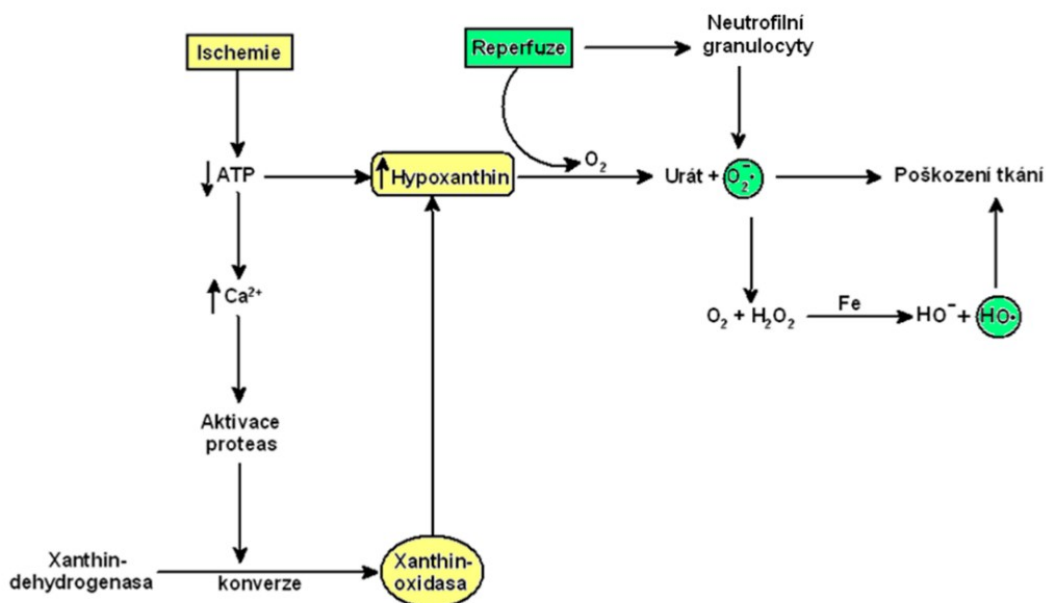
nazývány nemocemi z volných radikálů („free radical diseases“). Sem bychom mohli zařadit aterosklerózu, diabetes mellitus, neurodegenerativní onemocnění (např. Alzheimerova a Parkinsonova nemoc), revmatoidní arthritida a nádorová onemocnění. Důležité je si uvědomit, že oxidační stres není příčinou těchto onemocnění, ale významně se podílí na jejich patogenезi.

Ischemicko-reperfuční poškození

Delší **ischemie** nebo **hypoxie** kteréhokoliv orgánu končí zánikem buněk a poškozením tkáně. Při ischemii jsou velmi brzy vyčerpány energetické zdroje buňky, klesá koncentrace ATP a převládá anaerobní metabolismus živin (anaerobní glykolýza), což způsobí pokles intracelulárního pH. V buňce se hromadí AMP a jeho metabolit hypoxanthin. Díky nedostatku ATP selhává membránový transport iontů (inaktivace Na/K-ATPasy a Ca/Mg-ATPasy), což způsobí rychlý nárůst cytoplasmatického Ca^{2+} tokem z mitochondrií, endoplasmatického retikula a extracelulárního prostoru. V buňkách přetížených Ca^{2+} („*calcium overload*“) dochází k nespecifickému zvýšení permeability membrán a k aktivaci řady enzymů (fosfolipasy, proteasy, ATPasy a endonukleasy), které poškozují buněčné struktury. Během ischemie dochází také ke konverzi xanthindehydrogenasy (koenzym NAD^+) na xanthinoxidasu (koenzym O_2), která již není schopná vázat v aktivním centru NAD^+ . Po **reperfuzi** je nahromaděný hypoxanthin oxidován xanthinoxidasou na xanthin a následně na kyselinu močovou a při této reakci jsou elektrony přenášeny na molekulární kyslík za vzniku $O_2^- \cdot$. Z něj dismutací vzniká peroxid vodíku, který je ve Fentonově reakci štěpen na $HO \cdot$. Vznikající ROS poškozují buňky jednak přímo, ale i nepřímo tím, že indukují syntézu adhezních molekul v endotelu (selektiny, ICAM-1), a tak se podílejí na aktivaci PMN. Ty se hromadí v postižené tkáni a produkují velké množství cytokinů, které aktivují PMN k produkci a uvolnění ROS, což přispívá k rozvoji zánětu v postižené oblasti (Obr. 5).

V souvislosti s ischemicko-reperfučním poškozením jsou zmiňovány tzv. reperfuční jevy – **kyslíkový paradox** a **kalciový paradox**. První jev vyplývá ze zvýšené tvorby RONS po reperfuzi. Funkce enzymových systémů produkujících RONS se po reperfuzi obnovuje rychleji než protektivní mechanismy bránící jejich účinkům. Druhý jev je dán tím, že po reperfuzi dochází k obnově kanálů přivádějících Ca^{2+} z extracelulárního prostoru do buňky před obnovou iontových pump, které ho z cytoplasmy odvádějí.





Obr. 5. Úloha ROS při ischemii a reperfúzi

Použitá literatura

- Ďuračková Z (1998) Volné radikály a antioxidanty v medicíne (I). 1. vydání. Slovak academic press, Bratislava, 285 s.
- Halliwell B, Gutteridge J (2015) Free Radicals in Biology and Medicine. 5th edition. Oxford University Press, Oxford, 896 pp.
- Krejsek J, Andrýs C, Krčmová I (2016) Imunologie člověka. 1. vydání. Garamon, Hradec Králové, 496 s.
- Masopust J (2003) Patobiochemie buňky. 1. vydání. 2. LFUK, Praha, 344 s.
- Matouš B (2010) Základy lékařské chemie a biochemie. 1. vydání. Galén, Praha, 540 s.
- Racek J (2003) Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění. 1. vydání. Galén, Praha, 90 s.
- Reilly C (2006) Selenium in Food and Health. 2nd edition. Springer, New York, 206 s.
- Štípek S (2000) Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. 1. vydání. Grada, Praha, 314 s.

