

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Oxidativní stres a jeho vliv na biologický systém. Stručný přehled.

Biological effect of oxidative stress. Brief survey.

(bakalářská práce)

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

Chtěla bych poděkovat prof. RNDr. Evě Kvasničkové, CSc. za její trpělivost, ochotu, odbornou pomoc, cenné rady a čas, který mi věnovala při vypracování mé bakalářské práce.

OBSAH

1	Úvod a cíle práce	5
2	Reaktivní formy kyslíku a dusíku	8
	2.1 Reaktivní formy kyslíku	9
	2.2 Reaktivní formy dusíku	11
3	Fyziologické funkce a význam volných radikálů pro organismus	14
	3.1 Mitochondrie – dýchací řetězec	14
	3.2 Imunitní ochrana	16
	3.3 Buněčná signalizace.....	17
4	Oxidační stres a poškození biomolekul.....	20
	4.1 Mitochondriální a jaderná DNA	20
	4.2 Peroxidace lipidů	22
	4.3 Proteiny	24
5	Onemocnění spojená s oxidativním stresem.....	28
	5.1 Rakovina	28
	5.2 Diabetes mellitus.....	30
	5.3 Neurodegenerativní onemocnění	31
	5.3.1 Alzheimerova choroba	33
	5.3.2 Parkinsonova choroba	34
6	Závěr	37
7	Souhrn.....	38
8	Literatura	40
9	Seznam použitých zkratk	43

1 Úvod a cíle práce

Radikálové reakce patří k nejstarším biochemickým reakcím a jsou součástí jak fyziologických pochodů, tak i patogeneze různých chorob. U aerobních organismů, kdy přítomnost kyslíku je nezbytná pro jejich existenci, dochází při oxidačních reakcích ke vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS), k poklesu redukční kapacity buněčných redox systémů a výsledkem je stav, který je nazýván oxidativním stresem. Davies jej označuje jako „paradox aerobního života,“ protože reaktivní radikály kromě fyziologicky prospěšné funkce jsou i příčinou řady oxidačního poškození důležitých biomolekul buňky, její funkce i buněčné smrti (Davies 2000). Oxidativní stres je způsoben nerovnováhou mezi produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS) a schopností biologického systému zabránit jejich vzniku anebo je detoxikovat. Volné radikály nevznikají pouze redukcí kyslíku, závažné jsou i radikály NO, které vznikají enzymovou aktivitou NO syntasy i isoform NAD(P)H oxidasy (RNS).

Volný radikál je jakýkoli atom nebo molekula schopná samostatné existence, která obsahuje alespoň jeden orbital s nepárovým elektronem (Valko et al. 2007, Thannickal a Fanburg 2000). Většina biomolekul nejsou radikály, neboť obsahují orbitály plně obsazené dvěma elektrony. Podle této definice je atomární vodík volným radikálem, protože má pouze jeden elektron. Kyslík O_2 je radikál, protože má ve valenční vrstvě dva orbitály a v každém po jednom nepárovém elektronu, což dává kyslíku jeho reaktivitu. Tyto elektrony mají paralelní spin, proto kyslík oxiduje ostatní molekuly přijetím elektronů s antiparalelním spinem (Magder 2006). Ve srovnání s jinými radikály reaguje s ostatními molekulami pomalu, protože musí měnit rotaci jednoho z valenčních elektronů = překonat tzv. spinovou restrikcí. Právě tato podmínka umožnila organismům přežít v kyslíkové atmosféře, jinak jak uvádí Štípek 2000, by doslova pohořely.

Volné radikály mohou vznikat homolytickým štěpením kovalentní vazby za působení UV záření, vysoké teploty aj., ale v organismu nejsou příliš časté. Mnohem snáze vznikají oxido-redukčními pochody, které vyžadují dodání menšího množství energie. Typickou reakcí tvorby volných radikálů je Fentonova a Haber-Weissova reakce (viz. kapitola 2.1).

Radikály jsou obecně velmi reaktivní molekuly, které se snaží doplnit si elektron do páru a iniciují tak řetězovou reakci. Reaktivita je však relativní pojem, protože

některé radikály mají reaktivitu nízkou (viz. výše kyslík O₂). Radikál je schopen ostatním biomolekulám předávat či odnímat elektron a generovat tak z „normálních“ molekul radikály, čímž dochází k propagaci radikálové reakce. Teprve spojením dvou radikálů dojde k terminaci.

Reaktivními formami kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) jsou označovány jak radikály, tak i molekuly, které nejsou radikály v pravém slova smyslu, jelikož nedisponují nepárovým elektronem. K látkám neradikálové povahy patří peroxid vodíku, kyselina chlorná, ozon (přehled viz kapitola 2). Potenciální nebezpečí plyne z toho, že se stávají substrátem dalších reakcí, které vedou k produkci radikálu. ROS i RNS mohou mít endogenní i exogenní původ.

Nejvýkonnějším producentem ROS (Karihtala a Soini 2007) v buňce jsou membránově vázané enzymy, zejména ty, jejichž koenzymy jsou schopné redukovat dvouatomární kyslík pouze jediným elektronem za vzniku superoxidu. Jsou to hlavně koenzymy s chinoidní nebo flavinovou strukturou, hemové koenzymy a enzymy mající v aktivním centru měď (Štípek et al. 2000). Velmi důležitým a vydatným zdrojem je mitochondriální dýchací řetězec. Dále endoplazmatické retikulum, peroxisomy a mikrosomy, cytochrom P-450 a specializované fagocytující buňky (Magder 2006, Thannickal a Fanburg 2000, Valko et al. 2006, Karihtala a Soini 2007). Kromě toho může být molekulární kyslík v buňkách redukován na reaktivní formy řadou endogenních malých molekul v průběhu biotransformací některých xenobiotik a působením reduktas. Takovými molekulami jsou například chinonová antibiotika (Štípek et al. 2000). K exogenním zdrojům se řadí veškeré fyzikální vlivy jako UV záření, radiace, produkty kovem katalyzovaných reakcí, kouření, polutanty přítomné v atmosféře.

Od poloviny minulého století, kdy byla publikována první práce o toxicitě kyslíku a volných radikálů, je tento problém stále v pozornosti mnoha významných pracovišť. Postupně se zpřesňovaly a rozšiřovaly znalosti o počtu a vlastnostech volných radikálů. V roce 1956 vyslovil Denham Harman hypotézu o vlivu volných radikálů na stárnutí organismu a otevřel velké pole dalšího výzkumu (Dröge 2002). V roce 1969 byla objevena superoxidodismutasa, která rozšířila bádání na peroxid vodíku a jeho význam pro řadu metabolických dějů a ovlivnění důležitých biomolekul. V posledních 10 letech přibývá publikací o dvojí tváři působení volných radikálů tj. na jedné straně o jejich prokazatelném toxickém působení na nukleotidy DNA, na aminokyseliny proteinů (s ním spojené inaktivace řady enzymů i strukturních proteinů

membrán), na lipidy např. lipidy membrán, na stárnutí buňky a její programovanou smrt a na druhé straně o jejich účasti na aktivaci mnoha růstových faktorů, na ochraně organismu před patogeny z okolního prostředí nebo jejich zapojení do buněčné signalizace (např. Dröge 2002, Chen et al. 2003; Valko et al. 2007, Finkel 2003).

Schopnost organismu odolávat, rozeznávat, odstraňovat a předcházet ROS poškození je zajímavým polem aktivního výzkumu v souvislosti se stárnutím organismu, rakovinou, neuro-degenerativními a kardiovaskulárními onemocněními.

Cílem předložené práce je vypracování stručného přehledu základních znalostí o volných radikálech (ROS a RNS), mechanismu jejich vzniku a účasti na různých fyziologických funkcích biologických systémů i řadě nefyziologických, pro organismus škodlivých pochodech.

2 Reaktivní formy kyslíku a dusíku

ROS představují různorodou skupinu látek zahrnující superoxidový anion, peroxid vodíku, hydroxylový radikál a další. Některé z nich (např. hydroxylový radikál) jsou extrémně nestabilní radikály (obsahují ve své molekule nepárové elektrony), zatímco jiné, jako peroxid vodíku, jsou relativně stabilní a mohou volně difundovat buněčnou membránou.

Reaktivní formy kyslíku jsou generovány jako vedlejší produkt buněčného metabolismu primárně probíhajícího v mitochondriích (Karihtala a Soini 2007). Mitochondrie jsou sice hlavním producentem ROS (především superoxidu uvolňovaného z komplexu I a III), ale zdaleka ne jediným.

Hladké endoplazmatické retikulum obsahuje enzymy katalyzující řadu reakcí, které slouží k detoxikaci škodlivých metabolických produktů. V popředí studia je rodina enzymů cytochromu P-450, které metabolizují mastné kyseliny, cholesterol, žlučové kyseliny a xenobiotika. V průběhu detoxifikačních reakcí dochází ke spotřebě kyslíku a produkci malého množství ROS. Typ cytochromu známý pod názvem CYP2E1 je výrazně aktivní v produkci ROS. Jeho úkolem je mimo jiné konverze ethanolu na acetaldehyd.

Peroxisomy obsahují několik druhů oxidas vytvářejících H_2O_2 . Peroxismální katalasa ho využívá k oxidaci nejrůznějších substrátů. Tyto oxidativní reakce jsou důležité hlavně v buňkách ledvin a jater, jejichž peroxisomy detoxikují toxické látky (alkohol). V peroxisomech také probíhá β -oxidace mastných kyselin.

Xantinoxidasa je flavoprotein přítomný ve vysoké koncentraci v endoteliálních buňkách kapilár a sinusoid. Existuje ve dvou formách – xantindehydrogenasa a xantinoxidasa. Za fyziologických podmínek převažuje dehydrogenasová forma, která odnímá elektrony různým substrátům (např. xantin, hypoxantin a jiné puriny), čímž dochází k jejich oxidaci. Získané elektrony předává na NAD^+ , který je redukován. Xantinoxidasa vznikající za patologických podmínek nasbírané elektrony přenáší na molekulární kyslík, který je jedním elektronem redukován na superoxid nebo dvěma elektrony na peroxid vodíku.

Makrofágy, neutrofilů a eosinofilů obsahují multikomponentní oxidasu, která využívá elektrony z NADPH k redukci molekulárního kyslíku na $O_2^{\cdot-}$ při zneškodňování invadujících organismů a patogenů procesem zvaným respiratory burst

nebo-li oxidativní vzplanutí (Dröge 2002, Štípek et al. 2000, Stocker a Keaney 2004, Thannickal a Fanburg 2000). Některým zde uvedeným zdrojům ROS se blíže věnuje kapitola 3. Přehled radikálových i neradikálových molekul shrnuje tabulka 1.

Tab.1. Uvádí přehled reaktivních forem kyslíku i dusíku, které jsou dále rozděleny na látky radikálové i neradikálové povahy. Převzato ze Štípek et al. 2000.

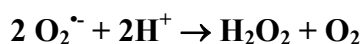
Reaktivní formy kyslíku	
Volné radikály	Látky, které nejsou volnými radikály
superoxid, $O_2^{\cdot-}$	peroxid vodíku, H_2O_2
hydroxylový radikál, HO^{\cdot}	kyselina chlorná, $HOCl$
peroxyl, ROO^{\cdot}	ozon, O_3
alkoxyl, RO^{\cdot}	singletový kyslík, 1O_2
hydroperoxyl, HO_2^{\cdot}	
Reaktivní formy dusíku	
Volné radikály	Látky, které nejsou volnými radikály
oxid dusnatý, NO^{\cdot}	nitrosyl, NO^+
oxid dusičitý, NO_2^{\cdot}	nitroxid, NO
	kyselina dusitá, HNO_2
	oxid dusitý, N_2O_3
	oxid dusičitý, N_2O_4
	nitronium, NO_2^+
	peroxynitrit, $ONOO$
	alkylperoxynitrit, $ROONO$

2.1 Reaktivní formy kyslíku

SUPEROXID $O_2^{\cdot-}$

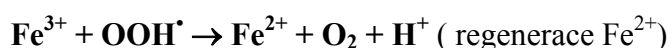
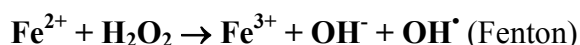
Vzniká jedoelektronovou redukcí v komplexech I a III dýchacího řetězce, působením xantinoxidasy konvertující xantin na kyselinu močovou, cyklooxygenasy

účastníci se metabolismu kyseliny arachidonové, NAD(P)H oxidasy fagocytů aj. (více viz. kapitola 3). Má oxidační i redukční účinky a je poměrně málo reaktivní. Biomolekuly poškozují usnadněním vzniku hydroxylového radikálu a tvorbou peroxynitritu po reakci s NO[•]. Má krátký biologický poločas a podléhá dismutační reakci, kdy spolu reagují dvě molekuly O₂^{•-} za vzniku peroxidu vodíku přičemž jedna molekula poskytuje elektron druhé (Štípek et al. 2000, Stocker a Keaney 2004).



HYDROXYLOVÝ RADIKÁL HO[•]

Je velmi reaktivní, má extrémně silné oxidační účinky a velice krátký biologický poločas. Reaguje prakticky se všemi molekulami v místě svého vzniku. Je považován za nejvíce toxický kyslíkový radikál. Může vznikat ze superoxidového aniontu (Haber-Weissova reakce) nebo z peroxidu vodíku (Fentonova reakce). Vzniklé Fe³⁺ ionty mohou dále reagovat s H₂O₂ a hydroperoxylovým radikálem OOH[•], čímž dochází k regeneraci Fe²⁺ (Benov 2001, Karihtala a Soini 2007).



PEROXYLOVÉ ROO[•] A ALKOXYLOVÉ RO[•] RADIKÁLY

Chemická aktivita těchto látek se liší podle původu zbytku R. Jsou to dobrá oxidační činidla schopná rychlé přeměny na jiné typy radikálů. Účastní se peroxidace lipidů, rozštěpování a modifikace proteinů a usnadňují poškozování DNA superoxidem (Dršata 2007, Valko et al. 2006).

PEROXID VODÍKU H₂O₂

Peroxid vodíku není radikálem. Molekula H₂O₂ je slabě reaktivní, ale jednoduchá vazba mezi dvěma kyslíky může být snadno rozbita za vzniku vodíku a hydroperoxylového radikálu nebo dvou hydroxylových. Velmi snadno prochází buněčnými membránami a může difundovat daleko od místa svého vzniku a pomalu

oxidovat řadu molekul. Pokud jsou přítomny ionty Fe^{2+} nebo Cu^+ podléhá peroxid vodíku reakci objevené už koncem 19. století Fentonem a produkuje hydroxylový radikál. (Stocker a Keaney 2004, Nindl 2004).

SINGLETOVÝ KYSLÍK $^1\text{O}_2$

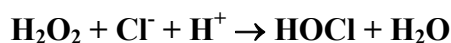
Je rovněž látka neradikálové povahy. Vzniká excitací molekulárního kyslíku v základním stavu a má mnohem silnější oxidační účinky než molekulární kyslík (Zima et al. 2002). V těle se vytváří například po absorpci světla některými pigmenty nebo při neenzymové dismutaci superoxidu (Štípek et al. 2000).

OZON O_3

Tato neradikálová forma kyslíku chrání Zemi před UV zářením. Jako součást tzv. fotochemického smogu představuje ozon zevní oxidační stres. K ozonovému poškození je nejvíce náchylný respirační trakt, pokožka a sítnice oka (Zima et al. 2002).

KYSELINA CHLORNÁ HOCl

Má silné oxidační účinky. Průmyslově se používá k výrobě bělidel. V organismu vzniká v polymorfonukleárech působením myeloperoxidasy. Tímto způsobem jsou likvidovány fagocytované mikroorganismy. Také oxiduje thiolové a aminové skupiny proteinů. Chloruje baze nukleových kyselin. Inaktivuje inhibitory proteas. Pokud reaguje s $\text{O}_2^{\cdot-}$ vytváří se hydroxylový radikál (Zima et al. 2002).

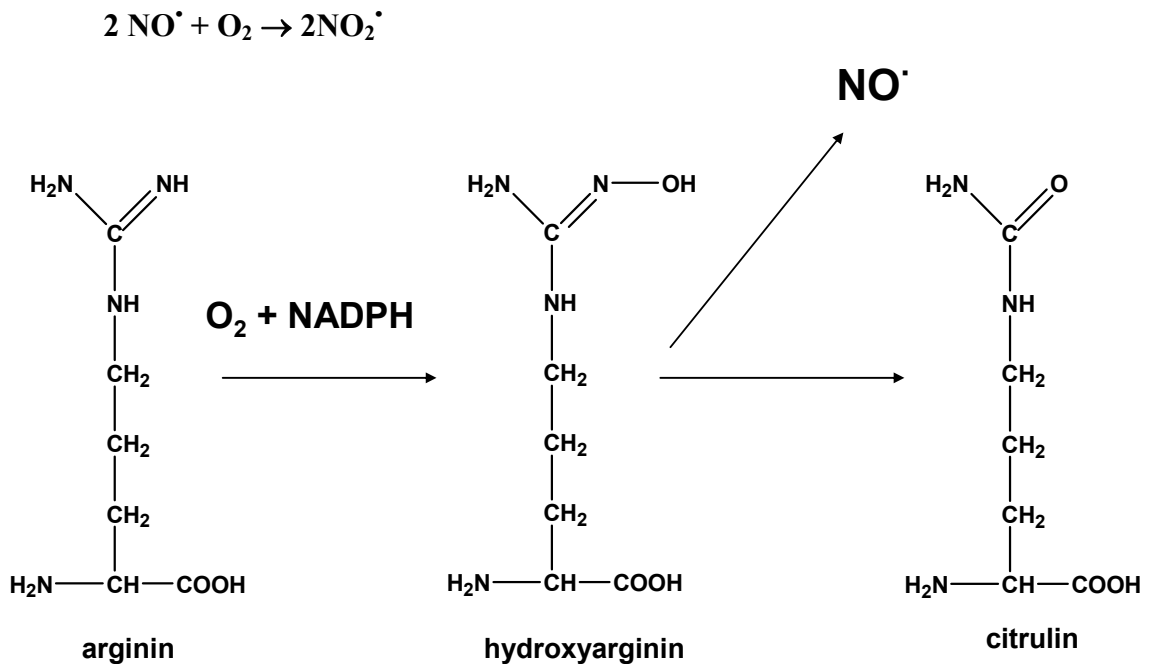


2.2 Reaktivní formy dusíku

OXID DUSNATÝ NO^{\cdot}

Tato malá reaktivní molekula je velmi důležitá pro signalizační funkce v cévách, imunitním systému i CNS. Je rozpustný ve vodném i hydrofobním prostředí a může procházet cytoplazmou a plazmatickou membránou. Ve své molekule obsahuje nepárový elektron, je tedy radikálem ačkoli s většinou biomolekul včetně kyslíku reaguje velmi pomalu. Dostatečně rychle reaguje jen s tranzitními kovy a radikály (Valko et al. 2006, Štípek et al. 2000). Za určitých okolností je oxid dusnatý a jeho

metabolity prudce jedovatý. Ve vysokých koncentracích se oxiduje na oxid dusičný. V buňkách a tkáních je vytvářen specifickými syntasami z aminokyseliny argininu.



Obr. 1. Přeměna argininu na aminokyselinu citrulinu vede ke vzniku oxidu dusnatého.

Syntéza oxidu dusnatého vyžaduje čtyři kofaktory (hem, FAD, FMN a tetrahydrobiopterin) a dva kosubstráty (kyslík O_2 a NADPH). Reakci katalyzují tři druhy syntas oxidu dusnatého, které se vzájemně liší v regulaci exprese a v řízení volným Ca^{2+} .

NOS I je konstitutivní na Ca^{2+} nezávislá syntasa nacházející se ve specifických neuronech centrálního i periferního nervového systému, v myocytech kosterních svalů, v buňkách macula densa ledvin, v plicích a neutrofilech. Může se nacházet volně v cytosolu nebo se vázat na proteiny asociované k buněčné membráně. Její aktivita se řídí mírou hypoxie, osmotického tlaku nebo změnami neuronální aktivity.

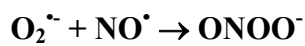
NOS II neboli indukovatelná syntasa je enzym obsažený v makrofázích, neutrofilech, chondrocytech, hepatocytech a buňkách hladkého svalstva cév. Podnětem k zahájení syntézy je například lipopolysacharid, IL-1, interferon gama. Tvorba NO^\bullet je mnohem intenzivnější a trvalejší než jakou dokážou katalyzovat obě konstitutivní syntasy.

NOS III je konstitutivní syntasa nacházející se v endotelových buňkách arterií a vén. Expresi stimuluje třecí stres proudící krve, hypoxie a steroidní hormony. Inhibici

vyvolají cytokiny a lipopolysacharid. V endotelu byl oxid dusnatý popsán jako tzv. endothelium-derived relaxing faktor - EDRF (Štípek et al. 2000).

PEROXYNITRIT ONOO[•]

Patologicky nejvýznamější metabolit oxidu dusnatého. Buňky imunitního systému produkují O₂^{•-} a NO[•] ve vysokých koncentracích v průběhu zánětlivých procesů. Za těchto okolností je NO[•] jediná biologická molekula, která může kompetovat s SOD o superoxid. Výsledkem reakce je anion peroxynitritu způsobující fragmentaci DNA a lipoperoxidaci. Stejně jako peroxid vodíku je i peroxynitrit relativně slabým oxidantem, ale jeho protonovaná forma je vysoce reaktivní. Reaguje s prostetickými skupinami enzymů. Hlavním biologickým cílem jsou aromatické aminokyseliny (tyrozin, tryptofan, fenylalanin) u nichž podporuje nitrace (Valko et al. 2007).



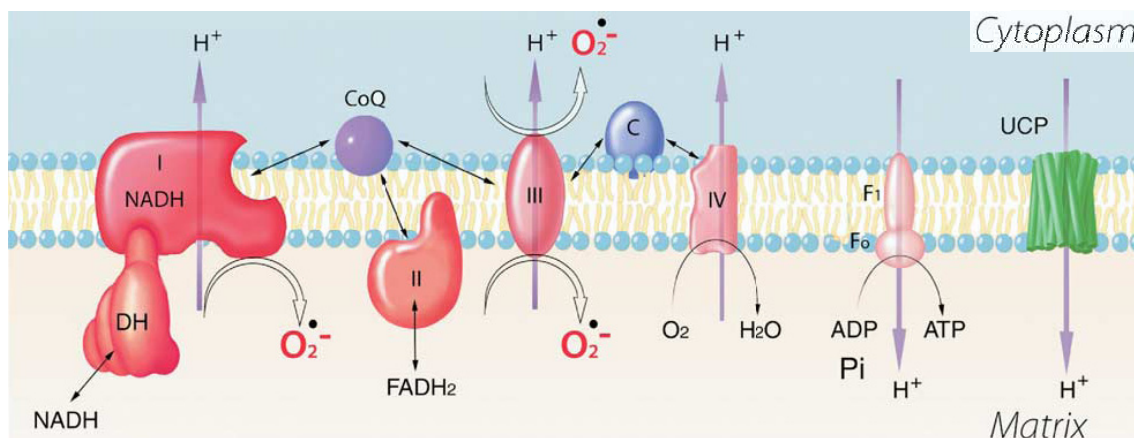
3 Fyziologické funkce a význam volných radikálů pro organismus

Mnoho prací posledních let je zaměřeno na vztah volných radikálů a fyziologických funkcí, demonstrují velkou variabilitu působení volných radikálů na metabolické dráhy i na využití řady metabolických cest k jejich vzniku. Podle Finkela 2003 je možné se domnívat, že kvalita i kvantita volných radikálů (i doba jejich působení) může zčásti vysvětlit tu ohromnou různost jejich efektu. O tom, že kromě destrukce některých buněčných struktur a biomolekul působí volné radikály ku prospěchu buňky např. v buněčné signalizaci je pojednáno v následujících kapitolách, které jsou jen stručnými poznámkami k těmto problémům.

3.1 Mitochondrie – dýchací řetězec

Oxidoredukční reakce mají pro metabolismus organismů obrovský význam. Pro život snad nejvýznamější je dýchací řetězec, jehož prostřednictvím lze získat volnou energii, kterou je možné uvolnit pouze přenosem elektronů na kyslík. Metabolismus všech aerobních organismů je tedy závislý na spojení dýchacího řetězce s oxidativní fosforylací. Dýchací řetězec (viz. obr.2) představuje sled na sebe napojených redoxních párů nacházejících se ve vnitřní mitochondriální membráně přenášející atomy vodíku a poté jeho elektrony na atmosferický kyslík. Poslední skupinu přenašečů tvoří enzym cytochromoxidasa, která na kyslík postupně přenesse čtyři elektrony. Vzniklý anion $O_2^{\cdot-}$ okamžitě reaguje s okolními protony a vytváří dvě molekuly vody a uvolněná energie se využije pro syntézu ATP.

Mitochondriální dýchací řetězec je složen z několika komplexů oxidoredukčních center, ze kterých mohou elektrony uniknout na kyslík a stát se tak zdrojem superoxidu v mnoha tkáních (Balaban et al. 2005). Za produkci $O_2^{\cdot-}$ v srdeční a plicní tkáni se zdá být zodpovědný komplex III, v mozkové tkáni komplex I. Tvorba superoxidu probíhá na vnější mitochondriální membráně, v matrix i na obou stranách vnitřní mitochondriální membrány. Superoxid vznikající v matrix je zde i eliminován. Naproti tomu část $O_2^{\cdot-}$ z intermembránového prostoru se může dostat aniontovými kanály do cytoplazmy.



Obr.2. Dýchací řetězec znázorňující hlavní místa produkce superoxidu v mitochondriích. Velikost redoxního potenciálu klesá od komplexu I ke komplexu IV. Převzato z Balaban et al. 2005.

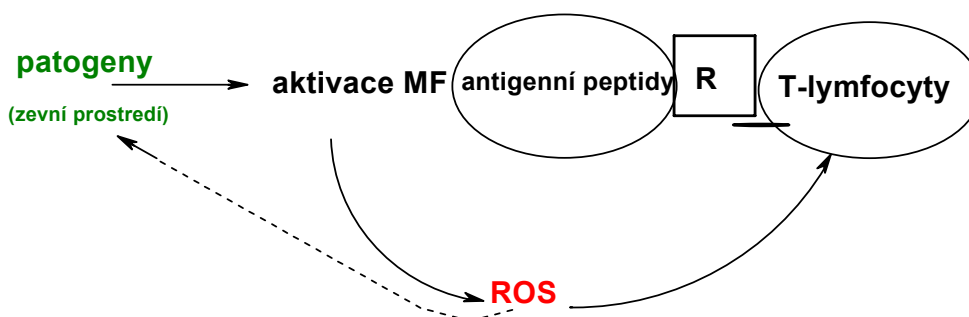
Součástí komplexu III je koenzym Q, který je plně redukován na vnitřní straně membrány a pak migruje na její vnější stranu a nese s sebou 2H^+ , které jsou důležité pro udržování fosforylace ADP. Hned na vnější straně membrány je jeden elektron přenesen na cytochrom c_1 a vzniká $\text{Q}\cdot$. Druhý elektron se využije k redukci cytochromu b, ale občas nějaký elektron unikne na kyslík a zredukuje ho na superoxid. Pokud dojde k přenosu elektronu na kyslík, nemůže být za fyziologických podmínek redukován cytochrom b. Díky tomuto cyklu koenzymu Q mohou některé inhibitory dýchací řetězce jako je například antimycin, který se váže na cytochrom b, zvyšovat koncentraci radikálu koenzymu $\text{Q}\cdot$ a tím i produkci superoxidu. Koenzym Q je zdrojem $\text{O}_2\cdot^-$ když je redukován pouze částečně (semichinonová forma) a antioxidantem je-li redukován plně.

Jako obranu proti tvorbě superoxidu, jehož následnou redukcí vznikají další ROS, má mitochondrie k dispozici antioxidantní mechanismy. V matrix se nachází specifická forma SOD mající v aktivním centru mangan, která odstraňuje superoxid vzniklý v matrix nebo na vnitřní straně membrány. Koncentrace $\text{O}_2\cdot^-$ v intermembránovém prostoru je kontrolována třemi odlišnými mechanismy - isoenzymem SOD obsahujícím místo manganu měď, spontánní dismutací superoxidu a cytochromem c, který tu může být redukován superoxidem. Redukovaný cytochrom pak přeneše elektrony na cytochrom-oxidasu. Elektrony, které unikly z dýchacího řetězce mohou tedy re-redukovat cytochrom c a ještě přispívat k produkci energie. Posledním mechanismem je spontánní dismutace superoxidu v intermembránovém prostoru, která je usnadněná nízkým pH vlivem H^+ (Turrens 2003).

Všechny reaktivní metabolity kyslíku zůstávají za fyziologických podmínek navázány na enzymy dýchacího řetězce nebo jsou eliminovány výše uvedenými obrannými mechanismy. Na redukci atmosférického kyslíku závisí existence všech aerobních organismů, tedy i člověka.

3.2 Imunitní ochrana

Profesionální fagocyty představují klíčový obranný mechanismus proti invadujícím mikrobiálním patogenům. Fagocyty jsou aktivovány stimulací Fc-receptoru, C3b a C5a složkami komplementu a dalšími působky. Po tzv. opsonizaci adherují bakterie k povrchu fagocytů a jsou uzavřeny do tělíska zvaného fagosom. Fagosom později fúzuje s lysozomy přítomnými ve fagocytech. Lysozomy představují tělíska, ve kterých se nachází desítky hydrolytických enzymů. Stoupne spotřeba molekulárního kyslíku tzv. respirační vzplanutí, aktivuje se NADPH oxidasa, jejímž působením vzniká velké množství ROS. Působením NADPH oxidasy se kyslík redukuje na superoxid. Elektrony dodává NADPH, který se vytváří při oxidaci glukosy v hexosomonofosfátovém cyklu. Ze superoxidu vznikají další reaktivní formy jako peroxid vodíku, který reaguje s chloridovým aniontem produkovaným enzymem myeloperixidasou. Výsledkem reakce jsou chlornanové anionty ClO^- mající silný mikrobicidní efekt. Tato vysoká produkce ROS slouží organismu k eliminaci mikrobů a ostatních cizorodých agens.



Obr.3. Zjednodušené schéma příkladu imunitní odpovědi na vnější patogeny (upraveno podle Dröge 2002). ROS-reaktivní formy kyslíku, MF-makrofágy, R-receptor antigenních proteinů.

V ochraně organismu před patogeny hrají velkou roli lymfocyty. Ty jsou aktivovány pomocí antigenních peptidů prostřednictvím příslušných receptorů i množstvím volných radikálů kyslíku. Např. v průběhu tuberkulózního onemocnění

produkují makrofágy velké množství ROS, které snižují účinnost *M. tuberculosis* (Mukhopadhyay et al. 1999).

Aktivací makrofágů patogeny většího prostředí se náhle zvýší množství volných kyslíkových radikálů, které působí na T-lymfocyty, které jsou schopné vytvořit podmínky pro specifickou imunitní odpověď buňky. Viz. obr.3.

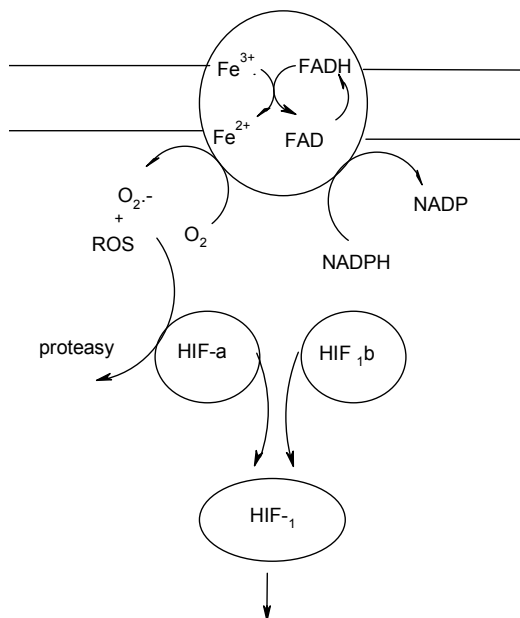
3.3 Buněčná signalizace

Buněčné pochody jsou řízeny intracelulárními a extracelulárními signály, které díky molekulární informační síti ovlivňují aktivitu enzymů a tím i životní program buňky. Extracelulárním signálem i spouštěčem přenosu informace jsou hormony, růstové faktory, cytokiny, neurotransmitery aj., které mohou působit na expresi určitých genů, modulovat aktivitu RNA polymerasy II a tak regulovat množství signálu a jejich účinnost (Štípek et al. 2000, Valko et al. 2007). Membránové receptory jsou senzorem extracelulárních signálů, ale i čidlem změn intracelulárních podmínek každé buňky.

Molekuly ROS i RNS představují důležitou součást buněčné signalizace i když mechanismus jejich funkce není zcela objasněn (Chen et al. 2003, Dröge 2002, Thannickal a Fanburg 2000). Jsou považovány za signální molekuly nebo mediátory přenosu signálu v závislosti na jejich koncentraci a chemické podstatě. Při vysokých koncentracích brzdí buněčný cyklus, způsobují poškození buňky či její smrt. Nízké koncentrace stimulují proliferaci. ROS se uplatňují např. jako sekundární poslové, regulují koncentraci cytosolového Ca^{2+} , fosforylaci proteinů, aktivují některé transkripční faktory jako jsou AP-1, NF- κ B, p53 a další (Valko et al. 2006).

Superoxidový radikál i hydroxylový radikál mají krátký biologický poločas. Superoxid prochází biologickou membránou pomocí iontových (aniontových) kanálů a působí jako parakrinní mediátor, zatímco hydroxylový radikál pouze v místě vzniku. Mechanismus působení peroxidu vodíku je porovnáván s NO oproti němuž má delší biologický poločas, je stabilní v porovnání se superoxidem, prochází membránami a působí jako apokrinní i parakrinní mediátor (Magder 2006). Významně ovlivňuje SH-skupiny řady proteinů a tím mění jejich strukturu a funkci - oxiduje je na disulfidy (S-S), sulfenily (-SO₂H), sulfony (-SO₃H). Schéma oxidací SH-skupin je na obr.4.

k tomu, že tento faktor ovlivňuje řadu funkcí - energetický metabolismus, množství erythropoetinu, buněčnou proliferaci aj., je studium jeho transkripční aktivity značně závažné.



Obr.5. Schéma regulace transkripčního faktoru HIF-1 na které se podílí ROS. Převzato z práce Dröge 2003.

Některé závěry *in vitro* pokusů řady pracovišť podporují přijímanou hypotézu, že volné radikály kyslíku i dusíku jsou zapojeny do informačního systému buňky a spolupůsobí při regulaci: a) růstové hormony a cytokininy generují velké množství volných radikálů, které způsobí předpokládané změny v různých buňkách, b) antioxidanty a inhibitory systémů, které jsou schopny generovat ROS inhibují funkce růstových faktorů a cytokininů, c) exogenní podání oxidačních činidel (peroxid vodíku) vrací biologické funkce RF a cytokininu na úroveň neinhibovaných systémů (Thannickal a Fanburg 2000).

Receptory různých růstových faktorů, cytokinů a dalších důležitých molekul jsou současně ovlivněny zvýšenou aktivitou NADPH oxidasy, tedy zvýšenou produkcí ROS, které zpětně na tyto receptory působí. Předpokládá se, že aktivita tohoto enzymu a jejich isoenzymů právě jako změna redox homeostázy buňky jsou *in vivo* odpovědné za regulaci nebo selhání regulace některých fyziologických funkcí (Dröge 2002).

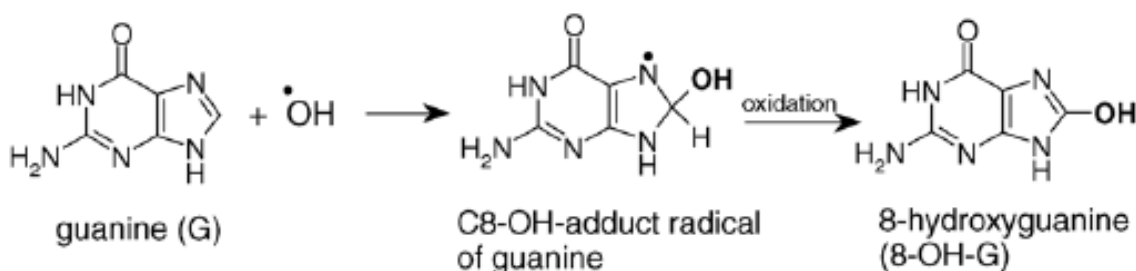
Příkladů je v literatuře velké množství, často velmi složitých a přesahují cíle předložené práce.

4 Oxidační stres a poškození biomolekul

4.1 Mitochondriální a jaderná DNA

ROS jsou vytvářeny nejrůznějšími cestami. Odhaduje se, že lidská buňka je vystavena přibližně $1,5 \cdot 10^5$ oxidativních zásahů za den. Je známo, že hydroxylový radikál reaguje se všemi součástmi DNA molekuly. Soustavná modifikace genetického materiálu vyústí v oxidativní poškození, které lze chápat jako první krok k mutagenезi, karcinogenезi a stárnutí. Poškození DNA vyvolané volnými radikály se vyskytuje v nejrůznějších rakovinných tkáních. Bylo identifikováno více než 100 produktů oxidace DNA. ROS vytvářejí jedno nebo dvouvláknové zlomy DNA, křížové vazby mezi molekulami DNA a modifikují purinové a pyrimidinové baze. Tyto modifikace mohou vést k zastavení transkripce, replikačním chybám, k indukci některých signálních cest a celkové nestabilitě genomu (Valko et al. 2006).

Hydroxylový radikál může vyjmout vodíkový atom z deoxyribózy a způsobit destrukci sacharidu a přerušení řetězce. Je schopen se připojovat k purinovým a pyrimidinovým bazím a přeměňovat je na hydroxy- a oxoderiváty (Štípek et al. 2000). Příkladem je tvorba 8-hydroxyguaninu (viz.obr.6). Jeho přítomnost v lidské moči byla poprvé zaznamenána Amesem a spolupracovníky (Shigenaga et al. 1989). Sledování hladin 8-hydroxyguaninu je důležité, protože jeho zvýšené množství je markerem poškození DNA.



Obr.6. Reakce guaninu s hydroxylovým radikálem. Převzato z práce Valko et al. 2006.

Modifikace bazí se objevují přibližně jedna v 10^5 guaninových zbytcích v buňce za fyziologických podmínek. Kouření a ostatní karcinogenní zdroje ROS zvyšují oxidativní poškození DNA o 35-50%. Tato čísla se odhadují z exkrece 8-oxoguaninu močí a z hladiny 8-oxoguaninu v leukocytech. Výsledky výzkumu Kasai et al. ukázaly,

že těžká fyzická práce, práce na denní–noční směny, kouření a nízký příjem masité stravy podstatně zvyšují jeho hladinu, zatímco mírná fyzická aktivita jako je sport hladinu spíše redukuje (Kasai et al. 2001). Získaná data porovnaná s předchozími výsledky získanými ze studií na krysách podporují názor, že náš životní styl může značně ovlivňovat úroveň oxidativního poškození.

I reaktivní formy dusíku – peroxyinitrit a oxidy dusíku se rovněž účastní poškozování DNA. Peroxyinitrit může vytvářet 8-nitroguanin. Jaké je spojení mezi jeho tvorbou a kancerogenezi není zatím známo.

V procesu kancerogeneze hraje roli poškození mitochondriální DNA (mtDNA). Mutace a pozměněná exprese mitochondriálních genů kódujících komplexy I, II, IV a V a mutace v hypervariabilních oblastech mtDNA byly nalezeny u různých typů rakoviny. V porovnání s jadernou je mitochondriální DNA daleko více náchylná k oxidaci, má limitovanou opravnou kapacitu a není chráněna histony. Množství informací ze studií mtDNA podporuje účast mitochondrií na vzniku rakoviny, ale dosud to nebylo uspokojivě prokázáno. Někteří vědci se domnívají, že úseky mtDNA nalezené jako inserty v jaderné deoxyribonukleové kyselině naznačují možný mechanismus aktivace onkogenů (Valko et al. 2006).

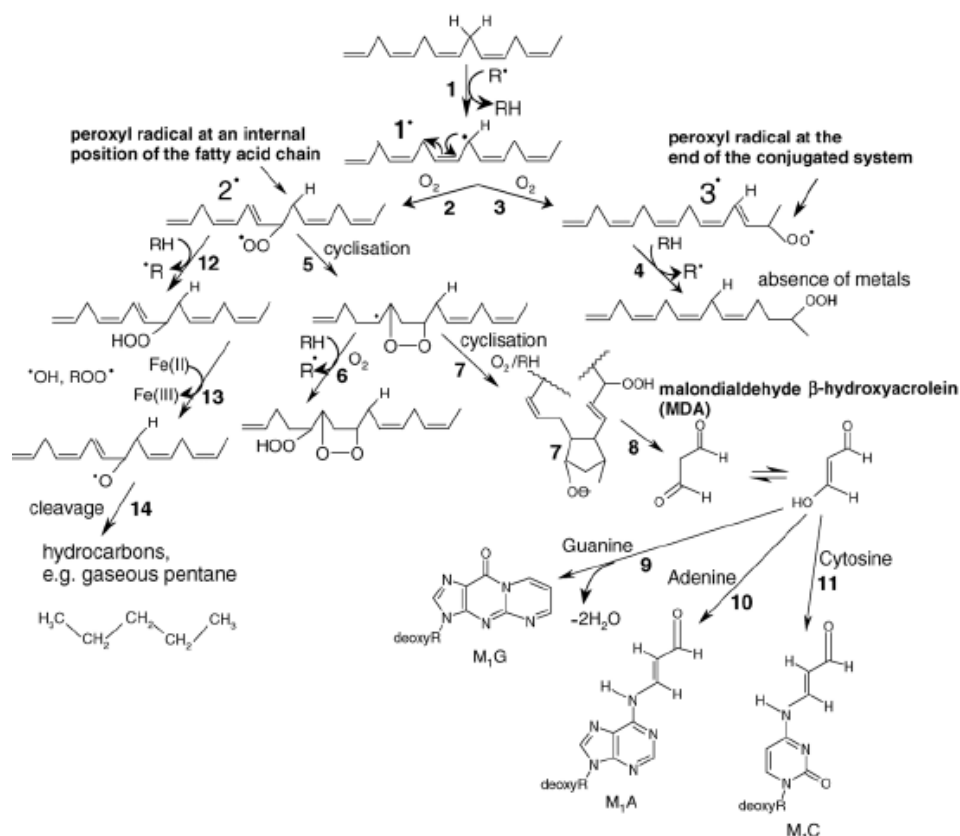
DNA však není poškozena nenávratně. Buňky disponují opravnými mechanismy (de Boer a Hoeijmakers 2000). Na zlomy v DNA se naváže poly(ADP)-ribosapolymerasa (PARP) a současně je indukována syntéza transkripčního faktoru p53, který je produktem supresorového genu a přesouvá se do jádra, aby zastavil buněčný cyklus. V tomto stádiu se signální mechanismy rozhodují, zda DNA opravit, či aktivovat kaskádu kaspas (=cysteinových proteas), které spustí proces apoptózy. Je-li rozhodnuto ve prospěch opravy, PARP sama sebe modifikuje, oddělí se od DNA a poly(ADP) se odbourá. Nastoupí enzymový reparační systém, který je ale energeticky náročný a veškeré opravy mohou nakonec vést k nekróze buňky (Štípek et al. 2000). V jaderné DNA je 90% oxidovaných bazí opraveno jednonukleotidovou excizí a zbývajících 10% složitějším mechanismem zvaným long-patch (vystřížení bazí). Například jednonukleotidová bazová excize je primární cestou opravy 8-hydroxyguaninu.

Zajímavá je také skutečnost, že účinnost opravných mechanismů může být usnadněna reaktivními formami kyslíku, protože exprese mnoha reparativních enzymů je řízena mírou oxidativního stresu (Valko et al. 2006).

4.2 Peroxidace lipidů

Je známo, že kovem indukovaná tvorba kyslíkových radikálů nenapadá pouze molekuly DNA v buněčném jádře, ale i ostatní buněčné součásti například polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) ve fosfolipidové membráně, které jsou velmi citlivé k oxidaci. Několik experimentálních *in vivo* modelů předávkování železem potvrdilo nárůst oxidace PUFA v jaterních mitochondriích a lysozomech. Bacon et al. po orálním podání karbonyl železa pozorovali u krys peroxidaci lipidů, která je doprovázena podstatným snížením metabolismu mitochondrie (Bacon et al. 1983). Tyto poznatky svědčí o tom, že mitochondriální PUFA jsou upřednostňovaným cílem peroxidace vyvolané železem. Tyto škodlivé procesy se účastní také vzniku aterosklerózy, rakoviny a zánětu. Peroxidace lipidů probíhá ve třech úrovních: iniciace, propagace a terminace (viz. obr.7). Jednou vytvořený peroxylový radikál ROO^{\bullet} může být cyklizačními reakcemi přeměněn na endoperoxidy (prekurzory malondialdehydu) a v konečném stadiu na malondialdehyd. Hlavním aldehydickým produktem peroxidace je spíše než MDA 4-hydroxy-2-nonenal (HNE). HNE je slabý mutagen, ale zdá se být hlavním toxickým produktem peroxidace. Silně působí na signální cesty a ovlivňuje tak fenotypové vlastnosti buněk. MDA působí mutageně na bakteriální a savčí buňky a kancerogenně na krysí. Je schopný reagovat s guaninem, adeninem a cytosinem a vytvářet adukty M_1G , M_1A a M_1C .

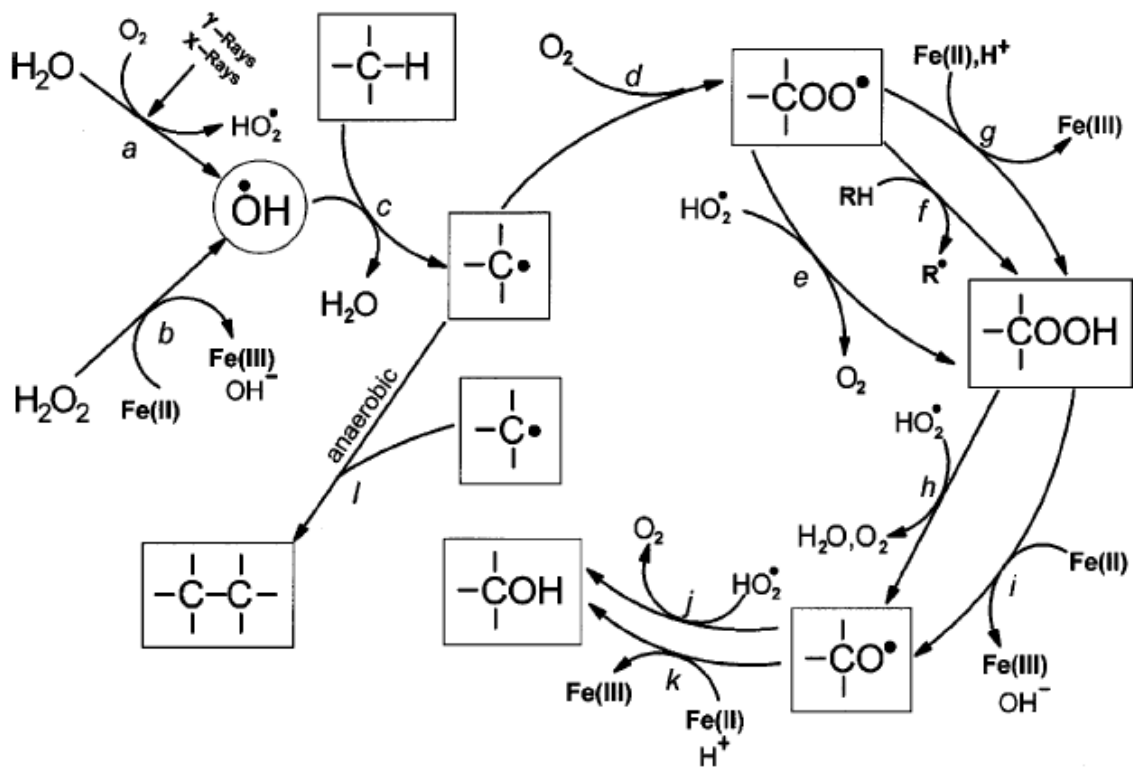
M_1G adukty se nacházejí v širokém spektru tkání od hladin limitu detekce až po hodnoty např. 6000 aduktů na buňku. Byly detekovány u lidí v tkáni prsu, v tkáni hlodavců a specifické experimenty potvrdily jeho mutagenitu. NMR spektroskopie molekuly ukázala, že M_1G podstupují rychlé otevření kruhu a vzniká N^2 -oxo-propenylguanosen, který je přítomný v dvouvláknové DNA, ale nevyskytuje se v DNA jednovláknové. Přestavba M_1G a N^2 -oxo-propenal-deoxyguanosinu uvnitř DNA může vést ke tvorbě křížových vazeb DNA-DNA nebo DNA-protein (Valko et al. 2006).



Obr.7. Metylenové skupiny polynenasycených mastných kyselin jsou vysoce náchylné k oxidaci a jejich vodíkové atomy po interakci s radikálem jsou přesunuty a vytvoří se radikál na uhlíkovém atomu uvnitř řetězce (reakce 1), který reaguje s molekulárním kyslíkem za vzniku peroxylového radikálu (reakce 2 a 3). Jestliže je peroxylový radikál lokalizován na jednom z konců řetězce (3') dochází k jeho redukci na hydroperoxid, který je za nepřítomnosti kovů relativně stabilní (reakce 4). Peroxylový radikál nacházející se uvnitř uhlíkatého řetězce mastné kyseliny (2') může podlehnout cyklizační reakci a přeměně na cyklický peroxid (reakce 5). Vzniklá struktura může být jednak redukována na hydroperoxid (reakce 6) nebo, jak ukazuje reakce 7, může podstupovat sekundární cyklizaci a vytvářet bicyklický peroxid, který po spárování se s kyslíkem a další redukcí poskytuje molekulu strukturně analogickou k endoperoxidu. Sloučenina 7 je intermediárním produktem pro tvorbu malondialdehydu (reakce 8), který je schopný reagovat s DNA bazemi guaninem, adeninem a cytosinem a vytvářet adukty M_1G , M_1A a M_1C (reakce 9-11). Peroxylový radikál lokalizovaný uvnitř řetězce může kromě cyklizace také vytrhnout vodíkový atom ze sousední molekuly mastné kyseliny a takto vytvořit hydroperoxid (reakce 12), který dále reaguje s redoxními kovy např. železem a produkují reaktivní alkoxylové radikály RO^\bullet (reakce 13). Po rozštěpení (reakce 14) mohou RO^\bullet vytvářet například plynný pentan, což je dobrý marker peroxidace lipidů (Valko et al. 2006).

4.3 Proteiny

Volné aminokyseliny a rezidua aminokyselin proteinů jsou vysoce náchylné k oxidaci reaktivními formami kyslíku, které jsou přítomné jako polutanty v atmosféře, tvořeny jako meziprodukty fyziologických procesů a nebo vznikají během expozice radiačnímu či ultrafialovému záření. Mechanismy těchto oxidačních reakcí byly objasněny studiemi, ve kterých roztoky aminokyselin, jednoduchých peptidů a proteinů byly vystaveny ionizujícímu záření, přičemž vznikaly hydroxylové a superoxidové radikály. Výsledky studií prokázaly, že reakce s OH^\bullet vede k vytržení atomu vodíku z α -uhlíku aminokyseliny a vytvoření radikálu na centrálním uhlíku tzv. carbon-centred radical (reakce *c*), z něhož v přítomnosti kyslíku vzniká peroxylový radikál (reaction *d*) a ten je ihned přeměněn na alkylperoxid reakcí s protonovanou formou superoxidového radikálu (reaction *e*) nebo vytržením atomu vodíku z další molekuly (reaction *f*). Další reakce s HO_2^\bullet mohou vést ke vzniku alkoxylového radikálu (reaction *h*) a jeho konverzi až k hydroxyderivátům (reaction *j*). Tato reakční posloupnost byla zjištěna za užití ionizující záření *in vitro*, ale stejné procesy mohou být zahájeny Fentonovou reakcí, která je hlavním zdrojem HO^\bullet *in vivo* za fyziologických podmínek. Železo je schopno nahradit HO_2^\bullet v reakci vedoucí k vytvoření alkyl peroxidu, alkoxylového radikálu i hydroxyderivátů (reakce *g*, *i*, *k*). V nepřítomnosti kyslíku C-CR spolu vzájemně reagují za vytvoření vazby tzv. carbon-carbon cross-linked (reakce *l* na obr.8) (Stadtman a Levine 2003, Valko et al. 2006, Dean et al. 1997). Boční řetězce aminokyselinových zbytků některých proteinů jsou snadno oxidovány systémem kovovým iontem katalyzované oxidace (ion-catalyzed oxidation). Při studiích s glutamylsyntetasou *E. Coli* se zjistilo, že aminokyselinová rezidua nacházející se v místě vazebných míst pro kovy jsou jednoznačně citlivá ke kovem katalyzované oxidaci (Stadtman a Oliver 1991) místně specifickým mechanismem.

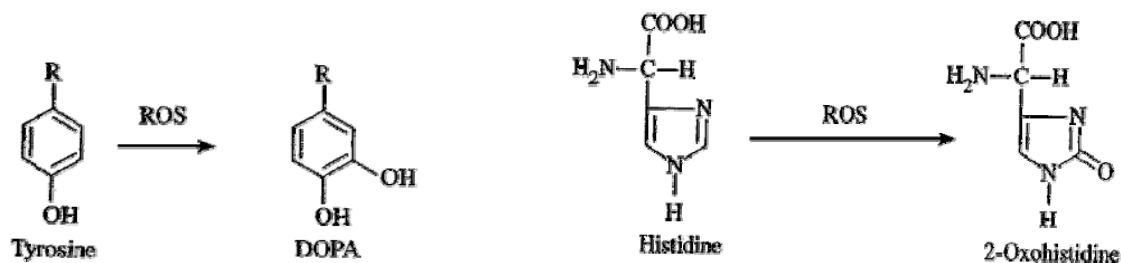


Obr.8. Ukazuje schéma oxidace proteinové kostry polypeptidů zprostředkované volnými radikály. Bližší popis je obsažen výše v textu (Stadtman a Levine 2003).

Podle tohoto mechanismu chelátový komplex vznikající vazbou Fe^{II} k amino skupině lysinu může reagovat s peroxidem vodíku a generovat hydroxylový radikál, který bude přednostně atakovat lysinové části a tak ho přeměňovat na semialdehyd 2-aminoadipové kyseliny. Podobné reakce Fe^{II} s ostatními aminokyselinami vedou ke tvorbě karbonylových derivátů.

Vysoce reaktivní deriváty a fragmenty proteinů obsahující karbonylové skupiny (aldehydy a ketony) jsou vytvářeny různými reakcemi: přímou oxidací lysinových, argininových, prolinových a threoninových reziduí bočních řetězců peptidů, rozštěpením peptidických vazeb, reakcemi primárních aminoskupin lysinu s redukcujícími cukry (= glykace proteinů), Michaelovými adicemi lysinu, cysteinu nebo histidinu s α , β -nenasycenými aldehydy vytvářenými během peroxidace polyneenasycených mastných kyselin. Jelikož přítomnost karbonylových derivátů proteinů odráží míru oxidace způsobenou ROS, používají se jako marker oxidativního poškození proteinů.

Aromatické aminokyseliny jsou primárním cílem nejrůznějších forem ROS. Fenylalanin je oxidován na ortho- a meta-tyrosinové deriváty, tyrosin je přeměňován na 3,4-dihydroxydopaminové nebo bityrosinové deriváty a histidin je konvertován na 2-oxohistidin.



Obr.9. Oxidace aromatických aminokyselin.

Methionin a cystein jsou velmi citlivé k oxidaci téměř všemi druhy ROS, ale pozoruhodné je, že narozdíl od ostatních oxidací, je oxidace síru obsahujících aminokyselin reverzibilní. Skoro všechny formy ROS oxidují methioninová rezidua na směs R- a S-izomerů methioninsulfoxidu. Organismy obsahují methioninsulfoxid reduktasu, která katalyzuje na thioredoxinu závislou redukci sulfoxidů zpět na methionin. Předpokládá se, že cyklická oxidace/redukce methioninových reziduí může sloužit jako antioxidant vylučující ROS a také usnadňující regulaci některých enzymatických funkcí (Stadtman a Levine 2003).

Proteiny jsou velmi náchylné k modifikacím způsobeným peroxynitritem, který je produkován endogenní reakcí oxidu dusnatého se superoxidovým radikálem. Peroxynitrit reaguje též s oxidem uhličitým za vzniku (ONOCO₂⁻) nitrosoperoxykarbonátu, který je primárně zodpovědný za nitrace tyrosinu. Samotný peroxynitrit způsobuje oxidace methioninu na methionin sulfoxid a nitrace SH-skupin proteinů.

Cyklická fosforylace/defosforylace nebo adenylace/deadenylace hydroxylových skupin tyrosinových reziduí některých enzymů a signálních molekul představuje důležitý mechanismus regulace buněčných funkcí. Velká pozornost se věnuje efektu nitrace tyrosinu na aktivitu proteinů.

Při zánětu produkují neutrofilové superoxidový radikál a také uvolňují myeloperoxidasu, která katalyzuje konverzi peroxidu vodíku a chloridového aniontu na kyselinu chlornou. HOCl oxiduje methionin, chloruje tyrosin, dává vznik chloraminovým derivátům animoskupin lysinu, oxiduje sulfhydrylové skupiny. Další

reakce HOCl s $\text{O}_2^{\cdot -}$ vede k produkci HO^{\cdot} , který představuje další mechanismus iniciace oxidace proteinů.

Akumulace oxidovaných proteinů roste s věkem a je spojena se stárnutím organismu a nemocemi se stárnutím spojenými - diabetem mellitem, Alzheimerovou chorobou, amyotrofickou laterální sklerózou, kataraktem, aterosklerózou a mnoha dalšími. Hladina oxidovaných proteinů závisí na poměru mezi ROS a antioxidanty a schopnosti je proteolyticky eliminovat a v neposlední řadě i na genetických faktorech a individuálním životním stylu (Stadtman a Levine 2003).

5 Onemocnění spojená s oxidativním stresem

Oxidativní stres je definován jak nerovnováha mezi produkcí oxidačních látek a antioxidační kapacitou buňky, jejíž funkcí je předcházet a eliminovat oxidativní poškození. Oxidativní stres je spojován se vznikem kardiovaskulárního onemocnění, rakoviny, neurodegenerativních poruch, diabetu, ischemicko-reperfúzního poškození, stárnutí a dalších.

Nemoci vznikající v souvislosti s oxidativním stresem lze rozdělit do dvou hlavních skupin. První kategorie zahrnuje především diabetes mellitus a rakovinu. Charakteristickým rysem je prooxidativní posun v thiol/disulfidovém redoxním stavu a snížení clearance glukosy. Stav se nazývá „mitochondriální oxidační stres“, kde hlavním zdrojem ROS jsou mitochondrie kosterních svalů. Do druhé skupiny se řadí onemocnění vyznačující se tzv. inflamatory oxidative conditions – zánětlivě oxidačními podmínkami a zvýšenou aktivitou NAD(P)H oxidasy nebo xantinoxidasy, které nacházíme zejména u kardiovaskulárních nemocí – aterosklerózy, hypertenze (Valko et al. 2007, Dröge 2002). V následujícím textu je pozornost věnována pouze vybraným chorobám, jejichž vznik určitým způsobem souvisí s nadměrnou produkcí ROS.

5.1 Rakovina

Rakovina je v Evropě stále jednou z nejčastějších příčin úmrtí. Přes obrovské úsilí vyvíjené v oblasti výzkumu a významné pokroky dosažené v boji s touto hrozbou (lékařská věda v současnosti dokáže vyléčit každý druhý případ rakoviny) zůstává rakovina problémem veřejného zdraví. Některé druhy rakoviny lze léčit nebo je u nich alespoň podstatně větší naděje na vyléčení, pokud se na ně přijde včas (Zdraví EU, http://ec.europa.eu/health-eu/health_problems/cancer/index_cs.htm).

Jako rakovinu označujeme skupinu nemocí, které se vyznačují nekontrolovaným buněčným dělením a schopností těchto rychle se dělících buněk napadat jiné tkáně a rozšiřovat se do jiných částí těla, tzv. metastáze. Ke vzniku rakoviny dochází tehdy, když je genetickými nebo environmentálními faktory poškozena DNA takovým způsobem, že dojde k deregulaci buněčného dělení. Když jsou normální buňky poškozené nebo staré, spustí program kontrolované buněčné smrti - apoptózu, ale

rakovinové buňky se však dokáží apoptóze vyhnout (<http://cs.wikipedia.org/wiki/Rakovina>).

Nerovnováha v redoxním stavu buňky se nachází u rakovinných buněk v daleko větší míře v porovnání s buňkami nerakovinnými a může souviset s onkogenní stimulací. Neustálá modifikace genetického materiálu plynoucí z oxidativního poškození představuje první krok k mutagenезi, kancerogenezi a stárnutí. Mutace v DNA zvyšující míru jejího poškození byly pozorovány v nejrůznějších druzích nádorů. DNA léze mohou vyústit buď v zastavení nebo indukci transkripce, signálů transdukčních cest, replikačním chybám a nestabilitě genomu. Mutace a pozměněná exprese genů hrají klíčovou roli při vzniku rakoviny (Valko et al. 2007).

Aberantní signální mechanismy se pojí s různými patologickými stavy. Jedním z nejzákladnějších procesů zprostředkovaný přenosem signálu je buněčný růst. Modifikace procesů regulujících životní cyklus buňky mohou vést k rakovině. Abnormální chování neoplastických buněk bývá důsledkem změn v signálních mechanismech týkajících se např. receptorů tyrosinkinas, pozměněných hladin specifických růstových faktorů, intracelulárních procesů vedoucích signál z povrchu buněčné membrány do jádra, podílu transkripčního aparátu a genů zúčastněných na regulaci buněčného cyklu a replikaci DNA. Prokázalo se, že ROS interferují s expresí několika genů a jsou tedy nápomocné kancerogenezi. Mechanismus regulace buněčného růstu je velmi komplexní a role ROS závisí na jejich typu a koncentraci. Abnormality v receptoru růstového faktoru jsou úzce spjaty s mnoha typy rakovin.

Dalším důležitým proteinem je AP-1, jehož role v aktivaci kancerogeneze je dobře dokumentována v mnoha pracích. Aktivace AP-1 vede ke zvýšení buněčné proliferace. AP-1 také funguje jako pozitivní i negativní regulátor apoptózy. Zda-li AP-1 navodí či zastaví apoptózu je závislé na rovnováze mezi pro- a proti-apoptotickými cílovými geny a na délce trvání podnětu (Valko et al. 2006).

NF- κ B je transkripční faktor regulující několik genů zúčastněných v buněčné transformaci, proliferaci a angiogenezi (Thannickal a Fanburg 2000). Přílišná aktivace NF- κ B vede pro jeho účast na diferenciaci a buněčném růstu také ke kancerogenezi. Kancerogeny jako jsou toxické kovy, UV radiace, azbest, alkohol, benzopyreny a další patří mezi vnější faktory aktivující NF- κ B. Exprese NF- κ B napomáhá buněčné proliferaci, kdežto inhibice NF- κ B aktivace ji zablokuje (Valko et al. 2007). Reaktivní formy kyslíku mohou být považovány za druhé posly, které cestou TNF- α a IL-6 aktivují NF- κ B (Poli et al. 2004).

Tumor supresorový protein p53 hraje klíčovou roli v ochraně buňky před kancerogenezí. Mutace v tomto proteinu mohou vést k jeho inaktivaci, která byla nalezena u více než poloviny rakovin. Protein je aktivován UV zářením, hypoxií, γ -paprsky aj. Zabraňuje rozštěpení řetězců DNA buď do doby než jsou provedeny chromozomální opravy nebo než buňka vstoupí do apoptózy. Může také přispívat k expresi mnoha genů pro antioxidační látky.

5.2 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus je onemocnění charakterizované hyperglykemií, která může být způsobena nedostatkem či rezistencí buněk na inzulin. Rozlišují se dva typy diabetu. Typem I tzv. IDDM trpí asi 10% pacientů, rozvíjí se v ranném věku a je pro něj typická destrukce β -buněk pankreatu, které jsou zodpovědné za produkci inzulinu. Typ II (NIDDM) postihuje zbývajících 90% pacientů, nejčastěji se rozvíjí u starších, obézních pacientů. Hyperglykémie je v tomto případě způsobena relativním nedostatkem inzulinu, který je sice vytvářen, ale nedostává se do buněk – tzv. inzulinová rezistence.

Diabetes mellitus je vždy provázen oxidačním stresem, tj. převahou oxidačních reakcí nad antioxidační ochranou tkání. V krvi a tkáních nemocných se vytváří větší množství reaktivních forem kyslíku a lipoperoxidů a současně se snižují hladiny antioxidačně působících látek a enzymů. Podle současných názorů hraje oxidační stres významnou roli v etiopatogenezi diabetu 1. a 2. typu a má klíčový význam pro vznik a rozvoj diabetických komplikací (Štípek et al. 2000, West 2000).

V případě diabetu je oxidativní stres způsoben prooxidativním posunutím redoxního stavu glutathionu. Zdrojem ROS a tedy i zvýšené hladiny glukosy je několik odlišných mechanismů (Dröge 2002). Klíčovým místem vzniku superoxidu je komplex I a III v mitochondriální membráně, ale u diabetu je primárním místem tvorby $O_2^{\cdot-}$ komplex II. Tento závěr vyplynul ze studie inhibitoru komplexu II v buňkách vystavených vysoké koncentraci glukosy (Yamagishi et al. 2001).

Existuje několik důkazů podporujících fakt, že NAD(P)H oxidasa je hlavním zdrojem produkce ROS v buňkách cévní stěny a ledvin indukované hyperglykemií, což potvrzuje, že je mediátorem diabetických komplikací (Li a Snah 2003). Hypertenze je běžnou komplikací diabetu a je možné, že produkce NAD(P)H oxidasy u těchto dvou onemocnění je podobná. Hyperglykemií indukovaný oxidativní stres se vyskytuje také

u bezjaderných buněk postrádajících mitochondrie a NAD(P)H oxidasu např. erytrocyty. Proto musí existovat ještě jiný způsob tvorby ROS, kterým je autooxidace glukosy (Robertson et al. 2003). Glukosa i její metabolity reagují s peroxidem vodíku za přítomnosti iontů železa, mědi a vytváří se hydroxylový radikál.

Předpokládá se, že i xantinoxidasa by mohla být významným zdrojem ROS při diabetu. Léčba pacientů s NIDDM pomocí inhibitoru XO allopurinolu prokázala snížení hladin oxidovaných lipidů v plazmě a zlepšila průtok krve (Valko et al. 2007).

Aldehydická skupina glukosy může přímo reagovat s volnými aminoskupinami proteinů a lipidů – tzv. glykace, která při zvýšených koncentracích glukosy dosahuje patologické úrovně. Vzniká Shiffova base, která se po určité době přemění na Amadoriho produkt (vytváří se intramolekulárním přesmykem Shiffovy base za vzniku ketoaminu, který je vlastně derivátem fruktosaminu). Pokud tato sloučenina přetrvává týdny až měsíce dochází ke tvorbě konečných produktů pokročilé glykace – tzv. AGE. Celý proces je spontánní bez enzymové katalýzy. Glukosa a AGE podléhají autooxidaci za vzniku superoxidu a dalších ROS, které reagují s Amadoriho produkty za vzniku např. N-karboxymethyllysinu. Některé glykooxidační produkty vytvářejí komplexy s ionty Fe a Cu, které Fentonovou reakcí poskytují hydroxylový radikál. U diabetiků jsou také zvýšené hladiny MDA a HNE pocházející z lipoperoxidace.

Nejvíce se glykace projevuje u proteinů s dlouhým poločasem života jako je kolagen, jehož porušená funkce významně přispívá k ateroskleróze. Z dalších komplikací je to diabetická retinopatie projevující se funkčními a morfologickými změnami v bazální membráně pericytů – buněk, které se nacházejí na vnější stěně vlásečnice a mají schopnost kontrakce a tedy regulace průtoku krve. Dále diabetická nefropatie, která se manifestuje hromaděním depozit AGE, což vede ke glomeruloskleróze (Štípek et al. 2000, Valko et al. 2007, Dröge 2002).

5.3 Neurodegenerativní onemocnění

Dnes se velmi studuje účast ROS na etiopatogenezi těchto onemocnění a výsledky jedné studie mnohdy odporují jiné studii a několik zásadních otázek stále čeká na zodpovězení.

Při neurodegenerativních poruchách zanikají některé populace neuronů, což má za následek vážné psychické a neurologické příznaky. Příčinou bývá genetická abnormalita vyvolávající buď poruchu produkovaného proteinu, který je biologicky

neaktivní nebo vzniká úplně nový a patologický protein a dochází ke ztrátě funkcí poškozených nervových buněk. Většina onemocnění má dědičný podklad, ale není u všech poruch stejně významný. U Huntingtonovy choroby je dědičnost výrazná, u Parkinsonovy se uplatňuje málo.

Podle biochemických důsledků genetické mutace je lze rozdělit do dvou kategorií: na 1) polyglutaminová onemocnění a 2) taupatie a alfa-synukleinopatie. Mimo toto rozdělení se nachází např. amyotrofická laterální skleróza a Wilsonova choroba (Horáček a Motlová 1999).

Polyglutaminová onemocnění jsou charakteristická výskytem mutací, při kterých se patologicky zvýší počet tripletů v jednom genu – tzv. expanze trinukleotidových repetitivních sekvencí. Jedná se většinou o triplet CAG, který při transkripci způsobuje zvýšený výskyt aminokyseliny glutaminu v kódovaném proteinu. Polyglutaminové inkluze se pak hromadí v jádrech neuronů a vedou k jejich poškození. Trinukleotidová expanze se podílí hlavně na rozvoji Huntingtonovy choroby (čím více repetitivních sekvencí, tím dříve choroba propuká).

Druhá skupina je spojena s hromaděním dvou typických proteinů – proteinu tau, který vytváří v neuronu smotek, a proteinu alfa-synukleinu tvořícího v neuronech Lewyho tělíska. Depozice proteinu tau je charakteristická pro Parkinsonovu a Alzheimerovu chorobu, progresivní supranukleární obrnu a některá prionová onemocnění (Horáček a Motlová 1999).

Vedení informace či signálu je uskutečňováno pomocí synapsí na koncích neuronů a jeho přenos je zajišťován neurotransmitery např. acetylcholin, dopamin a další. Degenerace nervových buněk se projevuje nedostatkem těchto přenašečů, z čehož plyne rozvoj příznaků choroby.

Předpokládá se, že významnou roli při vzniku neurodegenerativních nemocí má mitochondrie a oxidativní stres, protože mnoho genů asociovaných s neurodegenerativními poruchami také reguluje mitochondriální funkce, redoxní stav i uvolňování neurotransmiterů do presynaptické štěrbiny. Mitochondrie jsou primárním zdrojem ROS i ATP, regulují hladinu intracelulárního Ca^{2+} a rozhodují o přežití buňky (ve smyslu apoptózy). Neurony vzhledem ke své vysoké metabolické aktivitě a spotřebě velkého množství energie jsou na mitochondriích závislé. Velké množství mitochondrií se nachází na presynaptických úsecích neuronů a nejspíš ovlivňují přenos nervového vzruchu. Omezení účinnosti synaptického přenosu je nápadnou známkou neurodegenerace. Ze vzorků z přední mozkové kůry odebrané *post mortem* od pacientů

ve věku 26-106 let se zjistilo, že po 40. roce geny zúčastněné na regulaci synaptického přenosu i mitochondriálních funkcích mají hladinu exprese sniženou (Keating 2008).

Zvýšená produkce ROS poškozuje buněčné membrány peroxidací lipidů, urychluje mutace v mtDNA, které způsobují snížené přežívání buňky a další tvorbu radikálů. Mozková tkáň je velmi náchylná k oxidativnímu poškození, protože obsahuje vysoký podíl nenasycených mastných kyselin, má vysokou spotřebu kyslíku a relativně malé množství antioxidantních enzymů v porovnání s ostatními orgány (Petrozzi et al. 2007).

V minulých 10-15 letech byl výzkum zaměřen na objasnění účasti mitochondrií a mitochondriálních defektů v oxidativní fosforylaci na vypuknutí neurodegenerativních chorob. Výsledky nedávných studií (Mancuso et al. 2006, Lin a Beal 2006) významně podpořily předpoklad, že mitochondriální disfunkce a oxidativní poškození se podílejí na patogenezi těchto chorob a přispívají ke stárnutí. Stále se však vede široká diskuze, zda-li oxidativní stres a mitochondriální poškození jsou zapojeny do počátku a progresu těchto onemocnění nebo jsou pouze důsledkem neurodegenerace (Petrozzi et al. 2007).

5.3.1 Alzheimerova choroba

Nemoc byla poprvé popsána v roce 1906 Aloisem Alzheimerem (Štípek et al. 2000) jako progresivní neurodegenerativní onemocnění manifestující se ireverzibilní ztrátou funkce neuronů, zejména cholinergního systému. Makroskopicky se projevuje zúžením mozkových závitů, dilatací mozkových komor, atrofií zejména amygdaly, hippocampu a temporálních laloků. Vytvářejí se senilní plaky a intracelulární depozita neurofibrilárních klubek. V senilních placích se ukládají agregáty β -amyloidu, který vzniká štěpením amyloidového prekurzoru APP enzymem β -sekretasou. Za fyziologických podmínek je peptid APP neuroprotektivní, jelikož chrání neurony před glutamátovou neurotoxicitou. APP má však i schopnost vázat a redukovat Cu^{2+} s následnou Fentonovou reakcí (Štípek et al. 2000).

Toxicita agregované formy amyloidu spočívá v tvorbě kalciových kanálů, kterými dochází k neřízenému vstupu vápníku do buňky (Cibičková a Palička 2005). Vysoká hladina Ca^{2+} spustí toxickou kaskádu dějů, které vedou k nekróze či apoptóze nervové buňky. Mitochondrie vystavené vyšší koncentraci vápenatých iontů produkují více ROS. Aktivují se katabolické enzymy. Fosfolipasa A_2 uvolňuje z lipidů kyselinu arachidonovou, jejímž metabolismem jako vedlejší produkt vznikají ROS (Štípek et al.

2000). V mozkové tkáni pacientů s AD byly nalezeny díky lipoperoxidaci lipidů i zvýšené hladiny HNE (Dröge 2002, Valko et al. 2007).

Alzheimerova choroba je pravděpodobně významně ovlivněna lipidovým metabolismem a hypercholesterolémie patří k jejím rizikovým faktorům i když zatím není dostatečně objasněno jakým způsobem. Cholesterol moduluje syntézu a ukládání β -amyloidu a kontroluje interakci mezi β -amyloidem a membránou nervových buněk. Důležitým přenašečem cholesterolu v mozku je apolipoprotein E (Cibičková a Palička 2005).

Se stárnutím organismu dochází ve tkáních k hromadění konečných produktů glykace – AGE a postupně se mění rovnováha mezi jejich vznikem a odstraňováním. AGE se mohou tvořit i v CNS a nakonec se projevit vznikem senilních plaků. Rozhodující úlohu ve stabilizaci agregátů amyloidu hrají právě AGE. Uplatňují se pravděpodobně i v riziku přítomnosti alely, která odpovídá za syntézu apolipoproteinu apoE4. Isoforma apoE4 má ve své struktuře více glykovatelných míst a díky tomu se snadněji připojuje do amyloidních struktur a urychluje tvorbu plaků. Produkt peroxidace lipidů HNE se snadno váže na apoE4 a tím silně podporuje hypotézu, že oxidační stres je významným patogenním mechanismem při rozvoji Alzheimerovy choroby (Štípek et al. 2000).

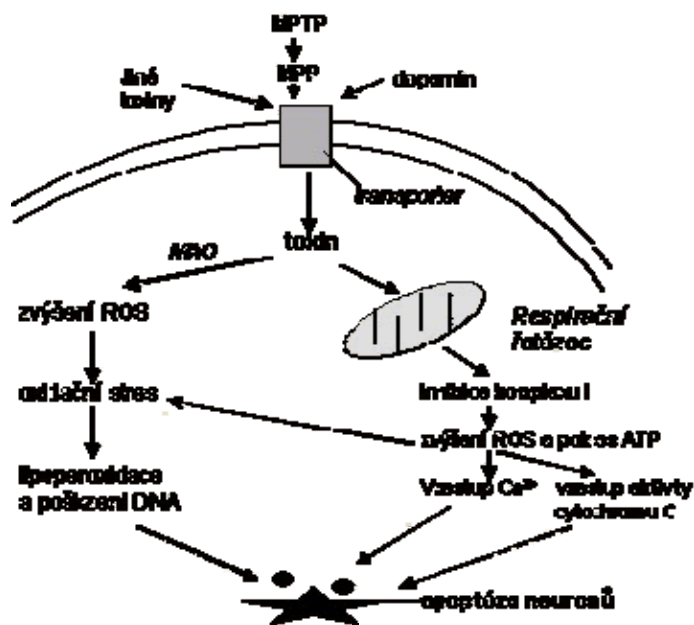
5.3.2 Parkinsonova choroba

Onemocnění poprvé popsal anglický lékař James Parkinson v roce 1817. Parkinsonova choroba vzniká v důsledku destrukce neuronů v další struktuře bazálních ganglií, která se nazývá *substantia nigra* a je důležitá pro zahájení volního pohybu. Degenerace této struktury vede ke svalové ztuhlosti, třesu a omezení hybnosti (Horáček a Motlová 1999). Projevuje se širokou škálou příznaků, z nichž základní jsou bradykineze nebo hypokineze (zpomalení a snížení rozsahu pohybu), dále rigidita (zvýšení svalového napětí tzv. plastickým způsobem) a třes klidového charakteru. Typická je porucha chůze, která se stává pomalou a šouravou. Pacient kráčí malými krůčky a také mizí souhra horních končetin při chůzi. V psychické sféře trpí pacienti často poruchou poznávacích funkcí a depresí, asi u čtvrtiny pacientů se objeví demence (FN u sv. Anny v Brně, <http://web.fnusa.cz/klinika.php?cl=3&kli=4>).

Existují dvě hlavní hypotézy vzniku PD – oxidační stres a α -synukleinový protein. Nejvíce je přijímaná hypotéza oxidačního stresu, který navozuje zánik

dopaminových neuronů v *substantia nigra*. *Substantia nigra* má vysoký metabolický obrat a velké množství oxidabilních substancí. Zvýšená hladina Fe, oxidovaných proteinů, snížené množství glutathionu vedou k vyššímu výskytu volných radikálů např. autooxidací dopaminu vznikají semichinony, chinony a neuromelanin, které představují sloučeniny metabolicky spjaté s tvorbou ROS (Onyango 2008, Štípek et al. 2000).

Látky, které specificky inhibují komplex I v mitochondriálním transportním řetězci způsobují široké neuronální poškození, ke kterému patří patologie PD a výskyt cytoplasmatických inkluzí pozitivních na α -synuklein (Keating 2008). Jak ukazuje obr.10. mitochondriální komplex I může být inhibován neurotoxinem MPTP (což je 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydroxypyridin), který je monoaminooxidasou B měněn na aktivní metabolit MPP^+ selektivně vychytávaný dopaminovým transportérem a následně hromaděný v mitochondriích, kde přeruší funkci komplexu I a aktivuje tvorbu ROS (Štípek et al. 2000, Keating 2008). Při pokusech, kdy byl myším podáván MPTP, se prokázala tvorba hydroxylového radikálu ve striatu, což vedlo k oxidativnímu poškození a mohlo být příčinou zahájení apoptózy. Aktivované gliové buňky byly pozorovány v místech degenerace u PD a pravděpodobně se účastní na zániku neuronů produkcí ROS (Onyango 2008).



Obr.10. Hypotetický mechanismus neurodegenerace u Parkinsonovy choroby. Převzato z Masopust J. (http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_1484.html).

Jiným možným spouštěcím mechanismem je účinek α -synukleinového proteinu, který za fyziologických okolností hraje pravděpodobně důležitou úlohu v ochraně vesikulů s neurotransmitery a pomáhá jejich transporu z buňky do synapsí. Synuklein je hlavní složkou proteinů cytoskeletu (spolu s ubikvitinem, synaptofysinem a tau-proteinem), který má schopnost vytvářet agregáty a soudí se, že vede k tvorbě Lewyho tělísek. Na začátku tvorby agregátů nejprve vzniká protoagregát (oligomer z 30 molekul α -synukleinu), který pravděpodobně vytváří póry v lipidové membráně a tím umožňuje unikání dopaminu z vesikulů do cytoplasmy. Narušení či redukce v expresi genů pro α -synuklein snižuje uvolňování neurotransmiterů i velikost jejich zásob ve vesikulách (Masopust et al. 2008, *Zdravcentra.cz - (On-line knihovna)* http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_1484.html).

Předpokládá se, že pochopení molekulárních základů, které urychlují dopaminergní degeneraci hlavně u idiopatické PD, umožní rozvinutí cílených a efektivních terapeutických strategií (Keating 2008).

6 Závěr

Oxidativní stres je nerovnováha mezi vznikem a odbouráváním reaktivních forem kyslíku.

Působení ROS je výrazně ovlivněno jejich množstvím v biologickém systému. Při nízkých koncentracích mají nezastupitelnou úlohu v regulacích transkripce, exprese genů, regulaci buněčného cyklu, obranyschopnosti organismu atd. Na druhé straně patologické hromadění ROS se podílí na destrukci DNA, lipidů, modifikaci proteinů, které tímto ztrácejí svoji biologickou funkci a jsou odbourány. V posledních letech se zkoumá jejich vliv na vznik a rozvoj nejrůznějších chorob jako jsou diabetes mellitus, ateroskleróza, Parkinsonova, Alzheimerova, Huntingtonova choroba, rakovina a v neposlední řadě stárnutí organismu.

Vědeckých článků v mezinárodních databázích je na toto téma vypracováno nepřehledné množství. Některé z nich jsou poměrně povrchní, jiné pro tuto práci nad míru složité. V úvodu práce jsem se tedy snažila podat základní informace a v příslušných kapitolách se o některých problémech rozepsat trochu obšírněji. Záměrně zde neuvádím systémy antioxidační ochrany před ROS, protože práce byla věnována spíše působení radikálů. Množství informací k antioxidační ochraně je velké a vydalo by na další samostatnou práci.

7 Souhrn

Cílem práce bylo podat stručný přehled o možnostech vzniku, působení volných radikálů a o jejich fyziologických a patologických funkcích. Volný radikál je molekula mající ve své struktuře orbital s nepárovým elektronem, která může vznikat působením UV záření a štěpením homolytické kovalentní vazby, ale v organismu se mnohem častěji vytváří oxido-redukčními reakcemi.

Radikály působí tak, že z látek neradikálové povahy radikál vytvoří a šíří se řetězovou reakcí až narazí na další radikál a dojde k terminaci. V souvislosti s oxidativním stresem se hovoří o tzv. ROS či RNS, které zahrnují jak radikály tak neradikály.

Zdrojů ROS je několik. K těm nejvydatnějším se řadí jejich tvorba v mitochondriích. Při detoxikaci cizorodých látek aktivitou cytochromu P-450, eliminaci cizorodých a invadujících organismů v makrofázích se jich také generuje určité množství.

Patologickou se tvorba ROS stává tehdy, když se v organismu nahromadí ve velkém množství a jsou vyčerpány antioxidační enzymy, které je eliminují. V tomto případě se projeví všechny jejich nežádoucí vlastnosti jako je poškození DNA, proteinů, lipidů atd., čímž dochází k poruchám funkce těchto biomolekul či k jejich úplnému zániku. Takto se ROS mohou podílet na etiopatogenezi nejrůznějších chorob např. rakoviny, diabetu mellitu, neurodegenerativních onemocněních, poruchách kardiovaskulárního systému a stárnutí.

Na druhé straně jsou ROS vytvářeny jako vedlejší produkt při buněčném dýchání, jsou nepostradatelné pro regulační funkce organismu, pro eliminaci patogenů a další.

Summary

The aim of this work was provide brief survey about oxidative stress, origin of free radicals, about their activity and physiological and pathological functions. Free radical is a molecule which contains unpaired electron in their orbital. Free radicals can be generated by UV radiation or cleaving homolytic bound, but in an organism they are formed more often during oxidoreduction reactions. Radicals are attacking non-radical molecules and it makes for creation of new radicals. This is the way of spreading radical

reaction. In connection with the oxidative stress it is talked about ROS or RNS which implicate radicals and also non-radical substances.

There are several sources of ROS. The biggest source is a generation in the mitochondrion chain reaction. But also during metabolic activity of cytochrom P-450 which detoxicate xenobiotics or when macrophages eliminate invading pathogens are produce certain amount of ROS.

Formation of ROS becomes pathologic, when they are accumulated in an organism in a high concentration and antioxidant mechanisms are depleted. In this case we can observe all of their objectionable features – damage of DNA, proteins, lipids ect., thereby structure and functioning of this biomolecules are failed. The ROS can participate on the aethipatogenesis of various disorders. For exapample cancer, diabetes mellitus, neurodegenerative diseases, cardiovascular system disorders and aging.

On the other hand ROS are generated as byproduct of many reactions for example cell respiration. They are essential for physiological control of cell function, they can eliminate invading pathogens etc.

8 Literatura

- Apel K, Hirt H. Metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 2004, 55:373-399
- Bacon BR, Travill AS, Brittenham CM, Park CH, Recknagel RO. Hepatic lipid peroxidation in vivo in rats with chronic iron overload. *J Clin Invest* 1983, 71:429-439
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants and aging. *Cell* 2005, 120:483-495
- Benov L. How superoxide radical damages the cell. *Protoplasma* 2001, 217:33-36
- Cibičková L', Palička V. Alzheimerova choroba, cholesterol a apolipoprotein E - nové souvislosti. *Klin Biochem Metab* 2005, 13(34):127-130
- Davies KJA. Oxidative stress, antioxidant defences, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 2000, 50:279-289
- de Boer J, Hoeijmakers JHJ. Nukleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 2000, 21:453-460
- Dean RT, Shalin FU, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 1997, 324:1-18
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002, 82:47-95
- Dršata J. Výuka Faf UK Hradec Králové, *Přednášky* 2007
- *Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně : Parkinsonova choroba* [online]. 2004-2008, 20.2.2004 [cit. 2008-04-29]. Dostupný z WWW: <<http://web.fnusa.cz/klinika.php?cl=3&kli=4>>
- Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* 2003, 15:247-254
- Horáček J, Motlová L. Neurodegenerativní onemocnění: Od molekulární genetiky k léčbě. *Vesmír* 1999/6, 78:307-309
- Chen K, Thomas RS, Kšandy JF Jr. Beyond LDL oxidation: Ros in vascular signal transduction. *Free Radical Biol Med* 2003, 35:117-132
- Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS* 2007, 115:81-103

- Kasai H, Iwamoto-Tanaka N, Miyamoto T, Kawanami K, Kawanami S, Kido R, Ikeda M. Life style and urinary 8-hydroxydleoxyguanosine, a marker of oxidative DNA damage: Effects of exercise, working conditions, meat intake, body mass index, and smoking. *Jpn J Cancer Res* 2001, 92:9-15
- Keating DJ. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, regulation of exocytosis and their relevance to neurodegenerative diseases. *J Neurobiochem* 2008, 104:298-305
- Li JM, Snah AM. ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: Potential relevance in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003, 14:221-226
- Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 2006, 443:787-795
- Magder S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life. *Crit Care* 2006, 10:208-216
- Mancuso M, Siciliano G, Riposto M, Murri L. Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease: new developments. *J Alz Dis* 2006, 9:111-117
- MASOPUST, Jaroslav, et al. *Zdravcentra.cz - Příklady chorob způsobených apoptózou specifických buněk (On-line knihovna) : Patobiochemie buňky* [online]. 2008 [cit. 2008-04-30]. Dostupný z WWW: http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_1484.html
- Mukhopadhyay S, George A, Bal V, Ravindran B, Rath S. Bruton's Tyrosine Kinase Deficiency in Macrophages Inhibits Nitric Oxide Generation Leading to Enhancement of IL-12 Induction. *The Journal of Immunology* 1999, 163:1786-1792.
- Nindl G. Hydrogen peroxide – from oxidative stressor to redox regulator. *Cellscience* 2004, 1:1-12
- Onyango IG. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Neurochem Res* 2008, 33:589-597
- Petrozzi L, Ricci G, Giglioli NJ, Siciliano G, Mancuso M. Mitochondria and neurodegeneration. *Biocsi Rep* 2007, 27:87-104
- Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarpotto E. Oxidative stress and cell signaling. *Curr Med Chem* 2004, 11: 1163-1182
- Robertson RP, Hormon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H. Glukose toxicity in beta-cells: Type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* 2003, 52:581-587

- Shigenaga MK, Gimeno CJ, Ames BN 1989. Urinary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:9697-9701
- Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino acids* 2003, 25:207-218
- Stadtman ER, Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. *J Biol Chem* 1991, 266:2005-2008
- Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modification in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004, 84:1381-14
- ŠTÍPEK, Stanislav, et al. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, 2000. 320 s. ISBN 80-7169-704-4.
- Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, 279:1005-1028
- Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003, 552:335-344
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007, 39:44-84
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem-biol Interact* 2006, 160:1-40
- West IC. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med* 2000, 17:171-180
- *Wikipedie: Otevřená encyklopedie : Rakovina* [online]. 2008 , 17/4/2008 [cit. 2008-04-28]. Dostupný z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Rakovina>>.
- Yamagishi S, Edelstein D, Du XL, Brownlee M. Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes* 2001, 50:1491-1494
- *Zdraví EU: Portál EU o veřejném zdraví : Rakovina* [online]. 29/03/2006 [cit. 2008-04-28]. Dostupný z WWW: <http://ec.europa.eu/health-eu/health_problems/cancer/index_cs.htm>.
- ZIMA, Tomáš, et al. *Laboratorní diagnostika*. 1. vyd. Praha : Galén, 2002. 728 s. ISBN 80-7262-201-3.

9 Seznam použitých zkratk

AD	Alzheimer disease –Alzheimerova choroba
ADP	adenosindifosfát
AP-1	transkripční faktor regulující buněčnou proliferaci
ATP	adenosintrifosfát
C3b	součást komplementu
C5a	součást komplementu
CAG	triplet nukleotidových bazí cytosin-adenin-guanin
C-CR	carbon-centred radical
CNS	centrální nervový systém
CYP2E1	enzym nadrodiny enzymů cytochromu P-450 (EC 1.14.14.1)
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
EDRF	růstový faktor krevních destiček
FAD	flavinadenindinukleotid oxidovaná forma
FMN	flavinmononukleotid
HIF-1	transkripční faktor regulující erythropoetin
HNE	hydroxynonenal
IDDM	inzulin dependentní diabetes mellitus
MDA	malondialdehyd
MPP ⁺	1-methyl-4-fenyl-pyridinový ion
mtDNA	mitochondriální deoxyribonukleotidová kyselina
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid oxidovaná forma
NADH	nikotinamidadenindinukleotid redukovaná forma
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát redukovaná forma
NF-κB	nukleární faktor kappa B
NIDDM	non-inzulin dependentní diabetes mellitus
NMR	nukleární magnetická rezonance
NOS	syntasa oxidu dusnatého
ONOOCO ₂ ⁻	nitrosoperoxykarbonát
p53	tumor supresorový protein
PARP	poly-(ADP)-ribosapolymerasa

PD	Parkinson disease – Parkinsonova choroba
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
Q•	radikál koenzymu Q
RF	růstové faktory
RNA	ribonukleotidová kyselina
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
SOD	superoxid dismutasa
XO	xantinoxidasa