

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vliv CO₂ na poškození volnými radikály

Eliška Dušková

Školitel: prof. RNDr. Jiří Wilhelm, Ph.D.

Praha 2010

Obsah

1. Abstrakt a klíčová slova.....	4
2. Abstract and keywords.....	5
3. Seznam zkratek a vzorců.....	6
4. Úvod.....	7
5. Úloha CO ₂ v acidobazické rovnováze.....	8
6. Úloha CO ₂ v redoxní rovnováze.....	10
I. ČÁST: Mechanismy ovlivnění redoxních podmínek oxidem uhličitým.....	10
6.1. Zapojení CO ₂ do radikálových reakcí	10
6.2. Ovlivnění redoxních podmínek změnami pH.....	11
6.3. Vznik CO ₂ radikálů	13
6.4. Ovlivnění antioxidačních systémů	14
6.5. Vliv CO ₂ na dostupnost katalytických iontů	18
II. ČÁST: Mechanismy vlivu CO ₂ na radikálové poškození jednotlivých	
komponent organismu.....	19
6.6. Vliv CO ₂ na poškození jednotlivých makromolekul volnými radikály.....	20
6.6.1. Vliv CO ₂ na poškození proteinů volnými radikály.....	20
6.6.2. Vliv CO ₂ na poškození lipidů volnými radikály.....	21
6.6.3. Vliv CO ₂ na poškození DNA volnými radikály.....	24
6.7. Vliv CO ₂ na celkové redoxní podmínky v buňce.....	25
7. Závěr	27
8. Seznam použité literatury.....	28

1. Abstrakt

CO₂, známý svou rolí v acidobazických regulacích, je mediátorem oxidačního poškození indukovaného peroxynitritem a podporuje aktivitu antioxidantního enzymu Cu,Zn-SOD. To jsou dva dobře probádané způsoby, kterými CO₂ ovlivňuje reakce volných radikálů, ale mechanismů je mnohem více. Při zapojení CO₂ do radikálových reakcí vzniká karbonátový radikál, který specificky poškozuje určité substráty, avšak není možné zobecnit, zda je jeho vliv pro-oxidační nebo antioxidantní. Byla zaznamenána ochranná funkce CO₂ při peroxidaci lipidů a při oxidaci DNA indukované peroxynitritem, kdy karbonátový radikál sice specificky poškozoval určité baze, avšak zamezil tvorbě zlomů DNA. Analogicky CO₂ zabraňuje peroxynitritem indukované fragmentaci proteinů a zároveň specificky poškozuje určité aminokyseliny. Tato pozorování jsou většinou výsledkem pokusů v chemickém systému, to znamená za zjednodušených podmínek. In vivo se uplatňuje mnohem více mechanismů, kterými CO₂ ovlivňuje reakce volných radikálů. V komplexnějších podmínkách, jako jsou buněčné kultury, byl po expozici CO₂ v uvedených případech zvýšen oxidační stres. Zvýšená koncentrace CO₂ způsobuje změnu funkce erytrocytů, což má za následek narušení redoxní rovnováhy krve a zvýšení oxidačního stresu na úrovni organismu.

Klíčová slova

CO₂, oxidační poškození, karbonátový radikál, volné radikály, peroxynitrit, SOD, antioxidantní terapie

2.Abstract

CO₂, known for its role in acid-base regulations, is a mediator of peroxynitrite-induced oxidative damage and it also enhances Cu,Zn-SOD's antioxidant activity. These two means, by which CO₂ affects free-radical damage, are well-explored, but there are many other mechanisms. When CO₂ joins in free radical reactions, carbonate radical is often produced. The carbonate radical specifically damages substrates, but it is not possible to generalize, if the effect is pro-oxidant or antioxidant. A protective role of CO₂ has been observed during lipid peroxidation and during peroxynitrite-induced oxidation of DNA, when the carbonate radical caused injury to specific bases, but in the same time it prevented DNA strand breaks. Similarly, CO₂ prevented peroxynitrite-induced protein fragmentation as well as it caused injury to specific aminoacids. These observations are mostly based on experiments in a chemical system, which means under simplified conditions. In vivo, CO₂ exerts much more mechanisms to affect free radical reactions. Under more complex conditions, as cell culture is, there was an increase of oxidative stress after CO₂ exposure. Increased concentration of CO₂ causes a change in erythrocyte's function and an increase of oxidative stress on the organism's level.

Keywords

CO₂, oxidative damage, carbonate radical, free radicals, peroxynitrite, SOD, antioxidant therapy

3. Seznam zkratk a vzorců

	<u>český název</u>	<u>anglický název</u>
CO ₂	oxid uhličitý	carbon dioxide
H ₂ CO ₃	kyselina uhličitá	carbonic acid
HCO ₃ ⁻	bikarbonát	bicarbonate
CO ₃ ²⁻	karbonátový anion (karbonát)	carbonate anion
CO ₃ ^{•-}	karbonátový radikál	carbonate radical
CO ₂ ^{•-}	CO ₂ ⁻ radikál	carbon dioxide anion radical
NO	oxid dusnatý	nitric oxide
NO ₂	oxid dusičitý	nitrogen dioxide
O ₂ ^{•-}	superoxid	superoxide
ONOO ⁻	peroxynitrit	peroxynitrite
ONOOH	kyselina peroxynitritová (peroxydusitá)	peroxynitrous acid
O ₂ N-O-O ⁻	peroxynitrát	peroxynitrate
NO ₃ ⁻	nitrát	nitrate
NO ₂ [•]	nitrit	nitrite
HNO ₂	kyselina dusitá	nitrous acid
N ₂ O ₃	oxid dusitý	nitrous anhydride
OH [•]	hydroxylový radikál	hydroxyl radical
HOCl	kyselina chlorná	hypochlorous acid
O=N-OOCO ₂ ⁻	nitrosokarbonátový anion (nitrosokarbonát, nitrosoperoxykarboxylát)	nitrosoperoxycarbonate (nitrosoperoxy-carboxylate)
O ₂ N-OCO ₂ ⁻	nitrokarbonát	nitrocarbonate
Fe ²⁺	železnatý ion	ferrous ion
Fe ³⁺	železitý ion	ferric ion
ROS	reaktivní formy kyslíku	reactive oxygen species
RNS	reaktivní formy dusíku	reactive nitrogen species
R-SH	sulfanylová (thiolová) skupina	sulfhydryl group
EPR	elektronová paramagnetická rezonance	electron paramagnetic resonance
XO	xanthinoxidáza	xanthine oxidase
SOD	superoxiddismutáza	superoxide dismutase

pK_a - záporný dekadický logaritmus disociační konstanty kyseliny při 25°C. pK_a = -log(K_a)

4. Úvod

CO₂ nacházející se uvnitř organismu je dvojího původu. Endogenní CO₂ difunduje z mitochondrií jako odpadní produkt Krebsova cyklu, zatímco exogenní CO₂ pochází z okolní atmosféry. Za fyziologického pH (7,4-7,6) je 1,3 mM rozpuštěného CO₂ v plazmě v rovnováze s 25 mM bikarbonátu. V cytozolu je koncentrace bikarbonátu nižší. Změna pH způsobuje posun rovnováhy mezi bikarbonátem a CO₂ a naopak, změna koncentrace CO₂ narušuje acidobazickou a redoxní rovnováhu systému. Dříve byla upřena pozornost na roli CO₂ v acidobazické rovnováze, zatímco v poslední době se objevuje množství informací o roli CO₂ v radikálových procesech. CO₂ ovlivňuje radikálové procesy nejen změnou pH, ale mnoha jinými mechanismy, které budou popsány v první části rešerše.

V práci od Zappully (2007) je shrnut vliv zvýšené koncentrace CO₂ na lidský organismus. Zvýšená koncentrace CO₂ v organismu je výsledkem dýchání znečištěného ovzduší a/nebo nadměrného příjmu potravy, a je příčinou zvýšené produkce volných radikálů, což vede k oxidačnímu stresu a rozvoji kardiovaskulárních chorob, aterosklerózy, inzulinové rezistence a dalších poruch shrnovaných pod pojmem „metabolický syndrom“. Vzhledem k tomu, že zvýšená hladina volných radikálů je průvodním jevem těchto i dalších patofyziologických stavů, existuje snaha objasnit mechanismy radikálových reakcí.

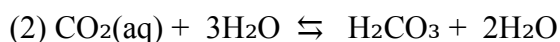
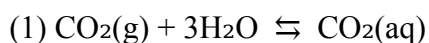
Oxidační stres je výsledkem řetězové reakce volných radikálů. Volné radikály reagují s jiným radikálem anebo s neradikálem, přičemž neradikálem mohou být jiné exogenní látky včetně CO₂ nebo buněčné komponenty. Reakcí může vznikat radikál zasahující další buněčné komponenty, spektrum zásahu se rozšiřuje, a tak v reakci radikálu s neradikálem dochází k systémovému poškození. Neradikál byl v tomto případě pro-oxidantem. Naopak, pokud v reakci s neradikálem vznikne finální nereaktivní produkt, mluvíme o „scavenging“ efektu (vychytání volného radikálu, tj. převedení reaktivní molekuly na nereaktivní) a ukončení radikálové řetězové reakce.

Jak již bylo řečeno, na úrovni organismu CO₂ podporuje oxidační poškození volnými radikály. Pokud se však nezaměřujeme na organismus jako celek, ale na jednotlivé tkáně, buňky nebo makromolekuly, je situace složitější. Podle dosavadních výsledků, které si zdánlivě protiřečí, působí CO₂ nejen jako pro-oxidant nebo antioxidant, ale nejčastěji jako faktor směřující oxidační poškození ke specifickým substrátům. Cílem této práce je nastínit současný stav znalostí o vlivu CO₂ na reakce volných radikálů. Pokud by se prokázal antioxidantní vliv CO₂ alespoň v některých tkáních a třeba jen za určitých okolností, mohlo by to mít dalekosáhlé medicínské využití při antioxidantní terapii.

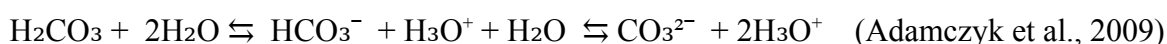
5. Úloha CO₂ v acidobazické rovnováze

Již dlouho je známo, že hydrogenuhličitanový pufr hraje významnou roli v udržování acidobazické rovnováhy biologických tekutin. Narušením acidobazické rovnováhy dochází k ovlivnění mnoha pochodů in vivo, včetně reakcí volných radikálů. Radikálové a acidobazické reakce jsou provázané. Jedním ze spojujících prvků je CO₂, který se zúčastňuje jako reaktant acidobazických i radikálových reakcí. Do určité reakce vstupuje CO₂ v určité formě: jako rozpuštěný CO₂ (CO₂(aq)), jako H₂CO₃, HCO₃⁻ nebo CO₃²⁻, a může nastat situace, kdy v určité formě je CO₂ pro určitou reakci nedostupný.

Přeměny forem CO₂ můžeme rozdělit na dvě etapy. V první etapě je plynný CO₂ rozpuštěn ve vodném roztoku (1) a poté je hydratován karboanhydrázou v erythrocytech (2). Směr reakce závisí na tlaku plynného CO₂ (p CO₂), limitačním (tj. nejpomalejším) krokem je hydratace.

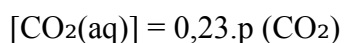


Druhou etapou je sled acidobazických reakcí, které tvoří pufrací systém. Směr reakce závisí na pH roztoku.



Rovnovážná konstanta mezi CO₂(aq) a HCO₃⁻ je chybně nazývána disociační konstantou kyseliny uhličitě. Hodnota této konstanty se pohybuje okolo 6,35. Správná hodnota pK_a(H₂CO₃) však musí být odvozena pouze na základě rychlosti disociace H₂CO₃ na HCO₃⁻, protože ne všechen rozpuštěný CO₂ se hydratuje, a ne všechen hydratovaný CO₂ se účastní tvorby kyseliny uhličitě. Navíc je hydratace nejpomalejším krokem, který znemožňuje okamžité ustanovení rovnováhy mezi CO₂ a H₂CO₃. K výpočtu rychlosti disociace je třeba určit aktuální koncentraci H₂CO₃ a bikarbonátu. Určení koncentrace H₂CO₃ není snadné, protože H₂CO₃ je nestabilní ve vodném prostředí a izolovat ji lze pouze v plynné nebo pevné fázi. Z těchto důvodů po dlouhou dobu nebyla hodnota pK_a(H₂CO₃) přesně stanovena (Adamczyk et al., 2009).

Na základě znalosti, že koncentrace CO₂(aq) je několik set-krát vyšší než účinná koncentrace H₂CO₃, udává se [CO₂(aq)]=400 [H₂CO₃], můžeme dopočítat přibližnou hodnotu pK_a (H₂CO₃/HCO₃⁻). Množství CO₂(aq) můžeme vypočítat na základě tlaku plynného CO₂ (p (CO₂)) a koeficientu rozpustnosti (s). Koeficient s má hodnotu 0,23 pro p(CO₂) udávaný v kPa.



$$pK_a(\text{CO}_2(\text{aq})/\text{HCO}_3^-) = 6,35$$

$$\text{pH} = 6,35 + \log([\text{HCO}_3^-] / (s \cdot p(\text{CO}_2(\text{g})))) =$$

$$= 6,35 + \log([\text{HCO}_3^-] / (400 \cdot [\text{H}_2\text{CO}_3])) =$$

$$= 6,35 - \log 400 + \log([\text{HCO}_3^-] / [\text{H}_2\text{CO}_3]) =$$

$$= 3,75 + \log([\text{HCO}_3^-] / [\text{H}_2\text{CO}_3])$$

$$pK_a(\text{H}_2\text{CO}_3) = 3,75$$

Pro $[\text{H}_2\text{CO}_3] / [\text{CO}_2(\text{aq})] = 400$ je tedy $pK_a(\text{H}_2\text{CO}_3) = 3,75$, což je pouze přibližná hodnota vypočítaná na základě průměrného tlaku plynného CO_2 . Dle nejnovější publikace (Adamczyk et al., 2009) byla poprvé odvozena kinetika reakce přímým spektroskopickým měřením s časovým rozlišením na femtosekundy. Autoři použili fotosenzitivní kyselinu 2N-6,8S (2-Naphthol-6,8-disulfonate) jako donora deuteronu. V roztoku byl přítomen DCO_3^- . Hodnota pK_a pro 2N-6,8S se po excitaci laserem ultrarychlými pulzy (ps-ns) extrémně snížila, tedy mohlo dojít k transferu deuteronu na DCO_3^- a k přímému pozorování poklesu absorbance v oblasti 2N-6,8 S, a zároveň k zvýšení absorbance v oblasti konjugované báze a H_2CO_3 . Ze spektroskopických dat byla určena rychlost transferu deuteronu ($1,7 \cdot 10^{11} \cdot \text{s}^{-1}$). Rychlost zpětné reakce (disociace deuteronu z D_2CO_3) byla vypočítána ($3,3 \cdot 10^6 \cdot \text{s}^{-1}$), což odpovídá životnosti kyseliny uhličitě zhruba 300 ns.

Výsledná hodnota $pK_a(\text{D}_2\text{CO}_3/\text{DCO}_3^-)$ po přepočtu odpovídá

$$pK_a(\text{H}_2\text{CO}_3 / \text{HCO}_3^-) = 3,45 \pm 0,15$$

H_2CO_3 je tedy silnější kyselina, než se předpokládalo. Radikálové reakce probíhají mnohem rychleji než acidobazické, a tak se jich může zúčastnit CO_2 i ve formě kyseliny uhličitě. Životnost H_2CO_3 v roztoku je 300ns, pro porovnání, hydroxylový radikál má životnost v rámci jednotek nanosekund. Naproti tomu 300ns nestačí na zapojení kyseliny do acidobazických reakcí, dříve dojde k její disociaci. Proto při zkoumání kinetiky acidobazických reakcí je praktické pracovat s rovnováhou $pK_a(\text{CO}_2(\text{aq})/\text{HCO}_3^-) = 6,35$, avšak v radikálové chemii musí být používána hodnota $pK_a(\text{H}_2\text{CO}_3 / \text{HCO}_3^-) = 3,45 \pm 0,15$. Zapojení různých forem CO_2 do radikálových reakcí a ovlivnění produkce radikálů změnami pH bude diskutováno dále.

6. Úloha CO₂ v redoxní rovnováze

1. ČÁST: Mechanismy ovlivnění redoxních podmínek oxidem uhličitým

Přítomnost CO₂ ovlivňuje oxidační poškození různorodými mechanismy. V obecné rovině může změna koncentrace CO₂ měnit průběh reakcí včetně radikálových reakcí vychýlením pH. Do regulace aktuální hladiny radikálů vstupuje CO₂ na úrovni jejich produkce i na úrovni jejich vylučování. Co se týče produkce volných radikálů, zapojením CO₂ přímo do radikálové reakce vznikají specifické radikály, selektivně poškozující určité substráty. Na úrovni vylučování CO₂ ovlivňuje aktivitu antioxidantních enzymů, a mimo to také mění dostupnost iontů kovů, které katalyzují reakce ovlivňující hladinu radikálů.

6.1. Zapojení CO₂ do radikálových reakcí

Přímým zapojením CO₂ do radikálové řetězové reakce se změní kinetika a dochází k přesměrování reakce ke vzniku specifických produktů. Tyto produkty se mohou lišit od původních svým množstvím, reaktivitou, mechanismem reakce a specifitou k určitým substrátům. Pokud jsou produkty reaktivnější, jsou méně stabilní, difundují na kratší vzdálenosti a poškozují substráty jenom v blízkosti svého vzniku, naopak méně reaktivní produkty přenášejí oxidační poškození daleko od místa svého vzniku. Dosud nejprobádanější v této oblasti jsou změny poškození substrátů vlivem peroxynitritu v přítomnosti CO₂. Obecně dochází ke změně poměru nitračních a oxidačních reakcí ve prospěch nitrací.

Pokud je CO₂ v roztoku, reaguje s ním peroxynitrit preferenčně za vzniku nitrosokarbonátu, který je nestabilní, je z něj formován nitrokarbonát a posléze nitrát. V reakci vedoucí ke vzniku nitrokarbonátu vzniká určité množství radikálů CO₃^{•-} a NO₂[•] (Uppu et al., 1996). Nyní je známo, že tyto radikálové produkty představují pouze 35% produktů rozpadu peroxynitritu. Reakce s CO₂ je nejrychlejší reakcí peroxynitritu in vivo ($5,8 \times 10^4 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1}$, Denicola et al., 1996), a tak je většina účinků peroxynitritu zprostředkována právě těmito radikály. V nepřítomnosti CO₂ v neutrálním pH je generováno z peroxynitritu relativně malé množství radikálů (O₂^{•-}, OH[•], O[•]) (Obr.1, Tien et al., 1999). Dalším faktorem, ovlivňující vznik radikálů z peroxynitritu, je pH. (viz kapitola 6.2.)

Metabolismus NO se nemusí nutně ubírat směrem k reakcím peroxynitritu. V nepřítomnosti superoxidu vzniká reakcí NO s molekulárním kyslíkem oxid dusitý (N_2O_3), který má toxické účinky, avšak ve fyziologickém pH reaguje s některými anionty včetně bikarbonátu a je hydrolyzován na nitrit. V nepřítomnosti superoxidu je tedy CO_2 vychytávačem RNS. Jako vychytávače mohou fungovat i jiné anionty, jako např. fosfáty, avšak in vivo hrají minoritní roli kvůli své relativně nižší koncentraci vzhledem k bikarbonátu a nižší rychlosti reakce s N_2O_3 (Caulfield et al., 1996).

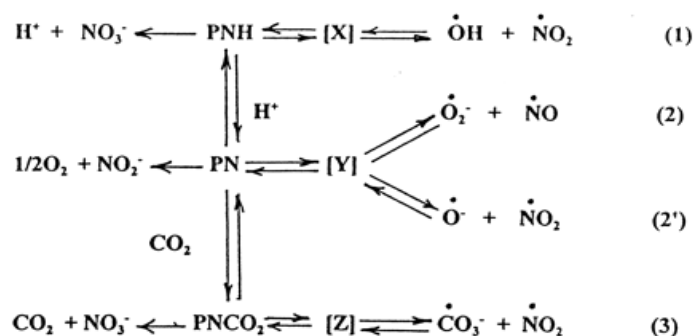
Mechanismus ovlivnění metabolismu NO oxidem uhličitým je tedy objasněn, zbývá definovat účinky nově vzniklých reaktantů in vivo, o což se pokusím ve druhé části této práce.

6.2. Ovlivnění redoxních podmínek změnami pH

Vzhledem k tomu, že CO_2 působí jako kyselina, změna jeho koncentrace vychyluje pH, a recipročně změna pH vychyluje rovnovážný poměr jednotlivých forem, v kterých se nachází CO_2 . Každá jeho forma reaguje jiným způsobem, například karbonát i bikarbonát mohou být oxidovány hydroxylovým radikálem za vzniku $CO_3^{\cdot-}$, ale OH^{\cdot} reaguje mnohem rychleji s karbonátem než s bikarbonátem, a tak je produkce $CO_3^{\cdot-}$ rychlejší v alkalickém pH (citováno z Bonini et al., 2004).

Oxidační mechanismy peroxynitritu jsou silně pH-dependentní. Nitrosokarbonát vzniká pouze z reaktantů (CO_2 a peroxynitritu) v ionizované formě, a proto je reakční rychlost závislá na pH s optimumem v pH=6,5 (Denicola et al., 1996). K podobnému výsledku došli Bonini et al. (1999) při sledování formování karbonátového radikálu rozkladem nitrosokarbonátu metodou přímé EPR (electron paramagnetic resonance) spektroskopie. Intenzita EPR signálu byla nejvyšší v pH=6,4, což odpovídá reakci mezi peroxynitritovým aniontem (pK_a $ONOO^-/ONOOH=6,8$) a rozpuštěným CO_2 (pK_a $CO_2/HCO_3^- = 6,4$).

Vliv pH na produkci radikálů z peroxynitritu je znázorněn na Obr. 1. K poškození vlivem peroxynitritu radikálovým mechanismem dochází v přítomnosti CO_2 případně při vychýlení pH k acidóze nebo k alkalóze (Tien et al., 1999). V kyselém pH většina reakcí probíhá radikálovým mechanismem i bez přítomnosti CO_2 , protože peroxynitrit je z větší části protonován na peroxynitritovou kyselinu, což vede k jeho rychlé dekompozici za vzniku 30% radikálů ($OH^{\cdot} + NO_2^{\cdot}$) (citováno z Bonini and Augusto, 2001). V alkalickém pH je peroxynitrit stabilnější, dochází tedy ke generování sice malého množství radikálů, jako v neutrálním pH, ale zato po delší dobu, takže výsledné množství radikálů je vyšší. (Tien et al., 1999).



Obr.1 Rozklad peroxynitritu v kyselém pH (reakce 1) a v neutrálním pH (reakce 2,2'). Reakce peroxynitritu s CO₂ (reakce 3). Převzato z Tien et al., 1999.

Nejen množství vzniklých radikálů, ale i koncentrace peroxynitritu se může měnit s pH. Důvodem je zvýšení produkce NO• myeloperoxidázou v kyselém pH. Modifikace Trp32 Cu,Zn-SOD v myeloperoxidázovém systému (myeloperoxidáza-H₂O₂-nitrit) byla zvýšena po přidání bikarbonátu sodného, avšak pouze v pH <7,2 (Yamakura et al., 2005). Zvýšená nitrace v kyselém pH ve stejném systému byla pozorována i u tyrozinu (Gaut et al., 2002), a vysvětlena byla existencí dvou drah tvorby NO• myeloperoxidázou, přičemž efektivnější je ta dráha, která má optimum v kyselém pH. NO• je prekurzorem peroxynitritu, který reaguje s bikarbonátem za vzniku CO₃•⁻ a NO₂•. CO₂ v tomto případě působí oxidační stres dvěma mechanismy - snížením pH a reakcí s peroxynitritem. Výsledkem je zvýšená produkce CO₃•⁻, který rychle oxiduje tyrozin i tryptofan, a oxidovaná aminokyselina je potom nitrována.

Vliv pH na radikálové reakce je komplexní, a může být vysvětlen mimo jiné změnami konformace proteinů, ať už se jedná o enzymy nebo o substráty radikálových reakcí.

6.3. Vznik CO_2 radikálů

Karbonátový radikál ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) poškozují substráty jednoelektronovou oxidací, podobně jako hydroxylový radikál, avšak selektivněji. Je méně reaktivní než OH^{\cdot} , tudíž je stabilnější a proniká do větší vzdálenosti od místa svého vzniku. Hydroxylový radikál je silnější oxidant a může oxidovat bikarbonát nebo karbonát za vzniku $\text{CO}_3^{\cdot-}$.

$\text{CO}_3^{\cdot-}$ je produkován také během peroxidázové aktivity Cu,Zn-SOD anebo při rozpadu $\text{O}=\text{N}-\text{OOCO}_2^-$, což bylo potvrzeno přímou EPR spektropií ve studii (Bonini et al., 1999). Další možností je produkce karbonátového radikálu cytochromoxidáza (XO). Distribuce tohoto enzymu v tkáních je specifická (zvláště vysokou aktivitu vykazuje ve střevě a v játrech), a je známo, že má patofyziologické účinky. Při oxidaci různých substrátů jsou elektrony z oxidovaného substrátu přenášeny přes mnoho redoxních center xanthinoxidázy. Pokud je akceptorem elektronů O_2 , je produkován superoxid a následně H_2O_2 . Na cestě tvorby H_2O_2 může uniknout intermediát - deprotonovaný peroxid, který může být v aktivním místě xanthinoxidázy redukován na $\text{CO}_3^{\cdot-}$. $\text{CO}_3^{\cdot-}$ je důležitým mediátorem mnoha patofyziologických účinků XO, protože hladina dalších radikálů produkovaných XO- superoxidu, H_2O_2 a OH^{\cdot} - je in vivo značně omezena díky efektivní činnosti vychytávačů ROS, a dále omezenou dostupností iontů katalyzujících Fentonovu reakci (Bonini et al., 2004). Potom stoupá relativní význam radikálů, které nejsou produkovány z ROS prekurzorů, jako např. karbonátový radikál.

Jiným CO_2 radikálem je redukční radikál $\text{CO}_2^{\cdot-}$, který vzniká oxidací formátového aniontu, a také je produkován během metabolismu toxinů, jako CCl_4 (Connor et al., 1985) nebo hydralazinu (Wong et al., 1988).

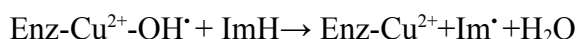
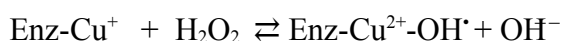
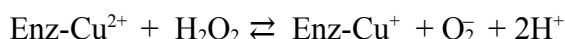
2.4.Ovlivnění antioxidačních systémů

V buňce vždy existuje bazální hladina volných radikálů. Jejich produkce je zvyšována vnějšími vlivy, například při infekci nebo při degradaci xenobiotik. Rovnovážná hladina je udržována díky antioxidačním systémům, které mají za úkol vychytávat volné radikály, popřípadě snižovat dostupnost pro-oxidantů, nebo chránit substráty před oxidací. Oxidační stres může být způsoben zvýšeným výskytem oxidantů, anebo sníženou aktivitou antioxidačních systémů. Vzhledem k vysokému stupni prozkoumání funkce superoxiddismutázy (SOD) popíšu ovlivnění antioxidačních systémů oxidem uhličitým na příkladu SOD.

Superoxiddismutázy jsou antioxidační enzymy odstraňující superoxid. V lidských tkáních byly nalezeny tři typy SODs, lišící se kovovým kofaktorem: cytoplazmatická SOD1 (Cu,Zn-SOD), mitochondriální SOD2 (Mn-SOD) a extracelulární SOD3. Následující text se bude týkat Cu,Zn-SOD, u které je známo, že reakce s CO₂ zvyšuje její aktivitu. Vlivem dismutázové a peroxidázové aktivity Cu,Zn-SOD dochází ke snížení hladiny ROS, ale zároveň k tvorbě karbonátového radikálu. Ve starších pracích bylo předpokládáno, že do reakce s Cu,Zn-SOD vstupuje bikarbonát, a podle toho byl také navržen mechanismus této reakce. Liochev and Fridovich (2003) ovšem předložili důkaz, že reakce se zúčastňuje rozpuštěný CO₂ (CO_{2(aq)}) a ne bikarbonát. To vyvrací dřívější teorie, a mechanismus, jakým reaguje (CO_{2(aq)}) s Cu,Zn-SOD, není objasněn.

Primární funkce superoxiddismutáz je katalýza dismutace superoxidu na kyslík a peroxid vodíku. Tuto dismutázovou aktivitu mají všechny superoxiddismutázy. Reakce vypadá takto:
$$2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$$

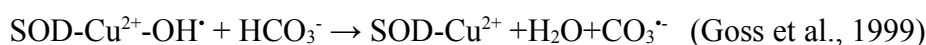
Aktivní místo Cu,Zn-SOD je přístupné pouze úzkým, pozitivně nabitým kanálem, takže je umožněn vstup malých aniontů. Uvnitř kanálu se nachází aniontové vazebné místo Arg¹⁴¹ (4-5 Å od aktivního místa), nezbytné pro zakotvení superoxidu do správné pozice. V aktivním místě se nachází Cu²⁺, His⁶¹ a Zn²⁺ spojený s Cu²⁺ imidazolem His⁶¹. Cu,Zn-SOD je narozdíl od Mn-SOD poškozována vlastním dismutačním produktem, peroxidem vodíku.



Schema 1: Inaktivace Cu, Zn-SOD reakcí s H₂O₂. Převzato z Hodgson and Fridovich, 1975.

Na schematu 1 vidíme, že při reakci Cu, Zn-SOD s H₂O₂ vzniká silný enzymově vázaný oxidant Enz-Cu²⁺-OH• (popř. Enz-Cu¹⁺=O anebo Enz-Cu³⁺) (Liochev and Fridovich, 2003). Tento oxidant má podobné oxidační schopnosti jako volný hydroxylový radikál. Je schopen atakovat imidazol sousedícího His⁶¹, a tím inaktivovat enzym. Inaktivaci může být zabráněno dvěma způsoby: nabídnutím kompetičních substrátů pro SOD-Cu²⁺-OH• namísto imidazolu His⁶¹ anebo odstraňováním peroxidu vodíku.

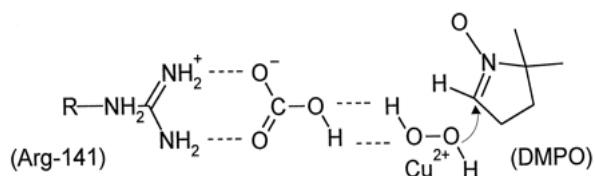
Jako kompetiční substráty pro SOD-Cu²⁺-OH• mohou fungovat exogenní reduktanty, které mají takovou strukturu, aby mohly vstoupit do kanálu vedoucího k aktivnímu místu. Takovou strukturu mají malé anionty, jako formát, azid, xanthin, urát (Hodgson and Fridovich, 1975) a bikarbonát. Tyto anionty jsou substráty peroxidázové aktivity SOD a slouží jako donory elektronu pro SOD-Cu²⁺-OH•. Bikarbonát vstupuje do kanálu vedoucího k aktivnímu místu, je oxidován a dokáže regenerovat aktivní SOD podle následující reakce:



Analogicky budou probíhat reakce SOD-Cu²⁺-OH• s ostatními exogenními reduktanty, avšak všechny výše uvedené anionty jsou strukturně nepodobné bikarbonátu, a tak je sice zabráněno inaktivaci SOD, ale je zablokována peroxidázová aktivita v tom smyslu, že tyto anionty neumožňují redukci peroxidu vodíku v aktivním místě.

Štěpení peroxidu vodíku je druhým způsobem zabránění inaktivaci Cu,Zn-SOD. Tuto funkci zastávají specializované enzymy jako např. kataláza. Za určitých okolností může Cu,Zn-SOD získat peroxidázovou aktivitu a odstraňovat peroxid vodíku sama. Nejprve bylo zjištěno, že Cu,Zn-SOD funguje jako peroxidáza při pH > 9, kdy se H₂O₂ (pK_a=11,9) nachází ve formě HO₂⁻, který je strukturně i nábojem podobný O₂^{-•} a váže se přímo na Cu²⁺. Ve fyziologickém pH probíhá odstraňování H₂O₂ pomocí Cu,Zn-SOD úplně jiným mechanismem. Cu,Zn-SOD získává ve fyziologickém pH peroxidázovou aktivitu pouze v přítomnosti bikarbonátu nebo strukturně podobných aniontů jako bisulfit nebo biselenit (Sankarapandi, Zweier, 1998).

Byl navržen mechanismus (Obr.2), jakým bikarbonát (popř. strukturně podobné anionty) umožňuje vazbu H₂O₂ na Cu²⁺ aktivního místa Cu,Zn-SOD a jeho redoxní štěpení. H₂O₂ je přitom stabilizován pomocí vodíkových můstků s bikarbonátem a bikarbonát je navázán na Arg¹⁴¹ v blízkosti aktivního místa. (Sankarapandi, Zweier, 1998).



Obr.2: Starší hypotéza: umožnění vazby H_2O_2 na Cu^{2+} pomocí bikarbonátu, který tvoří vodíkové můstky s H_2O_2 . Převzato ze Sankarapandi, Zweier, 1998.

Mechanismus štěpení H_2O_2 pomocí bikarbonátu v aktivním místě SOD navržený na Obr.4 byl vyvrácen. Bylo dokázáno (Liochev and Fridovich, 2003), že reakce s $\text{SOD-Cu}^{2+}\text{-OH}^\bullet$ se zúčastňuje rozpuštěný CO_2 ($\text{CO}_{2(\text{aq})}$) a ne bikarbonát. Důkazem je počáteční zpomalení oxidace substrátu, pokud přidáme NaHCO_3 k reakční směsi obsahující Cu,Zn-SOD , H_2O_2 a substrát při $\text{pH}=7,4$. Zpomalení je způsobeno pomalou dehydratací H_2CO_3 . Pokud přidáme k reakční směsi $\text{CO}_{2(\text{aq})}$, oxidace substrátu je nejprve velmi rychlá, protože dochází k pomalému ustanovení rovnováhy mezi H_2CO_3 a $\text{CO}_{2(\text{aq})}$. Ustanovení rovnováhy $\text{CO}_{2(\text{aq})} + 3\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 + 2\text{H}_2\text{O}$ urychluje karboanhydráza, takže po jejím přidání k reakční směsi probíhá oxidace substrátu stejnou rychlostí už od počátku.

Vzkledem k tomu, že karboanhydráza má v aktivním místě Zn^{2+} , bylo navrženo, ale nikoliv dokázáno, že $\text{CO}_{2(\text{aq})}$ interaguje s Cu,Zn-SOD přes Zn^{2+} (Liochev and Fridovich, 2003). Mechanismus peroxidázové aktivity Cu,Zn-SOD umožněný $\text{CO}_{2(\text{aq})}$ zůstává zatím neobjasněn.

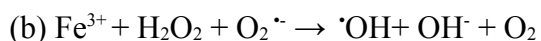
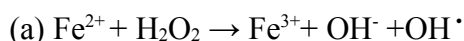
CO_2 tedy podporuje aktivitu Cu,Zn-SOD oběma způsoby: jako kompetiční substrát pro $\text{SOD-Cu}^{2+}\text{-OH}^\bullet$ namísto imidazolu sousedícího His^{61} i umožněním štěpení H_2O_2 peroxidázovou aktivitou Cu,Zn-SOD . Není jisté, jestli se v obou případech váže na Arg^{141} . Výsledkem je zvýšení aktivity Cu,Zn-SOD po předchozí inaktivaci peroxidem vodíku zhruba o 20% při koncentraci 25 mM HCO_3^- (Goss et al., 1999). Potom je omezeno poškození okolních substrátů vlivem ROS, které jsou odstraňovány superoxiddismutázou, avšak celkově nedochází k snížení oxidačního poškození, pouze se mění specifita zásahu substrátů. Zhang et al. (2000) předložili důkazy, že hydroxylace a nitrace, katalyzované Cu,Zn-SOD a zvýšené v přítomnosti CO_2 , nejsou způsobeny volným ani enzymově vázaným hydroxylovým radikálem, případně peroxidem vodíku, jak bylo předpokládáno dříve, ale karbonátovým radikálem. $\text{CO}_3^{\bullet-}$ difunduje z aktivního místa Cu,Zn-SOD a tak rozšiřuje oxidační poškození i na molekuly, které se nedostanou k aktivnímu místu. Celkově dochází k většímu oxidačnímu poškození difundujícím $\text{CO}_3^{\bullet-}$ než vázaným radikálem $\text{SOD-Cu}^{2+}\text{-OH}^\bullet$.

$\text{CO}_3^{\bullet-}$ poškozují i samotnou superoxiddismutázu. Dochází k radikálové oxidaci Trp32 na tryptofanový radikál, který za přítomnosti kyslíku reaguje na tryptofan-peroxy radikál. Následně vznikají různé oxidační produkty, a dochází ke kovalentní agregaci Cu,Zn-SOD. Při delší inkubaci Cu,Zn-SOD s H_2O_2 a bikarbonátem je superoxiddismutáza fragmentována (Zhang at al., 2003).

Funkce SODs je často závislá na jediné aminokyselině, a to je také příčinou některých rozdílů mezi jednotlivými typy SODs. Je evidentní, že jednoduchá bodová mutace určitých aminokyselin (Trp32, aminokyselin v aktivním místě) je asociovaná s radikální změnou funkce Cu,Zn-SOD. Porozumění těmto mechanismům by mělo vést k odhalení příčiny některých dědičných onemocnění, spjatých s mutantní Cu,Zn-SOD, a k jejich efektivní léčbě. Důležitá role CO_2 spočívá v tom, že bývá mediátorem změny funkce Cu,Zn-SOD. V jeho přítomnosti získává Cu,Zn-SOD peroxidázovou aktivitu a tím je prodloužena funkčnost superoxiddismutázové aktivity, ale zároveň CO_2 zprostředkuje inaktivaci enzymu karbonátovým radikálem.

6.5. Vliv CO₂ na dostupnost katalytických iontů

Ionty kovů hrají významnou roli jako katalyzátory radikálových reakcí. CO₂ může ovlivňovat jejich dostupnost přímou interakcí nebo ovlivněním aktivity enzymů, jejichž funkcí je regulace hladiny těchto iontů. Příkladem přímé interakce je katalýza tvorby hydroxylového radikálu v reakci Fentonova typu (a) nebo v Haber-Weissově reakci (b). Katalýza Fentonovy reakce může být zprostředkována ionty různých kovů (Fe²⁺, Cu⁺, V⁴⁺, Te³⁺ atd., Wilhelm, 1990), mezi kterými má železo významnou roli.



Železo hraje centrální roli v neenzymatické iniciaci peroxidace lipidů. Tvorba hydroxylového radikálu je jedním ze způsobů, kterými je peroxidace lipidů iniciována (Wilhelm, 1990).

Hladina železa *in vivo* se zvyšuje při oxidačním stresu. Proti tomuto trendu působí obranné mechanismy v podobě proteinů vázajících a/nebo transportujících železo. Transferrin je hlavní Fe-vazebný protein v plazmě, a jeho aktivita je regulována mimo jiné přítomností bikarbonátu. Tento protein má dvě vazebná místa pro Fe³⁺, a k jeho navázání vyžaduje synergistickou vazbu aniontu, nejčastěji bikarbonátu. Mimo to má bikarbonát protekční funkci: zabraňuje ztrátě funkce transferrinu v přítomnosti oxidantů. Těmito dvěma způsoby bikarbonát pomáhá snižovat dostupnost železa, které se pak nemůže zúčastnit iniciace a propagace reakcí volných radikálů. Hypotéza, že bikarbonát zabraňuje poškození transferrinu, byla otestována v myeloperoxidázovém systému, generujícím HOCl (Edeker et al., 1995). Protekční efekt bikarbonátu byl zaznamenán při koncentracích bikarbonátu menších než 10 mM, takže tento efekt zřejmě má velký význam *in vivo* v místech infekce a oxidačního vzplanutí, kde koncentrace bikarbonátu klesá na takto nízké hodnoty.

Jiným příkladem kovu, ovlivňujícího hladinu radikálů, je Mn(II). Za fyziologického pH a fyziologické koncentrace bikarbonátu vytváří Mn(II) s bikarbonátem katalytický komplex s katalázovou aktivitou (Stadtman et al., 1990). Dochází k dismutaci peroxidu vodíku na kyslík a vodu, a v reakci vznikají radikálové meziprodukty OH[•] a O₂^{•-}.

Omezení dostupnosti katalytických iontů je obranou buňky proti oxidačnímu poškození. Zdá se, vzhledem k výše uvedeným příkladům, že CO₂ je spíše součástí tohoto obranného systému.

II.ČÁST: Vliv CO₂ na radikálové poškození jednotlivých komponent organismu

V předchozí kapitole byly popsány mechanismy, kterými CO₂ potenciálně ovlivňuje oxidační poškození různých substrátů. Tyto mechanismy se samozřejmě neuplatňují všechny a všude, jedná se o reakce probíhající v určitém kompartmentu za určitých podmínek. Výsledkem přítomnosti konkrétních reaktantů za konkrétních reakčních podmínek je uplatnění některých z mechanismů, ovlivňujících oxidační poškození. Ani CO₂ se nevyskytuje ve všech kompartmentech ve stejné koncentraci, obecně je jeho koncentrace vyšší v extracelulárním prostoru. Oxidační poškození můžeme sledovat na úrovni jednotlivých typů tkání, buněk, buněčných komponent nebo makromolekul. Cílem této práce je určit, zda má CO₂ antioxidantní nebo pro-oxidační účinky, a už v této chvíli je zřejmé, že obecně to stanovit nelze. CO₂ skoro nikdy nemá účinky jednoduše oxidační nebo antioxidantní, ale většinou se mění „pouze“ spektrum zasažených substrátů a/nebo způsob jejich modifikace. Tato kapitola se bude v jednotlivých částech zaměřovat na určité komponenty, u kterých bylo sledováno oxidační poškození, s cílem určit kde a za jakých podmínek má CO₂ ochrannou funkci, a kdy naopak podporuje oxidační poškození.

Nabízí se otázka, co je to antioxidantní účinek. Pokud pomineme jednoduchý případ zabránění vzniku radikálů nebo jejich vyloučení, nabízí se definování antioxidantního účinku jako převedení reaktivnějších na méně reaktivní radikály. Jenže tyto méně reaktivní produkty jsou stabilnější, takže pronikají dál od místa svého vzniku, a ještě k tomu rozšiřují spektrum poškozených substrátů, protože každý radikál má jinou substrátovou specifitu. Zda se jedná o pro-oxidant nebo antioxidant je tedy subjektivní z hlediska substrátu. Antioxidantním účinkem může být také ochrana substrátů: enzymaticky, vlivem pH, nabídnutím kompetitoru.

Problematika volných radikálů je složitá a na základě aktuální znalosti mechanismů není možné predikovat účinek CO₂ in vivo. Druhá část rešerše bude věnována vlivu CO₂ na oxidační poškození na různých úrovních stavby organismu. Spíše než shrnutí dosavadních výsledků je cílem uvedení příkladů experimentů, které by ilustrovaly vliv CO₂ na oxidační poškození konkrétního substrátu. Na těchto příkladech bude ukázáno uplatnění mechanismů, popsaných v první části.

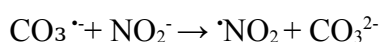
6.6. Vliv CO₂ na poškození jednotlivých makromolekul

V návaznosti na mechanismy ovlivnění redoxních podmínek a s vizí zjistit, jaký je celkový vliv CO₂ na redoxní podmínky začneme odspodu pyramidy shrnutím výsledků experimentů, které zjišťovaly poškození základních stavebních kamenů buněk - proteinů, lipidů a nukleových kyselin.

6.6.1. Vliv CO₂ na poškození lipidů volnými radikály

Lipidy jsou základní stavební složkou buněčných membrán, přesto neexistuje mnoho údajů o vlivu CO₂ na jejich radikálové poškození. In vitro byla peroxidace lipidů izolovaných membrán erythrocytů inhibována v bikarbonátovém pufru (narozdíl od Tris pufru). Pokus byl uspořádán tak, že docházelo ke generování volných radikálů v přítomnosti Fe²⁺. Membrány erythrocytů byly inkubovány s Fe²⁺ a s askorbátem, který redukuje Fe³⁺. V tomto chemickém systému byly eliminovány faktory odpovědné za antioxidační efekt CO₂ in vivo, jako stabilizace iron-transferrin komplexu, to znamená, že CO₂ se musel zapojit přímo do reakcí volných radikálů (Skoumalová et al., 2008).

Pokud je přítomen CO₂ ve formě karbonátového radikálu, má pro-oxidační účinek na NO₂⁻-dependentní oxidaci nenasycených mastných kyselin. Poškození lipidů způsobuje NO₂[•], který vzniká transferem elektronu mezi CO₃^{•-} a NO₂⁻ (Lilie et al., 1978).



Lipidová membrána představuje specifické, hydrofobní prostředí. Nedochozí zde k hydrolýze, která je ve vodném prostředí dominantní reakcí nitrokarbonátu. Hydrolýzou je nitrokarbonát převeden na nitrát a tak je inaktivován. V nepolárním prostředí membrán způsobuje nitrokarbonát oxidace a nitrace, a pokud jsou oxidace jednoelektronové, produktem jsou další radikály, takže zde dochází k propagaci radikálové řetězové reakce (Uppu et al., 1996, Veselá and Wilhelm, 2002).

6.6.2. Vliv CO₂ na poškození proteinů volnými radikály

Lokalizace proteinů v různých buněčných kompartmentech určuje jejich dostupnost pro volné radikály, a zároveň dostupnost jednotlivých aminokyselin je určována sekundární a vyšší strukturou proteinu. Určité aminokyseliny jsou oxidovány selektivně různými radikály. Zda si protein zachová svou funkci závisí na tom, jestli byly poškozeny aminokyseliny nezbytné pro tuto funkci. V rámci proteinu můžeme rozlišovat napadení hlavního a vedlejšího řetězce.

Vliv CO₂ na redoxní podmínky je často zprostředkován karbonátovým radikálem, který selektivně modifikuje aminokyseliny v proteinech. Rychle oxiduje aromatické aminokyseliny (tyrozin a tryptofan), pomaleji reaguje s methioninem a cysteinem (oxiduje jeho sulfanylové skupiny) a s ostatními aminokyselinami reaguje zanedbatelně. K nitraci tyrozinu ve fyziologickém pH dochází pouze v přítomnosti CO₂ (Tien et al., 1999).

Karbonátový radikál je mediátorem poškození proteinů v přítomnosti peroxynitritu a CO₂. V neutrálním pH za nepřítomnosti CO₂ jsou generovány rozkladem peroxynitritu ROS (viz Obr.1, Tien et al., 1999), které mohou oxidovat methionin, ale větší množství ROS dostatečné pro tvorbu karbonylových derivátů proteinů vzniká z peroxynitritu pouze v alkalickém pH. Pokud je přítomen CO₂, zabrání tvorbě ROS v neutrálním i v alkalickém pH (Tien et al., 1999).

K tvorbě karbonylových skupin proteinů dochází in vivo vlivem ROS. V systému Cu(II) + H₂O₂ vznikají v nepřítomnosti CO₂ radikály hydroxylového typu, které oxidují hlavní řetězec proteinu a dochází tak k fragmentaci. Fragmentace je místně specifická a formují se karbonyly. CO₂ chrání protein (v experimentu byl použit HSA (human serum albumin)) před fragmentací, ale zároveň podporuje oxidaci bočních řetězců, čímž vznikají proteinové radikály. Vysvětlením je tvorba komplexu CO₂ + H₂O₂, jehož redukcí vzniká karbonátový radikál, který má tyto specifické účinky. Proteinové radikály byly detekovány nejen v chemickém systému, ale i v kultuře makrofágů (Ramirez et al., 2005).

Nyní se vrátíme k poškození proteinů v přítomnosti peroxynitritu a CO₂. Vznikající radikály CO₃⁻ a NO₂[•] nejsou účinnými oxidanty, zato dochází k zvýšené nitraci tyrozinu, protože karbonátový radikál má větší specifitu k tyrozinu než hydroxylový radikál. Výsledkem přítomnosti CO₂ je snížení oxidace methioninu a zvýšení nitrace tyrozinu. Mechanismus vzniku nitrotyrozinu je následující: CO₃⁻ reaguje s aromatickým kruhem tyrozinu za vzniku tyrozylového radikálu, který následně rekombinuje s NO₂[•]. Prvním krokem je reakce s CO₃⁻, protože je reaktivnější než NO₂[•] (Tien et al., 1999). Analogickým mechanismem dochází k nitraci tryptofanu. Detailní studii modifikací Trp32 Cu,Zn-SOD provedli Yamakura et al. (2005).

Tyrozín je substrátem, poškozovaným radikálovým mechanismem. Větší poškození tyrozinu je výsledkem celkově vyšší produkce radikálů v přítomnosti CO_2 a také větší specifitou $\text{CO}_3^{\cdot-}$ k tyrozinu. Jiné substráty reagují přímo s peroxynitritem, který není radikál, ale je to dvouelektronový oxidant. Takové substráty budou o peroxynitrit kompetovat s CO_2 .

Thioly mohou být poškozeny v přítomnosti peroxynitritu radikálovým i neradikálovým mechanismem, alternativní cesty jejich oxidace jsou znázorněny na obr.3. Jejich sulfanylové skupiny (R-SH) jsou hlavním substrátem pro peroxynitrit v buňce, přestože rychlost reakce peroxynitritu s R-SH je nižší než s CO_2 . Je to dáno mnohem vyšší intracelulární koncentrací R-SH vzhledem k CO_2 (Veselá, Wilhelm, 2002). V extracelulárním prostoru je koncentrace CO_2 vyšší, a vzhledem k vysoké rychlosti reakce je zde peroxynitrit téměř úplně vychytán oxidem uhličitým. CO_2 zde mění mechanismus poškození sulfanylových skupin thiolů při $\text{pH}=7,4$ z dvouelektronového na jedoelektronový (Bonini, Augusto, 2001). Dvouelektronovou oxidací thiolů dochází k degradaci thiolů. Oproti tomu při jedoelektronové oxidaci může dojít ke zpětné redukci a obnově funkce thiolů, navíc jedoelektronové oxidanty vznikají jen z 35% peroxynitritu, zbytek je izomerizován na neškodný nitrát. CO_2 tedy zmírňuje oxidační poškození thiolů.

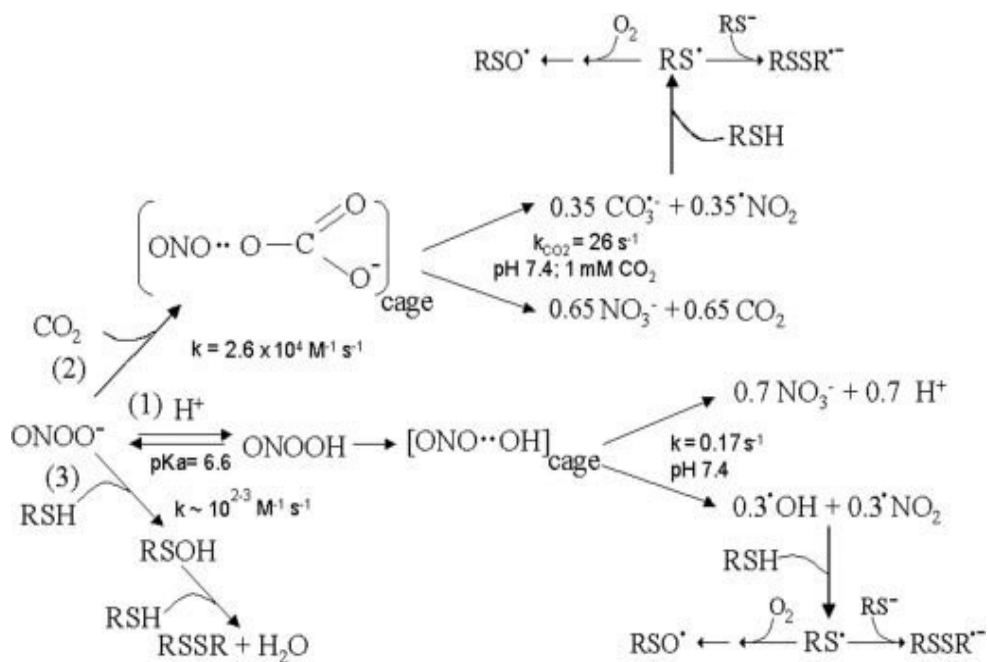
Tento závěr platí pouze za fyziologického pH a není známo, jak budou reagovat thiolové radikály, které jsou produktem jedoelektronové oxidace. Další neznámou jsou změny nativní konformace proteinů, v jejímž udržování hrají R-SH skupiny podstatnou roli (Bonini, Augusto, 2001). Sulfanylové skupiny proteinů jsou poškozovány i oxidem dusitým, který vzniká v metabolismu NO v nepřítomnosti superoxidu místo peroxynitritu. Za těchto podmínek má CO_2 jasně ochrannou funkci, protože oxid dusitý je v jeho přítomnosti hydrolyzován na nitrit.

Způsob a míra poškození určitého proteinu *in vivo* jsou na současné úrovni znalostí nepředvídatelné. Kromě přítomnosti různých reaktantů a změn reakčních podmínek zde existuje ještě jedna proměnná, která také ovlivňuje oxidační poškození proteinu: je to konformace proteinu. Každý konkrétní protein mění konformaci v určitém pH , a jak již bylo uvedeno, CO_2 vstupuje do acidobazických reakcí a může tak být zodpovědný za změny pH . Změna konformace má vliv na přístupnost jednotlivých aminokyselin pro oxidanty a pokud se jedná o aminokyseliny, které jsou specifickým substrátem pro určitý oxidant, změna v míře poškození tímto oxidantem je velmi výrazná, jak ilustruje následující experiment.

Tento experiment byl zmíněn již na začátku této kapitoly, kdy byly popsány modifikace proteinů peroxynitritem. Kromě vlivu CO_2 sledovali autoři (Tien *et al.*, 1999) také vliv pH na nitraci tyrozinu u GS (glutamin syntetáza) a u BSA (bovine serum albumin). U obou proteinů rozsah nitrace klesal se stoupajícím pH v rozmezí 7,2-8,2, ale při vyšším pH došlo u GS, a to pouze u GS, k neočekávanému a velmi výraznému vzestupu nitrace. U BSA k žádné změně

trendu nedošlo. Příčinou byla zřejmě konformační změna GS v alkalickém pH, která změnila dostupnost tyrozinových zbytků.

Závěrem je, že proteiny nás mohou velmi překvapit a zobecňování v této rovině není vůbec vhodné. V literatuře najdeme dostatek údajů o poškození některých modelových a hojně používaných proteinů. Bylo by dobré prozkoumat vliv CO₂ na radikálové poškození všech proteinů, které svou enzymatickou aktivitou ovlivňují redoxní podmínky.



Obr.3 Alternativní cesty oxidace thiolů. Převzato z Bonini, Augusto 2000.

2.6.3. Vliv CO₂ na poškození DNA volnými radikály

Stejně jako u proteinů, výzkum se zaměřuje na modulaci poškození indukovaného peroxyinitritem. Peroxyinitrit indukuje rozštěpení řetězce DNA oxidací deoxyribózy mechanismem, který není ještě zcela objasněn. Pravděpodobně se jedná o oxidant, vzniklý rozkladem peroxyinitritové kyseliny, protože k tvorbě zlomů dochází signifikantně více v kyselém pH než v neutrálním nebo alkalickém pH, a v přítomnosti CO₂ je tvorba zlomů také omezena. Tato pozorování vychází z in vitro pokusů. Mimo inhibici tvorby zlomů byl sledován efekt CO₂ na modifikace guaninu: docházelo k zvýšení tvorby 8-nitroguaninu v závislosti na koncentraci bikarbonátu, zatímco tvorba 8-oxoguaninu zůstala na stejné úrovni (Yermilov et al., 1996).

Oxidaci guaninu detailněji zkoumali Shafirovich et al. (2001) na modelovém self-komplementárním oligonukleotidu DNA. Bylo potvrzeno, že karbonátový radikál selektivně oxiduje dGMP. Použitím metody „nanosecond laser flash photolysis“ byly generovány karbonátové radikály a následným zaznamenáváním přechodných absorpčních spekter byla monitorována kinetika oxidace guaninu. Bylo pozorováno spektrum, které se objevuje v závislosti na úbytku karbonátového radikálu. Toto spektrum je společné pro G^{•+} (radikálový kation) a G(-H)[•] (neutrální radikál), a bylo přisouzeno neutrálním radikálům vzhledem k jejich delší životnosti. Současná formace G(-H)[•] a úbytek CO₃^{•-} probíhá v rámci milisekund a je ilustrací faktu, že CO₃^{•-} nereaguje signifikantně s jinými bazemi. Rychlostní konstanta oxidace guaninu karbonátovým radikálem je rovna $(1,9 \pm 0,2) \cdot 10^7 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1}$, kdežto s jinými bazemi reakce probíhá velmi pomalu, s rychlostní konstantou 20-30 krát nižší. V rámci duplexu DNA jsou preferenčně oxidovány guaniny od konců, protože jsou snáze přístupné, a ze stejného důvodu jsou ještě rychleji oxidovány volné dGMP. (Shafirovich et al., 2001)

Nebezpečí zvýšené hladiny volných radikálů tkví mimo jiné v tom, že působí jako mutageny. Pokud poškození DNA není opraveno, může způsobovat dědičné změny genové exprese, to však není předmětem této práce, je to příliš komplexní problém. Snahou bylo identifikovat nějaký vzorec, podle kterého CO₂ mění poškození určitého typu makromolekuly, ale i to je velkou neznámou. Zato je vidět, že modifikace vlivem peroxyinitritu jsou už veskrze probádanou, ale jedinou probádanou oblastí. Prozatím vliv CO₂ na poškození jednotlivých makromolekul nelze zobecňovat. Jednodušší bude monitoring redoxních podmínek na buněčné úrovni.

6.7. Vliv CO₂ na celkové redoxní podmínky v buňce

Celkové redoxní podmínky v buňce jsou výsledkem dvou protichůdných aktivit: oxidační a antioxidační. Měřit můžeme výchyly této rovnováhy, „čistou“ oxidaci. Existují jednoduché metody jak změřit „čistou“ oxidaci, například pomocí intracelulární fluorescenční sondy DCFH (2,7-dichlorodihydrofluorescein).

Tato metoda byla použita k testování hypotézy, že expozice CO₂ snižuje oxidační aktivitu ve svalu za bazálních podmínek. Míra oxidace DCFH korelovala pozitivně s koncentrací CO₂ a zároveň negativně s pH, což byl opačný než předpokládaný výsledek. Důvod této neshody tkvěl v tom, že testovaná hypotéza byla založena na měření oxidační aktivity v arteriálním perfusátu, tzn. extracelulárně, kdežto pomocí DCFH byla měřena intracelulární oxidační aktivita. K extracelulárnímu snížení oxidační aktivity při expozici CO₂ došlo díky vzniku karbonátového radikálu, který je reaktivnější než výchozí radikály, a proto difunduje na kratší vzdálenosti. Potom se difuze z buněk stává míň pravděpodobnou a poškozovány jsou spíše intracelulární substráty. Zároveň se produkce výchozích radikálů (ROS a NO[•]) svalovými buňkami zvyšuje při snížení extracelulárního pH. To znamená, že CO₂ mění místo, kde dochází preferenčně k oxidaci, a protože zároveň posunuje pH směrem k acidóze, dochází celkově k větší produkci radikálů. V případě nesrovnalostí s jinými daty je třeba mít na paměti, že experiment byl proveden na myší bránici (Arbogast and Reid, 2004).

Dalším buněčným typem, kde bylo pozorováno zvýšení oxidační aktivity při expozici CO₂, jsou lidské kardiomyocyty. Doxorubicin, běžně používaný v chemoterapii rakoviny, zřejmě indukuje produkci superoxidu. Oxidační stres kardiomyocytů může po aplikaci vyšších dávek doxorubicinu vyústit v srdeční selhání. K antioxidační terapii byly používány vychytávače ROS, avšak tato terapie nebyla účinná. Konorev et al. (2000) zjistili, že v přítomnosti bikarbonátu dochází k amplifikaci poškození kardiomyocytů vlivem doxorubicinu a navrhli vysvětlení. Zřejmě reaguje bikarbonát se superoxidem za vzniku dalšího oxidantu. Dalším faktorem přispívajícím k amplifikaci poškození v přítomnosti bikarbonátu je zvýšená akumulace doxorubicinu v kardiomyocytech. Důvodem je mírné zvýšení pH v přítomnosti bikarbonátu, a následná deprotonace aminoskupin doxorubicinu, který je snáze transportován přes membránu dovnitř buňky (Konorev et al., 2000).

V obou uvedených příkladech CO₂ indukoval zvýšený oxidační stres v buňkách. Jednalo se o svalové buňky a kardiomyocyty za specifických podmínek. U erytrocytů byl pozorován opačný účinek CO₂. Po vystavení krys hypoxii byla v jejich erytrocytech zvýšena

hladina LFP (lipofuscin-like pigments), což jsou koncové produkty peroxidace lipidů, a protože jsou fluorescenční, jsou používány jako indikátory oxidačního poškození. Zvýšení hladiny LFP bylo zamezeno při současném vystavení zvířat hyperkapnii (4,3% CO₂) (Skoumalová et al., 2008).

Je známo, že oxyhemoglobin vylučuje peroxynitrit, formovaný intravaskulárně. Erytrocyty tedy hrají roli v udržování redoxní rovnováhy na organismální úrovni. CO₂ deoxygenuje hemoglobin, který reaguje s nitritem, a přitom je uvolňován současně superoxid a NO, reagující spolu za vzniku peroxynitritu. CO₂ mění radikálně funkci erytrocytů z vychytávače na zdroj volných radikálů (citováno z Zappulla, 2007). Tyto změny funkce erytrocytů při zvýšené koncentraci CO₂ se vůbec netýkají peroxidace membránových lipidů. Je možné, že inhibice peroxidace lipidů i uvolňování volných radikálů v přítomnosti CO₂ platí současně. Dalším možným vysvětlením je, že hypoxie je speciální podmínkou, při které má CO₂ antioxidační účinky na erytrocyty.

7.Závěr

Tato práce byla zasměřena detailněji na mechanismy, kterými CO₂ ovlivňuje reakce volných radikálů, a na konkrétních experimentech bylo ukázáno, které z těchto mechanismů se mohou uplatňovat při poškození jednotlivých substrátů. Uvedené příklady evokují myšlenku, že čím výše se na úrovni organismu pohybujeme, tím se pohled na účinek CO₂ zjednodušuje. Již v úvodu bylo uvedeno, že na úrovni organismu CO₂ podporuje oxidační poškození volnými radikály, jejichž zdrojem jsou erythrocyty. Expozice CO₂ podporuje intracelulární oxidační stres některých buněčných typů, avšak u erythrocytů jsou výsledky rozporuplné. Vzhledem k tomu, že erythrocyty hrají významnou roli v regulaci redoxních podmínek na organismální úrovni, zasloužily by si větší pozornost jako samostatné téma.

Modulace oxidačního poškození na úrovni tkáně vlivem CO₂ má praktický význam v otázkách aplikace antioxidační terapie. V konkrétních případech byly prokázány jasné antioxidační účinky CO₂, a pokud by byly definovány okolnosti jeho antioxidačního účinku, mohl by být CO₂ využit. CO₂ například zmírňuje oxidační poškození thiolů, zvyšuje aktivitu transferrinu i Cu,Zn-SOD, zabraňuje fragmentaci DNA. Ukazuje se však, že většina zobecňování těchto pozorování na úrovni typu makromolekul je komplikované a nemá ani přímý praktický výstup, jako má modulace oxidačního poškození na úrovni typu buněčného. Otestování vlivu CO₂ in vivo měřením celkových redoxních podmínek za definovaných okolností by neměl být složitý úkol. Přesto je třeba zkoumat i mechanismy, jakými jsou redoxní podmínky ovlivněny pokud je CO₂ prooxidantem, protože antioxidační terapie prostřednictvím enzymů musí být aplikována specificky proti konkrétním radikálům. Ve většině případů CO₂ pouze určuje substrátovou specifitu oxidačního poškození, a často je prostředníkem karbonátový radikál.

Dosavadní výzkum v oblasti ovlivnění radikálových reakcí oxidem uhličitým byl dosud zaměřen na dvě hlavní oblasti: modulace účinků peroxynitritu a ovlivnění aktivity SOD v bikarbonátovém pufri, což jsou zároveň nejobsáhlejší kapitoly této rešerše. Mnoho soustavné práce by bylo ještě potřeba, aby se vliv CO₂ na radikálové poškození jednotlivých typů substrátů dal predikovat.

8. Seznam použité literatury

- Adamczyk, K.; Prémont-Schwarz, M.; Pines, D.; Pines, E.; Nibbering, E., Real-time observation of carbonic acid formation in aqueous solution. *Science* **2009**, *326* (5960), 1690-4.
- Arbogast, S.; Reid, M., Oxidant activity in skeletal muscle fibers is influenced by temperature, CO₂ level, and muscle-derived nitric oxide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2004**, *287* (4), R698-705.
- Bonini, M.; Augusto, O., Carbon dioxide stimulates the production of thiyl, sulfinyl, and disulfide radical anion from thiol oxidation by peroxyxynitrite. *J Biol Chem* **2001**, *276* (13), 9749-54.
- Bonini, M.; Miyamoto, S.; Di Mascio, P.; Augusto, O., Production of the carbonate radical anion during xanthine oxidase turnover in the presence of bicarbonate. *J Biol Chem* **2004**, *279* (50), 51836-43.
- Bonini, M.; Radi, R.; Ferrer-Sueta, G.; Ferreira, A.; Augusto, O., Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxyxynitrite and carbon dioxide. *J Biol Chem* **1999**, *274* (16), 10802-6.
- Caulfield, J.; Singh, S.; Wishnok, J.; Deen, W.; Tannenbaum, S., Bicarbonate inhibits N-nitrosation in oxygenated nitric oxide solutions. *J Biol Chem* **1996**, *271* (42), 25859-63.
- Connor, H.; Thurman, R.; Galizi, M.; Mason, R., The formation of a novel free radical metabolite from CCl₄ in the perfused rat liver and in vivo. *J Biol Chem* **1986**, *261* (10), 4542-8.
- Denicola, A.; Freeman, B.; Trujillo, M.; Radi, R., Peroxyxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxyxynitrite-mediated oxidations. *Arch Biochem Biophys* **1996**, *333* (1), 49-58.
- Edeker, B.; Rasmussen, G.; Britigan, B., Bicarbonate and phosphate ions protect transferrin from myeloperoxidase-mediated damage. *J Leukoc Biol* **1995**, *58* (1), 59-64.
- Goss, S.; Singh, R.; Kalyanaraman, B., Bicarbonate enhances the peroxidase activity of Cu,Zn-superoxide dismutase. Role of carbonate anion radical. *J Biol Chem* **1999**, *274* (40), 28233-9.
- Hodgson, E.; Fridovich, I., The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochemistry* **1975**, *14* (24), 5294-9.
- Konorev, E.; Zhang, H.; Joseph, J.; Kennedy, M.; Kalyanaraman, B., Bicarbonate exacerbates oxidative injury induced by antitumor antibiotic doxorubicin in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2000**, *279* (5), H2424-30.
- Lilie, J.; Hanrahan, R.J.; Henglein, A., O⁻ transfer reactions of the carbonate radical anion. *Radial. Phys. Chem.* **1978** (11), 225-227
- Liochev, S.; Fridovich, I., CO₂, not HCO₃⁻, facilitates oxidations by Cu,Zn superoxide dismutase plus H₂O₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101* (3), 743-4.
- Ramirez, D.; Mejiba, S.; Mason, R., Copper-catalyzed protein oxidation and its modulation by carbon dioxide: enhancement of protein radicals in cells. *J Biol Chem* **2005**, *280* (29), 27402-11.
- Sankarapandi, S.; Zweier, J., Bicarbonate is required for the peroxidase function of Cu, Zn-superoxide dismutase at physiological pH. *J Biol Chem* **1999**, *274* (3), 1226-32.
- Shafirovich, V.; Dourandin, A.; Huang, W.; Geacintov, N., The carbonate radical is a site-selective oxidizing agent of guanine in double-stranded oligonucleotides. *J Biol Chem* **2001**, *276* (27), 24621-6.
- Skoumalová, A.; Herget, J.; Wilhelm, J., Hypercapnia protects erythrocytes against free radical damage induced by hypoxia in exposed rats. *Cell Biochem Funct* **2008**, *26* (7), 801-7.
- Stadtman, E.; Berlett, B.; Chock, P., Manganese-dependent disproportionation of hydrogen peroxide in bicarbonate buffer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1990**, *87* (1), 384-8.
- Tien, M.; Berlett, B.; Levine, R.; Chock, P.; Stadtman, E., Peroxyxynitrite-mediated modification of proteins at physiological carbon dioxide concentration: pH dependence of carbonyl formation, tyrosine nitration, and methionine oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96* (14), 7809-14.

Uppu, R.; Squadrito, G.; Pryor, W., Acceleration of peroxynitrite oxidations by carbon dioxide. *Arch Biochem Biophys* **1996**, *327* (2), 335-43.

Veselá, A.; Wilhelm, J., The role of carbon dioxide in free radical reactions of the organism. *Physiol Res* **2002**, *51* (4), 335-9.

Wong, P.; Poyer, J.; DuBose, C.; Floyd, R., Hydralazine-dependent carbon dioxide free radical formation by metabolizing mitochondria. *J Biol Chem* **1988**, *263* (23), 11296-301.

Yamakura, F.; Matsumoto, T.; Ikeda, K.; Taka, H.; Fujimura, T.; Murayama, K.; Watanabe, E.; Tamaki, M.; Imai, T.; Takamori, K., Nitrated and oxidized products of a single tryptophan residue in human Cu,Zn-superoxide dismutase treated with either peroxynitrite-carbon dioxide or myeloperoxidase-hydrogen peroxide-nitrite. *J Biochem* **2005**, *138* (1), 57-69.

Yermilov, V.; Yoshie, Y.; Rubio, J.; Ohshima, H., Effects of carbon dioxide/bicarbonate on induction of DNA single-strand breaks and formation of 8-nitroguanine, 8-oxoguanine and base-propranal mediated by peroxynitrite. *FEBS Lett* **1996**, *399* (1-2), 67-70.

Zappulla, D., Environmental stress, erythrocyte dysfunctions, inflammation, and the metabolic syndrome: adaptations to CO₂ increases? *J Cardiometab Syndr* **2008**, *3* (1), 30-4.

Zhang, H.; Andrekopoulos, C.; Joseph, J.; Chandran, K.; Karoui, H.; Crow, J.; Kalyanaraman, B., Bicarbonate-dependent peroxidase activity of human Cu,Zn-superoxide dismutase induces covalent aggregation of protein: intermediacy of tryptophan-derived oxidation products. *J Biol Chem* **2003**, *278* (26), 24078-89.

Zhang, H.; Joseph, J.; Felix, C.; Kalyanaraman, B., Bicarbonate enhances the hydroxylation, nitration, and peroxidation reactions catalyzed by copper, zinc superoxide dismutase. Intermediacy of carbonate anion radical. *J Biol Chem* **2000**, *275* (19), 14038-45.