

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

Studijní program farmacie

Volné radikály a stárnutí I.

Free radicals and aging I.

(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Eva Kvasničková, CSc

Hradec Králové 2009

Pavla Brtnická

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

V Hradci králové dne:

Pavla Brtnická

Chtěla bych poděkovat prof. RNDr. Evě Kvasničkové, CSc. za její ochotu, odbornou pomoc a rady, trpělivost a čas, který mi věnovala při vypracovávání mé diplomové práce. Dále mé poděkování patří Ing. Luboši Bellovi za pomoc s překladem do angličtiny.

ABSTRAKT

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

Titul, jméno, příjmení kandidáta: Pavla Brtnická

Titul, jméno, příjmení školitele: prof. RNDr. Eva Kvasničková, CSc

Název diplomové práce:

Volné radikály a stárnutí I.

Stárnutí zahrnuje progresivní a ireverzibilní děje v organelách, buňkách a celém organismu, které vedou k hromadění změn odpovědných za snížení aktivity fyziologických funkcí a zvýšení citlivosti ke stresu a chorobám. Jsou to změny v důležitých biomolekulách, jako nukleových kyselinách, proteinech i lipidech. Názory na stárnutí jsou velice nejednotné a mění se podle stále nově se objevujících studií, kdy obecně dochází ke zpřesnění, rozvíjení či upravení poznatků starších studií.

Od začátku 20. století bylo předloženo mnoho teorií stárnutí. Ale žádná komplexně neobsahovala vysvětlení veškerých změn v organismu v průběhu života. Až v 50. letech 20. století přišel Dr. Denham Harman s teorií volných radikálů, která se v popředí udržela až do dnešních dnů. Avšak jako každá teorie má své zastánce i odpůrce. Tato teorie předpokládá, že stárnutí je výsledkem hromadění změn způsobených velmi reaktivními částicemi, nazvanými volné radikály. Nejdůležitějšími volnými radikály jsou peroxid vodíku, superoxid, hydroxylový radikál a oxid dusnatý, které v organismu působí jak fyziologicky tak i patogenně.

Pro udržení hladiny volných radikálů v rovnováze s pozitivním i negativním působením jsou zodpovědné endogenní antioxidační mechanismy organismu. Fyziologické působení volných radikálů zahrnuje signální mechanismy, správou funkcí enzymů a imunitního systému. Patogenní působení naopak způsobuje rozvoj mnoha nemocí včetně rakoviny a urychluje stárnutí organismu. Jestli jsou volné radikály opravdu hlavní příčinou stárnutí a antioxidanty chrání naše tělo před jejich škodlivým působením je stále diskutováno.

ABSTRACT

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Pavla Brtnická
Consultant: prof. RNDr. Eva Kvasničková, CSc
Title:

Free radicals and aging I.

Aging process consists of progressive and irreversible processes in organelles, cells and entire organism, that lead to cumulation of changes responsible for activity reduction in physiological functions and increase sensitiveness to stress and illnesses. These are changes in important biomolecules like nucleic acids, proteins and lipids. Ideas of aging are very ambiguous and are changing in new studies, in which are more accurate, developed or adjust older studies.

A lot of aging theories were translated from the start of 20. century. None of them contained explanation of all changes in organism during lifetime. Only in 50th in 20th century Dr. Denham Harman came with theory about free radicals, which are to the fore for today's. This theory has defenders and opponents like each other. It suggests that aging process is cumulation of changes caused by very reactive particles called free radicals. Most important free radicals are hydrogen peroxide, superoxid, radical of hydroxyl and dioxide nitrogen, which are working like physiologically then pathogenic in organism.

For preserving level of free radicals with positive and negative effect, endogenous antioxidant mechanism in organism is responsible. Physiological effect of free radicals consists of signaling mechanism, correct function of enzymes and immune system. Pathogenous activities are causing evolution of illnesses including cancer and accelerate aging process in organism. Is in discussing to this days if free radicals are the main cause of aging and endogenous antioxidant preserve our body again ill-effects.

OBSAH

1	Úvod a cíl práce	8
2	Teorie stárnutí	9
	2.1 Evoluční teorie	9
	2.2 Buněčná teorie telomery	10
	2.3 Vztahy imunitního systému a stárnutí	13
3	Volné radikály	14
	3.1 Reaktivní formy kyslíku	16
	3.2 Reaktivní formy dusíku	20
	3.3 Enzymy podílející se na tvorbě volných radikálů	24
4	Volné radikály a jejich fyziologická funkce	27
	4.1 Buněčná signalizace	27
	4.2 Imunitní ochrana	30
	4.3 Volné radikály jako nástroj oxidáz a oxygenáz	33
5	Význam volných radikálů v procesu stárnutí	34
	5.1 Mitochondrie	34
	5.2 Glykace	38
	5.3 Oxidativní stres a poškození biomolekul	39
	5.3.1 Peroxidace lipidů	40
	5.3.2 Poškození proteinů	43
	5.3.3 Poškození DNA	46
6	Onemocnění spojená s oxidativním stresem	48
	6.1 Diabetes mellitus	49
	6.2 Neurodegenerativní onemocnění	50

6.2.1 Alzheimerova choroba	52
6.2.2 Parkinsonova choroba	54
6.3 Rakovina	55
7 Antioxidační ochrana organismu	59
7.1 Endogenní antioxidační ochrana	59
7.1.1 Enzymové antioxidační systémy	60
7.1.2 Neenzymové antioxidační systémy	64
7.1.2.1 Vysokomolekulární antioxidanty	64
7.1.2.2 Nízkomolekulární antioxidanty	65
7.2 Exogenní antioxidační ochrana	67
7.2.1 Vitamín E	68
7.2.2 Vitamín A	69
7.2.3 Flavonoidy	70
7.2.4 Karotenoidy	71
8 Závěr a diskuze	73
9 Zkratky	75
10 Použitá literatura	78

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

Proces stárnutí organismu a mechanismy stárnutí se definují obtížně a v literatuře je uvedeno mnoho definic. Snad by bylo možné zestručnit, nikoliv zjednodušit, že se jedná o progresivní a ireverzibilní děje v organelách, buňkách a celém organismu, které vedou k hromadění změn odpovědných za snížení aktivity fyziologických funkcí a zvýšení citlivosti ke stresu a chorobám. Jsou to změny v důležitých biomolekulách jako nukleových kyselinách, proteinech i lipidech. Názory na proces stárnutí a jeho příčiny se mění, jsou ovlivňovány úrovní současných znalostí, zvláště důkladnějším poznáním procesů v buňkách i organelách tkání normálních i patologických (Kubešová et al. 2005). Přitom i starší teorie jsou cenné a byly a jsou základem pro současný rozvoj a zpřesnění. Příkladem může být teorie stárnutí koloidů z roku 1924, teorie omylů proteosyntézy z 50. let, teorie založené na vlivu zánětlivých změn či autointoxikací organismu i teorie vlivu volných radikálů - teorie oxidačního stresu z roku 1954 (příklady z práce Kubešová et al. 2005).

Studie procesů stárnutí z různých aspektů jsou v posledním desetiletí rozsáhlejší a početnější. V současné době je asi 300 různých teorií, většinou založených na pokusech *in vitro*. Jsou stimulovány prodlužující se délkou života člověka, zvyšujícím se počtem občanů vyššího věku v populaci, posunem a rozšířením hranic aktivního stáří.

Motorem výzkumu v tomto vědním oboru je získat takové znalosti, které by napomohly (s řadou jiných aktivit) k prodloužení aktivního lidského věku ovlivněním některých procesů v buňce, které zodpovídají za stárnutí organismu. Jsou to snahy, které existují od pradávna – vzpomeňme na elixíry života.

Cílem předložené práce jsou stručné přehledy teorií stárnutí zaměřené na biologické procesy stárnutí, zvláště podrobněji na teorii radikálovou. Je popsán vznik volných radikálů a jejich ovlivnění fyziologických funkcí i jejich spoluúčast na řadě patologických stavů, jak je stručně uvedeno. V literatuře současné i nedávné zahrnuje tato radikálová teorie významné místo a je součástí mitochondriální teorie stárnutí, glykace a dalších.

2 TEORIE STÁRNUTÍ

Jednotlivé teorie stárnutí se snaží vysvětlit zásadní otázky samostatně, většinou však v kombinaci s dalšími teoriemi, takže se vzájemně propojují i překrývají. Jejich společným cílem je nacházet odpověď na otázky: Proč stárneme? Proč žijeme tak dlouho? Proč umíráme? Pokud je cílem této práce zabývat se biologickým aspektem stárnutí, tak je možné velké množství teorií stárnutí rozdělit a) na teorie programovaného stárnutí, které je závislé na biologických hodinách což představují geny, které postupně a naprogramovaně zapínají a vypínají signály nervové, endokrinní a imunitní zodpovědné za udržování homeostázy a aktivní obrany organismu b) na teorie hromadění chyb, které se snaží poznat a popsat vlivy prostředí (např. chemické toxiny, radiace, volné radikály, glykace, ionty kovů a další) indukující poškození buněk a jednotlivých biomolekul jako jsou proteiny a nukleové kyseliny (Weinert a Timiras 2003, Best 2008). Pro sledování biochemických změn v průběhu stárnutí je možné rozdělit výsledky výzkumů a jejich interpretace a) na zjišťování změn na molekulární, subcelulární a buněčné úrovni b) na určení změn celého organismu. Některé z těchto teorií budou stručně popsány v další kapitole. Nejdříve upozorním na teorie, které jsou obecnější a nejsou myšlenkově spojeny s volnými radikály (ROS a RNS).

2.1 Evoluční teorie

Tato teorie vysvětluje stárnutí jako výsledek snižující se schopnosti pro výběr-selekcí. Evoluce preferuje jedince s velkou reprodukční schopností, která se s přibývajícím délkou života snižuje. Byla vyslovena v roce 1940 současně s upozorněním na velkou druhovou variabilitu délky života jednotlivých druhů (Weinert a Timiras 2003). Při pozorování a výzkumu dominantní letální mutace, jejímž výsledkem je Huntingtonova choroba, bylo pozorováno, že výskyt této choroby se nesnižuje, nemizí „přirozeným výběrem“ protože se u jedince objevuje až ve 30-40 letech jeho života, tedy v době, kdy k reprodukci většinou již došlo. Tato teorie se doplnila o *Teorii akumulace mutací* v průběhu stárnutí, které vedou k patologickým změnám a stárnutí a je doplňována a rozšiřována řadou nových poznatků. K evolučním teoriím i k jejich

modifikacím je řada argumentů podporujících anebo kritických. Ale vždy jsou zajímavé, zahrnují např. porovnání vlivu životního prostředí na délku života určitých *species* v podmínkách, kdy chybí anebo je přítomen predátor, nebo *antagonistická pleiotropní teorie*, která uvádí, že některé geny a produkty jejich exprese působí v raném věku pozitivně a v pozdějším přispívají k destrukci organismu. Příkladem mohou být u člověka androgeny nezbytné pro vývoj a funkci prostaty, zatímco v pozdějším věku mohou být příčinou výskytu rakoviny prostaty. Autoři uvádějí i programovanou sebedestrukci pacifických lososů. Tyto ryby žijí v oceánu 2-3 roky a poté podniknou obtížnou cestu proti proudu řeky k místu, kde nakladou jikry. Po dokončení této činnosti vyplaví velké množství glukokortikoidů, které vedou k rychlé destrukci nositele. To je vysvětlováno jako zisk potravy pro další putující lososy anebo pro jejich potomky (Best 2008, Weinert a Timiras 2003).

Tato teorie je samozřejmě doplněna údaji, které počítají s rozdílným procesem stárnutí závislé na *species*. Průměrná délka života jednotlivých druhů je velmi rozdílná např. slon žije 10-20x déle než myš. Opravdu seriózní vysvětlení není, jde jistě o vliv genetiky a dalších faktorů jako např. potřebou energie k udržení tělesné teploty, k činnosti mozku a všech pochodů nezbytných pro homeostázu. (Best 2008).

2.2 Buněčná teorie a telomery

Buněčná teorie stárnutí byla formulována v roce 1965 jako proces, který je určen počtem buněčných dělení lidských buněk, tzv. limitem replikační aktivity, a byl popsán u všech buněk *in vitro* (v kultivačních mediích). Výsledkem je pak buňka, která je zcela změněna ve své původní fyziologické funkci. Buněčné stárnutí je děleno autory na stárnutí všech buněčných dějů, dále jako specifický typ je *replikační stárnutí* - spojeného se zkrácením telomerů (bude popsáno dále) a stárnutí indukované stresem (*stress-induced senescence SIS*), které není limitováno DNA poškozením (ale poškození se nevyklučuje), modifikací heterochromatinové struktury, účinkem signálů, které jsou produktem exprese onkogenů. Tyto změny jsou početnější u starších buněk v mnoha tkáních a zvyšují riziko nádorů. Tento názor není samozřejmě bez kritických poznámek.

Výsledky dalších studií ukazují, že změny způsobené aterosklerosou zvyšují stárnutí buněk (např. patologické změny ve fyziologii buněk určitých tkání sekundárně zvýší stárnutí u

buněk sousedních tkání). Příkladem může být popsán vliv stárnoucích epiteliálních buněk, které zvyšují aktivitu interleukinu-1 α a růstového faktoru (EGF), které významně zvyšují riziko zánětu tkání a riziko rakoviny (Loison et al. 1999).

K některým z funkcí proteinu p53 patří aktivace apoptózy, „replikační senescence“, odpověď buňky na *stress-induced senescence* a na replikaci telomer. Známé jsou pokusy na mutantech myši, které neměly funkční p53 a jejich incidence rakoviny vzrostla o 85%. Zdá se, že tento protein i skutečnou prevencí proti limitaci replikace a SIS (*stress-induced senescence*) a je aktivnější ve svých funkcích u mladých buněk v porovnání se stárnoucími, je stále diskutováno.

Role telomer a telomeráz je stále v pozornosti ve vztahu ke stárnutí. Přesto není tento vztah vyjasněn. Předpokládá se však, že zkracující se telomery mohou způsobit i další změny ve stabilitě DNA, která se může projevit i zvýšením buněčné proliferace rakovinných buněk v závislosti na věku (Weinert a Timiras 2003).

DNA eukaryotických organismů se nachází v jádře nebo také v semiautonomních organelách. Jaderná DNA je uložena ve formě lineárních chromozomů, které mají na svých koncích strukturu nazývané telomery. Úloha telomer spočívá v ochraně vlastních konců chromozomů, aby nebyly rozpoznávané buněčnými opravnými mechanismy jako zlomy DNA.

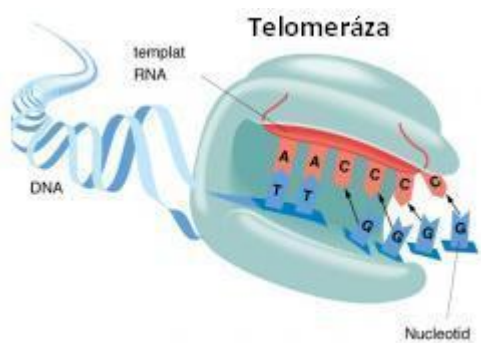
Telomery se skládají z DNA a proteinů, které ovlivňují strukturu a funkci telomer. DNA telomer je tvořena tandemově se opakující krátkou sekvencí nukleotidů. U člověka to je sekvence TTAGGG. Délka jednotlivých telomer se liší podle organismů (Cong et al. 2002).

Telomery se při každém dělení nepatrně zkrátí. Zkrátí-li se telomery až na kritickou hranici, přejde buňka do fáze stárnutí. Během této fáze dojde ke změně v expresi proteinů, zastaví se dělení a nastanou změny v aktivitě metabolismu. Čím delší telomery, tím víc dělení má buňka před sebou.

Replikaci telomerázové DNA zajišťuje speciální enzym zvaný telomeráza. Telomeráza byla poprvé popsána v roce 1985 C. Greiderovou a E. Blackburnovou u nálevníka *Tetrahymena thermophila*. Telomeráza má 2 podjednotky – RNA podjednotku a proteinovou katalytickou podjednotku. RNA podjednotka slouží jako předloha pro syntézu repetice a katalytická podjednotka je zodpovědná za vlastní syntézu telomer (Cong et al. 2002). Mechanismus účinku telomerázy spočívá v prodlužování 3' konce matricového vlákna DNA.

Tento děj probíhá procesem reverzní transkripce telomerické repetice katalyzovaný proteinovou podjednotkou, při kterém slouží jako matrice právě RNA podjednotka. Po syntéze dané repetice dojde k posunu telomerázy a syntéze nové repetice. Interakce telomerázy a DNA závisí na buněčném cyklu.

V lidských buňkách se telomeráza váže na DNA v S-fázi buněčného cyklu. V ostatních fázích je telomeráza uchovávána v oddělených jaderných strukturách mimo telomerickou DNA. Aktivita telomerázy se v přírodě dost liší. Záleží na věku organismu a pozorovaných tkáních (Boroň 2008). Bylo zjištěno, že v somatických buňkách živočichů je aktivita telomerázy nulová (Cong et al. 2002). Naproti tomu jsou tkáně, které si zachovávají aktivní telomerázu po celou dobu života jedince. Mezi ně patří kmenové buňky kostní dřeně a pohlavní buňky. U rostlin je telomeráza aktivní v meristematických pletivech. Vysokou aktivitu telomerázy můžeme pozorovat i v prolifерujících rakovinných buňkách. Více než 85% nádorů vykazuje zvýšenou aktivitu telomerázy, která je přímo spojená s jejich schopností nekontrolovaného dělení (Boroň 2008).



Obr. 1 : Telomeráza (Převzato z práce Boroň 2008).

Teorie založená na vysvětlení replikativního zkracování telomer nedokáže vysvětlit všechny komplexní změny v organismu během stárnutí, ale podává vhodný obraz z pohledu molekulární biologie.

2.3 Vztahy imunitního systému a stárnutí

Imunitní, nervový a endokrinní systémy v organismu mají zásadní vliv na přežití, stárnutí a dlouhověkost. Jsou vzájemně propojeny, ovlivňují se navzájem a jsou v centru zájmu, protože se stále více studují všechny systémy a interakce, které přispívají k udržení homeostázy vnitřního prostředí, aby se organismus mohl přizpůsobit změnám životních podmínek. Tato kapitola je velmi významná, ale mohu se o ní zmínit jen stručně, její obtížnost a rozsáhlost přesahuje naše znalosti a je nad rámec této práce.

V průběhu stárnutí dochází ke změnám celého imunitního systému (*imunosenescenci*). Zahrnují množství morfologických i funkčních změn, které s postupujícím věkem postihují každého jedince. Změny v imunitním systému se neprojevují pouze samostatně, ale jsou ve spojení a souhře se systémy endokrinními a nervovými.

Změny v průběhu stárnutí nastávají ve specifické buněčné imunitě (T/B lymfocytech), v nespecifické buněčné imunitě (makrofágy, granulocyty, NK buňky) a v průběhu stárnutí se mění i lymfatické orgány.

Významněji jsou postiženy T buňky, snižuje se jejich počet i funkčnost (Michlová a Štercl 2007). Vzhledem k rozsáhlé mezibuněčné komunikaci a spolupráci jednotlivých skupin imunocytů, ovlivňují T buňky činnost i dalších imunitních mechanismů. Populace T buněk se s věkem mění kvantitativně, dochází k velkému poklesu jejich počtu, ale i kvalitativně, protože ztrácejí svoji schopnost odpovídat na antigenní podněty. T buňky se vyvíjejí v thymu, jsou produkovány celý život kontinuálně. Ale vzhledem k tomu, že tkáň thymu v průběhu života atrofuje (50 letý člověk má 10% tkáně v porovnání s předpubertálním věkem), tak je omezen i počet těchto buněk (Rychlíková a Štercl 2004).

U cytokinů spočívá změna ve zvýšené tvorbě prozánětlivých cytokinů, což je spojováno s některými chorobami jako je aterosklerosa, osteoporosa, demence aj. Tyto změny jsou značně rozdílné, ve všech organismech je nelze považovat za primárně patologické (např. u zdravých dlouhověkých jedinců).

NK buňky se svoji důležitou cytotoxickou účinností ztrácí většinou svoji aktivitu v průběhu stárnutí., je pozorována větší vnímavost stárnoucích osob k infekcím (např. chřipky, TBC). U jedinců se zachovalou aktivitou NK může napomáhat k delšímu přežití.

Optimální funkce imunitního systému má zásadní význam pro přežití organismu a dosažení dlouhověkosti. Jednak je zapojen do systémů, které udržují homeostázu vnitřního prostředí a jednak ovlivňují jiné systémy a přispívají k regulacím (Rychlíková a Štercl 2004).

3 VOLNÉ RADIKÁLY

Volné radikály jsou velmi reaktivní atomy nebo molekuly, které obsahují ve vnější elektronové sféře nepárový elektron a jsou schopny samostatné existence. Vzhledem k tomu, že elektrony mají silnou tendenci vyskytovat se spíše ve spárovaném stavu, než v nespárovaném, volné radikály přijímají elektrony od ostatních atomů a molekul nebo jim je předávají, čímž se sami „neutralizují“, vytvoří neradikálovou částici, ale donor či akceptor elektronu se sám stává volným radikálem a vyvolává další řetězovou reakci. Takto dochází k propagaci radikálové reakce. Teprve spojením dvou radikálů dojde k terminaci.

V biologických systémech mají volné radikály mnoho forem v závislosti na jejich reaktivitě. Některé z nich jsou stabilní (melanin), jiné mírně stabilní (oxid dusnatý) až vysoce nestabilní (hydroxylové radikály).

Volné radikály vznikají štěpením chemické vazby. Chemická vazba, tvořená elektronovým párem, se může štěpit buď heterolyticky za vzniku kationtu a aniontu ($R-H \rightarrow R^+ + H^-$) nebo homolyticky za vzniku dvou radikálů ($R-H \rightarrow R^\bullet + H^\bullet$). Heterolytický proces vede ke vzniku stabilních iontů. Homolytický proces vede naopak ke vzniku nestabilních a velmi reaktivních volných radikálů. Příčina rozdílu spočívá v energetických stavech elektronů.

Chemická vazba je tvořena elektronovým párem. Tyto elektrony mají opačný spin a takováto konfigurace obsahuje ve srovnání se souhrnnou energií dvou nespárovaných elektronů mnohem větší množství energie. Tato energetická bilance je příčinou pevnosti a stability chemické vazby. V případě heterolytických procesů přecházejí oba vazebné elektrony na vzniklý anion. Vzniklé ionty jsou z energetického hlediska ve stavu lokálního minima, a tudíž stabilní.

V případě homolytického rozštěpení chemické vazby převezmou vzniklé částice z původních vazebných elektronů po jednom nepárovém elektronu. Výsledné produkty mají vysokou energetickou hladinu a mají tendenci se spojit do energeticky výhodnější konfigurace. Volné radikály mají, narozdíl od neradikálových částic, nenulový výsledný spin.

Reakce volných radikálů se rozdělují na tři etapy:

1. Iniclace – vznik volných radikálů. Z gerontologického hlediska má největší význam enzymatická katalýza vazeb při oxidativních procesech. Nekatalycká homolýza má význam hlavně z hlediska působení xenobiotik na organismus. Vznik volných radikálů vlivem iradiace nesouvisí s přirozeným procesem stárnutí a role neenzymaticky katalyzované homolýzy je nejasná (Ďoubal et al. 1997).
2. Propagace – nepárový elektron je předáván na další atomy či molekuly, přičemž původní volný radikál se mění na neradikálovou částici za vzniku nového volného radikálu z částice, která elektron přijala.
3. Terminace – zánik volných radikálů vstupem nepárových elektronů do chemické vazby.

Reaktivními formami dusíku (RNS) a kyslíku (ROS) jsou označovány nejen volné radikály, ale i molekuly, které nejsou radikály v pravém slova smyslu. Neobsahují nepárový elektron, ale stávají se substrátem dalších reakcí, které vedou k produkci radikálu. Mezi tyto látky patří peroxid vodíku, kyselina chlorná, ozon.

Volné radikály pocházejí ze dvou hlavních zdrojů, endogenních a exogenních.

Endogenní volné radikály jsou v organismu vyráběny hlavně čtyřmi mechanismy:

1. Mitochondrie – Zde se uskutečňuje buněčné dýchání. Energie uvolněná při dýchání zabezpečuje životní děje v buňce (viz. kapitola 5.1)
2. Leukocyty – ničí viry, bakterie a parazity pomocí tvorby aktivních kyslíkových mediátorů. (viz. kapitola 4.2)
3. Peroxisomy – produkují peroxid vodíku jako vedlejší produkt degradace mastných kyselin (nasycených i nenasycených, ale především mastných kyselin s velmi

dlouhým řetězcem) a dalších molekul. Na rozdíl od mitochondrií, které oxidují mastné kyseliny k výrobě ATP a vody, oxidují peroxisomy mastné kyseliny k výrobě tepla a peroxidu vodíku.

4. Enzymová aktivita – viz. kapitola 3.3

K exogenním zdrojům volných radikálů patří znečištění ovzduší, průmyslové odpady, potrava, cigaretový kouř, některá léčiva, radiace, UV záření,...

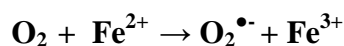
3.1 Reaktivní formy kyslíku

Volné radikály	Látky, které nejsou volnými radikály
Superoxid $O_2^{\bullet-}$	Peroxid vodíku H_2O_2
Hydroxylový radikál OH^{\bullet}	Ozon O_3
Peroxyl ROO^{\bullet}	Singletový kyslík 1O_2
Alkoxy RO^{\bullet}	Kyselina chlorná $HOCl$
Hydroperoxyl HO_2^{\bullet}	

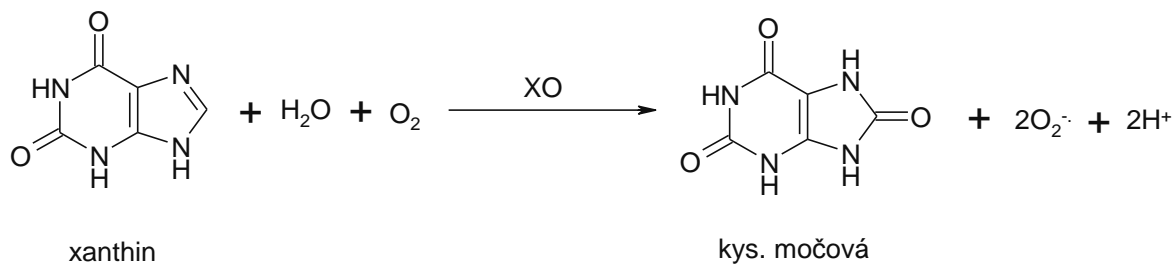
SUPEROXID $O_2^{\bullet-}$

Vzniká jednoelektronovou redukcí v komplexech I a III dýchacího řetězce, působením xanthinoxidázy, NADPH oxidázy, cytochromu P-450 aj. Superoxid je relativně málo reaktivní a má oxidační i redukční účinky. Poškozuje molekuly usnadněním vzniku hydroxylového radikálu a tvorbou peroxinitritu po reakci s NO^{\bullet} (Koubková 2008). Vzniklý superoxid má krátký biologický poločas a může být inaktivován spontánně a nebo mnohem rychleji účinkem peroxiddismutázy na peroxid vodíku.

Vznik superoxidu autooxidací:



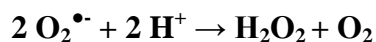
Vznik superoxidu z xanthinů (katalyzovaný xanthinoxidázou):



Vznik superoxidu reakcí katalyzovanou NADPH:



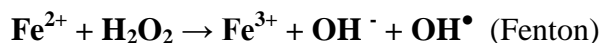
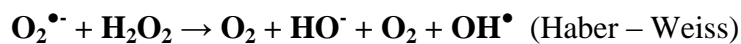
Inaktivace superoxidu:

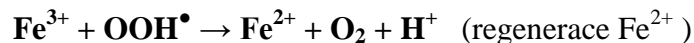


HYDROXYLOVÝ RADIKÁL OH[•]

Je extrémně reaktivní a natolik nestabilní, že v podstatě nedifunduje do okolí a všechny jeho reakce probíhají v místě vzniku. Vzhledem ke své vysoké reaktivitě obrovskou rychlostí reaguje se všemi biomolekulami (sacharidy, aminokyseliny, nukleotidy, lipidy, organické kyseliny aj.) a odnímá jim vodík. Hydroxylové radikály vznikají z peroxidu vodíku (Fentonova reakce) nebo ze superoxidového aniontu (Haber- Weissova reakce).

Železo je důležité při toxickém kyslíkovém poškození. Většina volného železa je v trojmocné formě a musí být redukováno na dvojmocné, aby mohlo být účinné ve Fentonově reakci. Redukce může být podpořena superoxidem. Vzniklé Fe³⁺ ionty mohou dále reagovat s peroxidem vodíku a hydroperoxylovým radikálem OOH[•], čímž dochází k regeneraci Fe²⁺ (Koubková 2008).

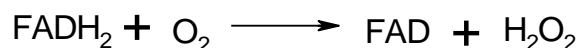
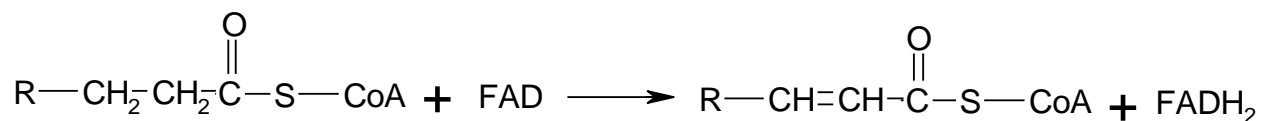




PEROXID VODÍKU H_2O_2

Peroxid vodíku není pokládán za volný radikál. Je slabě reaktivní, ale díky jednoduché vazbě mezi dvěma kyslíky může snadno přejít na vodík a hydroperoxylový radikál nebo na dva hydroxylové radikály. Velice snadno proniká buněčnými membránami a působí i daleko od svého vzniku. Pokud jsou přítomny ionty Fe^{2+} nebo Cu^+ podléhá peroxid vodíku reakci objevené už koncem 19. století Fentonem a produkuje hydroxylový radikál (Koubková 2008). Peroxid vodíku vzniká při oxidaci superoxidového radikálu superoxidodismutázou, v peroxisomech a ve fagocytech.

Vznik peroxidu vodíku v peroxisomech :



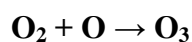
SINGLETOVÝ KYSLÍK $^1\text{O}_2$

Je to molekulový kyslík se spárovanými spiny. Je mnohem reaktivnější než běžný tripletový kyslík. Vzniká při některých fotochemických reakcích, kdy látka absorbující světlo převede tripletový kyslík na reaktivní kyslík singletový. I při fyziologických biochemických reakcích (např. dýchací řetězec) vzniká malé množství této reaktivní molekuly (Kodíček 2007).

OZON O₃

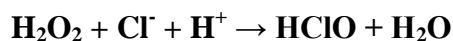
Ozon je nestabilní molekula tvořená třemi atomy kyslíku. Ozon nacházející se ve stratosféře plní funkci „UV filtru“ a brání pronikání škodlivého krátkovlnného UV záření k zemskému povrchu. Troposférický ozon, jako produkt spalování fosilních paliv, působí škodlivě na živé organismy a poškozuje hlavně dýchací orgány, pokožku a sítnici oka živočichů a člověka.

Ozon vzniká při uvolňování kyslíku rostlinami při fotosyntéze a jeho následným spojením s atomem kyslíku z molekuly vody, která se hydrolyticky rozštěpila.



KYSELINA CHLORNÁ HOCL

Vzniká v neutrofilních granulocytech z peroxidu vodíku a chloridového aniontu. Reakci katalyzuje myeloperoxidáza. Tímto způsobem jsou likvidovány fagocytované mikroorganismy. Také oxiduje triolové a aminové skupiny proteinů, chloruje báze nukleových kyselin, inaktivuje inhibitory proteáz. Pokud reaguje se superoxidem vytváří se hydroxylový radikál (Koubková 2008). Má silné oxidační a baktericidní účinky.



3.2 Reaktivní formy dusíku

Volné radikály	Látky, které nejsou volnými radikály
Oxid dusnatý NO^\bullet	Nitrosyl NO^+
Oxid dusičitý NO_2^\bullet	Nitroxid NO
	Oxid dusitý N_2O_3
	Kyselina dusitá HNO_2
	Peroxyinitrit ONOO
	Alkylperoxyinitrit ROONO
	Nitronium NO_2^+
	Oxid dusičitý N_2O_4

OXID DUSNATÝ NO^\bullet

Oxid dusnatý má obrovský biologický význam. V těle vykazuje významný vasodilatační účinek, působí jako neurotransmitter, podílí se na regulaci kontraktility myokardu, působí antiagregačně a antiadhezivně na destičky, inhibuje mitochondriální respiraci, produkují ho aktivované makrofágy při imunitních reakcích těla. Největší množství oxidu dusnatého se nachází v nose a paranasálních dutinách.

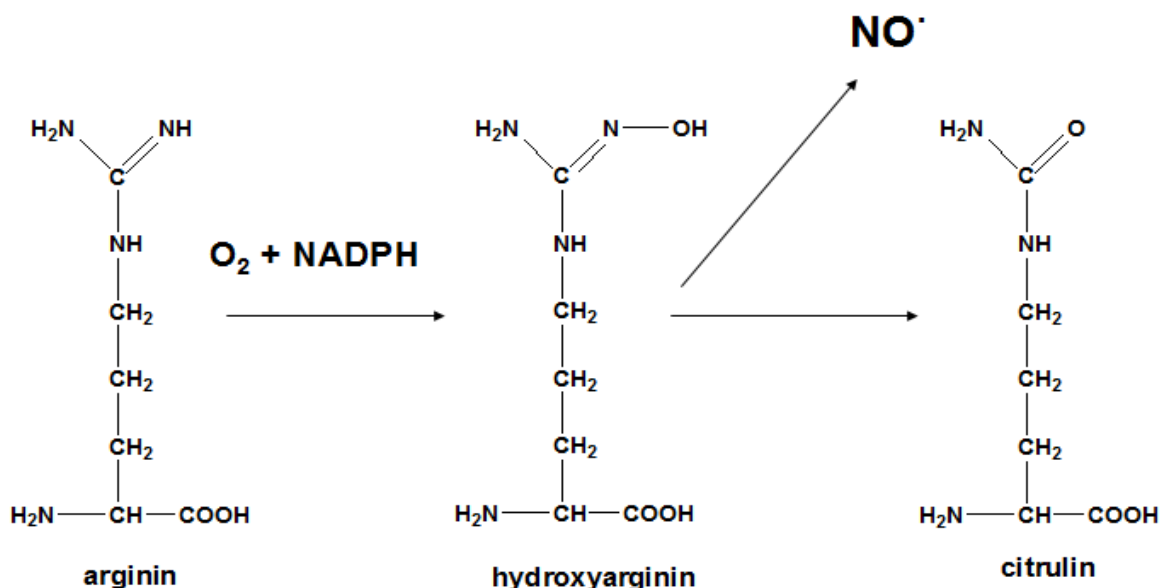
Je rozpustný jak v hydrofilním tak i v hydrofobním prostředí a může procházet plazmatickou membránou i cytoplazmou. Obsahuje nepárový elektron, proto se řadí mezi volné radikály.

V roce 1992 byl vyhlášen oxid dusnatý „molekulou roku“. Ještě před pár lety byl chápán pouze jako nebezpečné znečištění ovzduší přispívající k smogu a kyselým dešťům. Ale během posledních deseti let se stal nejstudovanější molekulou. Prvně byl připraven Belgičanem Jeanem Babbistou van Helmontem v roce 1620 (dříve než kyslík).

V roce 1772 byl chemicky charakterizován Josephem Priestleyem. Poté byla objevena jeho toxicita, a snížení krevního tlaku amylnitrem a zavedení nitroglycerinu pro úlevu při *angině pectoris*. Dnes je již známo, že oba účinky jsou možné díky uvolněnému oxidu dusnatému.

V roce 1998 získali Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro a Ferid Murad Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství. Ferid Murad v roce 1977 objevil, že NO^\bullet aktivuje guanylátcyklázu a tak zvyšuje intracelulární koncentraci cGMP. Robert Furchgott objevil endoteliální relaxační faktor (EDRF)(1980). Louis Ignarro v roce 1987 objevil schopnost eukaryotických buněk tvořit NO^\bullet (Hampl 2000).

V organismu je syntetizován oxid dusnatý NO -syntázou z argininu. Reakce probíhá dvoustupňově. V první fázi dochází k hydroxylaci jednoho z guanidinových dusíků L-argininu. Vzniká N-hydroxyl-L-arginin. Při této reakci je spotřebována jedna molekula NADPH a jedna molekula kyslíku. Druhým krokem je tříelektronová oxidace hydroxyargininu. Uvolňuje se při ní oxid dusnatý a L-citrulin za spotřeby jedné molekuly kyslíku a půl molekuly NADPH. Druhou část reakce může kromě NOS katalyzovat i cytochrom P_{450} (Racek, Holeček 1998).



Obr. 2 : Přeměna argininu na citrulin a NO^\bullet

K syntéze jsou třeba 4 kofaktory (tetrahydrobiopterin, FAD, kalmodulin a FMN) a 2 kosubstráty (NADPH a kyslík). Reakci katalyzuje syntáza oxidu dusnatého, která existuje ve třech isoformách (NOS I – mozková (neuronální), NOS II – makrofágová a NOS III – endotelová). Všechny obsahují v aktivním centru hem. Jsou aktivní jako homodimery a jsou stereospecifické. Vzájemně liší v řízení volným Ca^{2+} a v regulaci exprese.

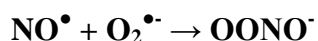
NOS I (nNOS) - neuronální - konstitutivní na Ca^{2+} závislá syntáza nacházející se hlavně v centrálních a periferních neuronech. V menších množstvích je obsažena také v buňkách macula densa ledvin, v plicích, neutrofilech a v kosterním svalu. Může se nacházet volně v cytosolu nebo se vázat na proteiny asociované k buněčné membráně (Koubková 2008). Má význam hlavně v neurotransmisi a neuromodulaci.

NOS II (iNOS) – makrofágová – většinou inducibilní na Ca^{2+} nezávislá syntáza obsažená v makrofázích. V menších množstvích ji najdeme i v gliích, hepatocytech, chondrocytech, srdečních myocytech, hladkém svalu, leukocytech, mastocytech, epitelu a endotelu. Lokalizována je v cytosolu. Její syntéza je stimulovaná některými cytokiny, jako je $\text{TNF-}\alpha$, interferon γ , IL-1 a endotoxiny. Po úplné indukci je její aktivita v buňkách až o několik řádů vyšší než aktivita konstitutivní NOS (Racek, Holeček 1998).

NOS III (eNOS) – endotelová – konstitutivní na Ca^{2+} závislá syntáza se nachází hlavně v cévním endotelu, dále pak v plicním a renálním epitelu, trombocytech, srdečních myocytech a hippocampu. Expresi moduluje mechanické namáhání endotelových buněk. Tato syntáza se navazuje na membrány Golgiho aparátu procesem vyžadující chemické modifikace enzymu, které jsou ovládány signalizační sítí buněk (Forstermann et al. 1998). Je důležitá pro regulaci cévního tonu, průtoku krve tkáněmi a regulaci krevního tlaku (Hampl 2000).

Účinky NO^\bullet na cílovou tkáň:

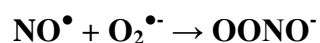
Při velkých množstvích oxidu dusnatého v přítomnosti kyslíku podléhá autooxidaci za vzniku oxidu dusičitého. V přítomnosti superoxidu vzniká velmi rychle peroxynitrit, který sice není radikálem, ale je velmi reaktivní a cytotoxický. Takto tělo zabíjí i obtížněji zlikvidovatelné bakterie, houby, plísňe, tumory a inhibuje replikaci virů.



V nižších koncentracích je oxidace pomalá, většinou převládá regulační působení prostřednictvím aktivace guanylátcyklázy. Tím se zvyšuje v buňce koncentrace cGMP a ten řídí např. draslíkové kanály v sítnici, moduluje fosfodiesterázu cAMP, snižuje intracelulární koncentraci Ca^{2+} a v hladkém svalu přímo inhibuje kontraktilní aparát (HAMPL 2000).

PEROXYNITRIT OONO^\bullet

Je to patologicky nejvýznamnější metabolit oxidu dusnatého. Vzniká reakcí oxidu dusnatého se superoxidem.



Buňky imunitního systému produkují superoxid a oxid dusnatý ve vysokých koncentracích při zánětlivých procesech. Za těchto okolností je schopen oxid dusnatý soutěžit o superoxid se superoxidodismutázou. Za fyziologického pH (7,0) se peroxynitrit zřejmě rozkládá na hydroxylový radikál a oxid dusičitý.



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 kyseliny (tryptofan, tyrosin, fenylalanin) u nichž podporuje nitrace (Koubková 2008).

OXID DUSIČITÝ NO_2^\bullet

Je silně oxidační radikál, který může vznikat různými cestami. Iniciuje a podporuje peroxidaci lipidů včetně LDL., což vede ke zvýšení nitrotyrosinové formace. Oxid dusičitý vzniká nejen z peroxynitritu, ale i jinými cestami včetně enzymatických (Stocker a Keaney 2004).

3.3 Enzymy podílející se na tvorbě volných radikálů

NADPH OXIDÁZA

NADPH oxidáza je jeden z hlavních enzymů katalyzující vznik volných radikálů v buňce. Je obsažena ve fagocytech a nejvyšší aktivitu vykazují neutrofilní granulocyty, nachází se i v monocytech, Kupfferových buňkách jater, mikroglíích mozku a dokonce i v B-lymfocytech. Pokud jsou fagocyty v klidu, je enzym neaktivní. Hlavními stimulatory jsou cytokiny (TNF- α , interferon γ) a fagocytóza samotná.

Superoxid je nezbytný pro správnou funkci fagocytujících buněk. Ale jelikož je tento radikál sám o sobě málo reaktivní je ve fagocytech přeměňován na účinnější metabolity. Reakcí katalyzovanou superoxidodismutázou vzniká peroxid vodíku, reakcí peroxidu vodíku s chloridovými ionty vzniká kyselina chlorná (tuto reakci katalyzuje myeloperoxidáza), kyselina chlorná může reagovat s Fe^{2+} nebo superoxidem a poskytnout hydroxylový radikál. Superoxid s oxidem dusnatým reaguje na peroxynitril, který může štěpením poskytnout velmi reaktivní radikály oxidu dusičitého a hydroxylový radikál.

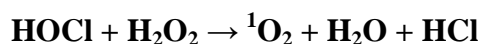
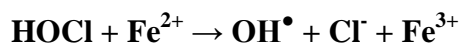
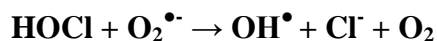
Aktivita NADPH oxidázy v B-lymfocytech je řádově nižší než aktivita tohoto enzymu ve fagocytech. Na aktivaci tohoto enzymu se podílí vazba protilátek na povrchové antigeny. Význam této oxidázy není zcela objasněn (Racek, Holeček 1998).

NADPH oxidáza se skládá ze čtyř podjednotek. Dvě z nich jsou lokalizovány na membráně lysosomů: glykoproteid gp91 a glykopeptid p22. Další dvě jsou umístěny v cytoplasmě (p47 a p67 – čísla udávají molární hmotnost v tisících). Vlastní katalytickou účinnou část tvoří dvě membránové podjednotky, souhrnně nazývané cytochrom₅₅₈ (Racek a Holeček 1999).

MYELOPEROXIDÁZA

Tento enzym katalyzuje reakci peroxidu vodíku s chloridovými ionty. Vzniká kyselina chlorná, která má obrovský oxidační potenciál. Je to jediný známý lidský enzym, který dokáže vygenerovat kyselinu chlornou v těle (Heinecke 1999). Myeloperoxidáza je obsažena

v neutrofilních granulocytech a lysosomech monocytů. Tento enzym katalyzuje i reakce při kterých vzniká hydroxylový radikál a nebo singletový kyslík.



Při nadbytečné tvorbě HOCl dochází k chloraci bílkovin včetně enzymů energetického metabolismu (akontitáza), syntézy cholesterolu a metabolismu volných radikálů (SOD).

Myeloperoxidáza je tetramer obsahující dva těžké a dva lehké řetězce. Každý řetězec váže jednu molekulu hemu.

NO-SYNTÁZA (viz. Oxid dusnatý)

XANTHINOXIDÁZA

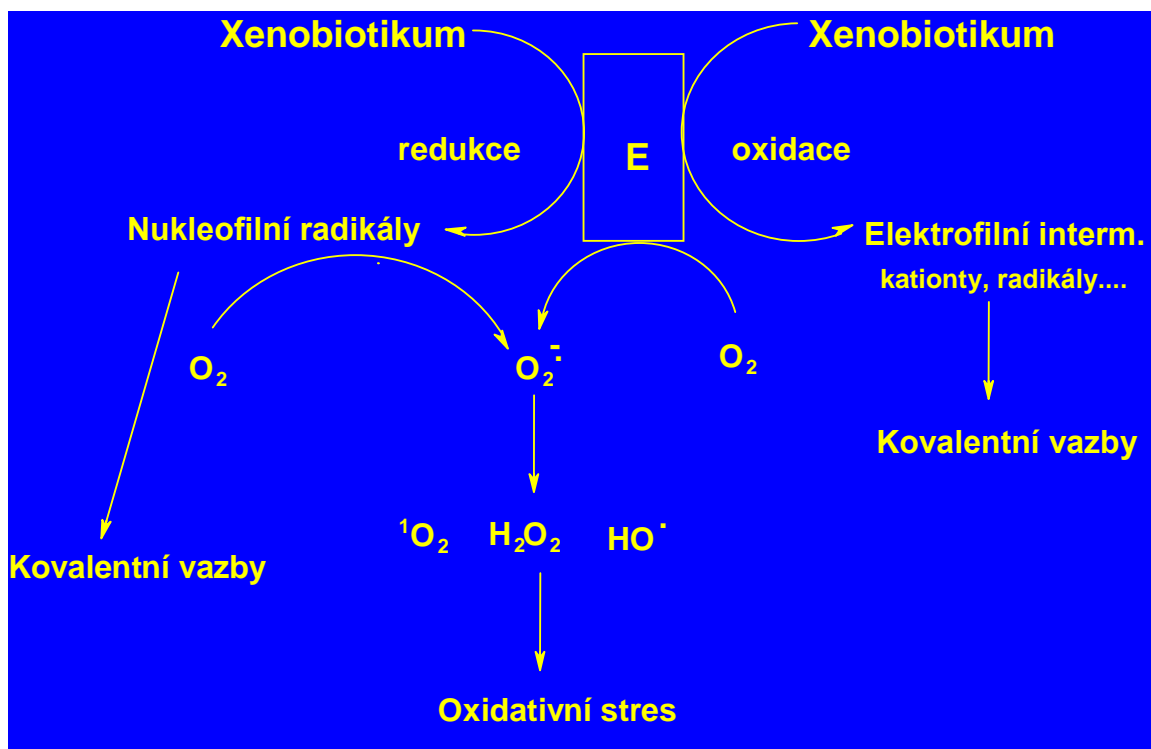
Je to enzym podílející se na konečném katabolismu purinů. Oxiduje hypoxanthin na xanthin a ten pak na kyselinu močovou. Katalyzuje i oxidaci některých aldehydů (acetaldehyd, benzaldehyd) na příslušné kyseliny. Nejvyšší aktivita xanthinoxidázy je v hepatocytech. Je to flavoprotein (obsahuje FAD) složený ze dvou podjednotek. V blízkosti –SH skupin jsou vázány molybden a železo. Akceptorem elektronů je molekula kyslíku. Průběh reakce je možný dvěma způsoby za vzniku peroxidu vodíku nebo superoxidu.

Za určitých okolností tentýž enzym funguje jako xanthindehydrogenáza. Místo molekuly obsahující cystein je totiž schopno vázat NAD^+ . V tomto případě nevznikají žádné ROS. Je-li změněna struktura vazebného místa, například účinkem tepla nebo proteáz, jsou elektrony místo na NAD^+ přenášeny přímo na kyslík a xanthindehydrogenáza se mění na xanthinoxidázu. K tomu dochází například při procesu reperfúze následující po přechodné ischemii (při fibrinolytické léčbě infarktu myokardu), po transplantaci orgánů, adhezi aktivovaných neutrofilů na buňky při zánětu (Racek a Holeček 1999).

BIOTRANSFORMAČNÍ ENZYMY

Při metabolismu látek tělu cizích (včetně léků), mohou vznikat aktivitou enzymů 1. fáze metabolismu (zvl. enzymů oxidačních a redukčních) volné radikály a velmi reaktivní intermediáty, které jsou nežádoucími produkty biotransformace (obr. 3). Mimo přímé působení mohou elektrofilní meziproducty toxicky působit pomocí mechanismu zahrnujícího interakce s molekulárním kyslíkem a tvorbu vysoce reaktivních kyslíkových částic, jež jsou schopné oxidovat tuky a proteiny a poškozovat DNA. Nejreaktivnější z těchto částic je hydroxylový radikál OH^\bullet . Dále sem patří superoxidový anion a peroxid vodíku (Řemínek 2006).

Konkrétním příkladem může být metabolismus klinicky velmi úspěšných cytostatik doxorubicinu a daunorubicinu, jejichž kardiotoxicita se vysvětluje vznikem volných radikálů a jejich vlivem na srdeční buňky po dlouhodobém podávání.



Obr. 3 : Biotransformace xenobiotik za vzniku volných radikálů. (Převzato z přednášky Kvasničková 2008). E – enzymy biotransformace

Dále se tvorby ROS v organismu mohou účastnit další enzymy. Jako například cyklooxygenáza, 5- a 12-lipoxygenáza, glukosaoxidáza, galaktát oxidáza, nitroxy syntáza a další enzymy.

4 VOLNÉ RADIKÁLY A JEJICH FYZIOLOGICKÁ FUNKCE

Volným radikálům je přisuzována role ve stárnutí, jsou příčinou různých chorob, jako například aterosklerózy, nemocí oběhového systému, rakoviny, cukrovky a dalších. Díky obrovským mediálním reklamním kampaním, propagující své produkty plné antioxidantů a slibující znovu navrácení zdraví a mládí, lidé zapomínají nebo vůbec nevědí, že volné radikály jsou pro naše tělo i nezbytně důležité. A to například v imunitních reakcích či buněčné signalizaci. V následujících kapitolách se pokusím nastínit pozitivní působení volných radikálů na lidské tělo.

4.1 Buněčná signalizace

Pochody ve všech mnohobuněčných organismech jsou řízeny intracelulárními i extracelulárními signály. Dochází ke komunikaci mezi buňkami v různorodých fyziologických procesech, jako jsou formování a růst tělesných orgánů, udržení homeostázy, opravné mechanismy při tkáňovém poškození, aj. Typické extracelulární signály spouštějící i přenos informací jsou růstové faktory, cytokiny, hormony a neurotransmitery, které se vážou na specifické buněčné receptory. Po jejich navázání na receptor dojde k vnitrobuněčné odpovědi, jako jsou například změny na iontových kanálech, aktivace receptorů spojených s G-proteinem, aktivace enzymů, ... Po aktivaci prvních posílů, následuje signalizace druhými posílami (cAMP, Ca²⁺, ...) a fosforylace proteinů. Díky těmto aktivačním kaskádám dochází k aktivaci transkripčních faktorů, které vedou k regulaci exprese specifických genů pro různorodé celulórní funkce.

Antioxidační systémy nikdy neodstraňují volné radikály zcela, ale udržují jejich hladiny v určitých mezích. Objevující se koncepty o mechanismech působení volných radikálů jako signálních molekul jsou stále diskutovány a nejsou ještě zcela objasněny.

Cytokinové receptory spadají do obrovské různorodé rodiny receptorů, které postrádají vnitřní kinázovou aktivitu a nejsou přímo spojeny s iontovými kanály ani G-proteiny. Cytokiny jako TNF- α , IL-1 a IFN- γ jsou prvními signály při tvorbě ROS v nefagocytujících buňkách. V případě TNF- α je mitochondriální zdroj ROS potřebný pro aktivaci transkripčního jaderného faktoru NF- κ B a NF- κ B dependentního transkripčního genu. Objevuje se také domněnka, že TNF- α může aktivovat NF- κ B mechanismem nezávislým na ROS. TNF- α indukující vznik mitochondriálních ROS by mohl mít za následek apoptózu. IL-1 má podobné účinky na buňky jako TNF- α (Thannickal a Fanburg 2000). Tyto cytokiny též okrajově indukují oxygenázu-1 v endoteliálních buňkách redox-dependentními mechanismy, které zahrnují protein-kinázu C, intracelulární Ca²⁺, fosfolipázu A₂ (Christi et al. 1999). IFN- γ je známý jako aktivátor NADPH oxidázy fagocytujících buněk, který hraje důležitou roli v obraně proti patogenním bakteriím. IFN- γ stimuluje na cyklooxygenáze závislou produkci ROS v hepatocytech, kde dochází k zastavení růstu bakterií.

Některé růstové faktory spojované RTKs (*receptor tyrosine kinases*) by mohly ukazovat na tvorbu intracelulárních ROS základních pro mitogenetickou signalizaci. U PDGF (*platelet - derived growth factor*) byla prokázána stimulace buněčné produkce peroxidu vodíku (Thannickal a Fanburg 2000).

Sundaresan et al. (1995) demonstroval schopnost PDGF přechodně zvyšovat intracelulární koncentraci peroxidu vodíku potřebnou pro PDGF-indukující tyrosin fosforylaci, aktivaci MAPK (*mitogen - activated protein kinase*), syntézu DNA a chemotaxi (Sundaresan et al. 1995, Thannickal a Fanburg 2000). PDGF se též účastní regulace genové exprese cestou vázanou na superoxid (Thannickal a Fanburg 2000), stimuluje produkci superoxidu v lidských aortálních hladkých svalových buňkách (HSMCs), aktivuje NF- κ B a indukuje MCP-1 mRNA (Marumo et al. 1997).

Receptory serin-treonin kinázy, které jsou zatím v savčí buňce popsány, patří do skupiny TGF- β 1. Tato obrovská skupina je tvořena z mnoha cytokinů zahrnujících TGF- β s, aktivátory, inhibitory, kostní morfogenetické proteiny (BMPs), Mullerianovy inhibiční

hormony, myostatin, aj. Vysoce podobné isoformy TGF- β 1, TGF- β 2 a TGF- β 3 silně inhibují proliferaci mnoha typů buněk, včetně epitelálních. K nejmocnější stimulaci růstu díky TGF- β dochází u mezenchymálních buněk. BMPs jsou silné induktory formace kostní hmoty a chrupavky a hrají důležitou roli ve vývoji břišního mesodermu, diferenciaci nervové tkáně a organogenezi. Aktivátory folikuly stimulujícího hormonu (FSH) jsou známé jako promotory erytropoézy a hřbetního mesodermu. Zároveň přispívají k přežívání nervových buněk. Některé růstové faktory patřící do rodiny TGFs hrají významnou roli v tkáňové homeostáze. Jejich nepatříčné fungování by mohlo být zapleteno do některých patologických jevů, jako například fibróza, revmatoidní artritida nebo cancerogeneze (Piek et al. 1999). U TGF- β 1 byla prokázána stimulace tvorby ROS v různých typech buněk. Specifické molekulové cíle stimulace ROS pomocí TGF- β 1 jsou neznámé, ale prooxidantní účinek na různé buňky by mohl řídit některé fyziologické reakce. Například apoptózu, autoindukci TGF- β , buněčnou transformaci, syntézu kolagenu a diferenciaci myofibroblastů (Thannickal a Fanburg 2000).

Receptory spojené s G-proteiny patří do největší skupiny povrchových receptorů charakterizovaných u savců. Několik ligandů, které se spojují v tyto receptory mají schopnost vytvářet ROS v různých buněčných systémech. Například angiotensin II, serotonin, bradykinin, trombin a endotelin.

ANG II je vasoaktivní peptid, který má proliferativní a hypertrofický efekt na cévní hladký sval. U ANG II byla prokázána stimulace produkce ROS ve svalových, glomerulárních, endoteliálních buňkách, v buňkách renálních proximálních tubulů (Thannickal a Fanburg 2000). ANG II stimuluje regeneraci superoxidu aktivací NADH/NADPH oxidázy v hladkých svalových buňkách (Griedling et al. 1994, Zafari et al. 1998). Z výsledků studií prováděných kolektivem kolem Zafariho (1998) vyplynulo, že ROS mohou zprostředkovat hypertrofickou odezvu a tak ovlivňovat patogenezi cévních onemocnění.

5-HT je vasoaktivní peptid, který způsobuje hyperplazii a hypertrofii v cévních hladkých svalových buňkách a funguje jako neurotransmitter v nervových buňkách. Ačkoliv se 5-HT váže na G-proteinové receptory, vyskytují se v buňkách i 5-HT receptory. Po navázání 5-HT na receptor dojde k fosforylaci tyrosinu díky GTPasovému aktivačnímu proteinu a to je spojeno se vznikem superoxidu NADPH oxidázou (Thannickal a Fanburg 2000).

Bradykinin zprostředkuje rozšíření cév uvolněním mediátorů, jako je například NO[•]. Je také schopný vytvářet ROS v cévních endoteliálních buňkách a keratinocytech. Produkce ROS v endoteliálních buňkách se zdá být spojena s přeměnami kyseliny arachidonové a to cestou cyklooxygenázy nebo PGH syntázy (Thannickal a Fanburg 2000).

Receptory založené na principu iontových kanálů zprostředkovávají rychlé synoptické signalizování mezi buňkami na základě otevírání a zavírání iontového kanálu. Ligandem, který po nasednutí na receptor otevře či zavře iontový kanál je neurotransmitter, jako například ACH, 5-HT, glutamát, glycin či GABA. O ROS signalizování přes iontové kanály je známo velmi málo. Glutamát zprostředkuje produkci ROS v nervových buňkách a to mechanismy, které jsou závislé i nezávislé na změnách v hustotě iontů uvnitř buněk. ACH je schopen aktivovat ATP senzitivní K⁺ kanály a zvýšit tvorbu mitochondriálních ROS, které fungují jako intracelulární signál v kardiomyocytech (Thannickal a Fanburg 2000).

Oxid dusnatý působí ve třech funkčních oblastech, odpovídajících přítomnosti jeho jednotlivých syntáz. V CNS a autonomním nervovém systému existuje neurotransmitter (ACH, noradrenalin, aminokyseliny) v synaptické štěrbině několik milisekund, než je rozložen nebo odstraněn. Oxid dusnatý perzistuje několik sekund a jako snadno difundující látka z jedné synapse zasáhne oblast s několika miliony synapsí. Působí tedy spíše jako modulátor ovlivňující oscilační chování neuronální sítě. Jako neurotransmitter je NO[•] nezbytný pro vasodilataci cév *corpus cavernosum*. Stimulace pánevních nervů uvolní z neuronů NO[•], který difunduje do cévního svalstva *corpus cavernosum*, kde aktivuje guanylátcyklázu, tím zvýší hladinu cGMP a sníží fosforylaci lehkého řetězce myozinu. Výsledná vasodilatace je podstatou erekce penisu (Štípek et al. 2000).

NO[•] produkovaný NOS III je významným vasodilatátorem, inhibítorem agregace a adheze trombocytů a inhibítorem leukocytů na povrch endotelových buněk. Má i antiproliferativní účinek. V krevním oběhu působí jako zvláštní hormon. Dvouatomová molekula NO[•] však nemůže informaci uložit do své struktury, sděluje ji pomocí své koncentrace. Endotel produkuje 10-40x více NO[•], než je potřeba k aktivaci guanylátcyklázy a k vasodilatačnímu efektu. Většinu však pohltní erytrocyty, neboť NO[•] je rychle vychytáván železem oxyhemoglobinu (Štípek et al 2000).

ROS významně vstupují do role i při oplodnění vajíčka spermii. Pro spermii je potřebný superoxid a peroxid vodíku. Superoxid naruší membránu vajíčka, aby se spermie mohla dostat dovnitř. Peroxid vodíku se tvoří ve vajíčku po oplodnění a zabraňuje dalšímu pronikání spermii. Pokud se vytvoří nadměrné množství radikálů, změní se fyziologická funkce spermie. Sníženou schopnost oplodnění vajíčka způsobuje nízká koncentrace peroxidu vodíku (Richterová 2008).

Příkladů vztahu mezi VR a buněčnou signalizací je nepřeberné množství, a věnování se jim dopodrobna by vydalo na samostatnou práci.

4.2 Imunitní ochrana

Fagocytóza je nejvýznamnější část přirozené imunity proti mikroorganismům. Je to složitý mnohastupňový děj vyznačující se celým spektrem mezibuněčných interakcí zprostředkovaných cytokiny a membránovými molekulami, na jehož konci je snaha o eliminaci mikroorganismů, stárnoucích buněk a dalšího endogenního materiálu. Mikroorganismy mají na svém povrchu molekuly, které jsou evolučně vysoce konzervované. Buňky nespecifické imunity identifikují tyto molekuly pomocí svých receptorů (PRR). Fagocytujícími buňkami jsou neutrofilní granulocyty, ničící převážně extracelulární bakterie, monocyty – makrofágy ničící pozůstatky vlastních buněk, intracelulární bakterie a dendritické buňky.

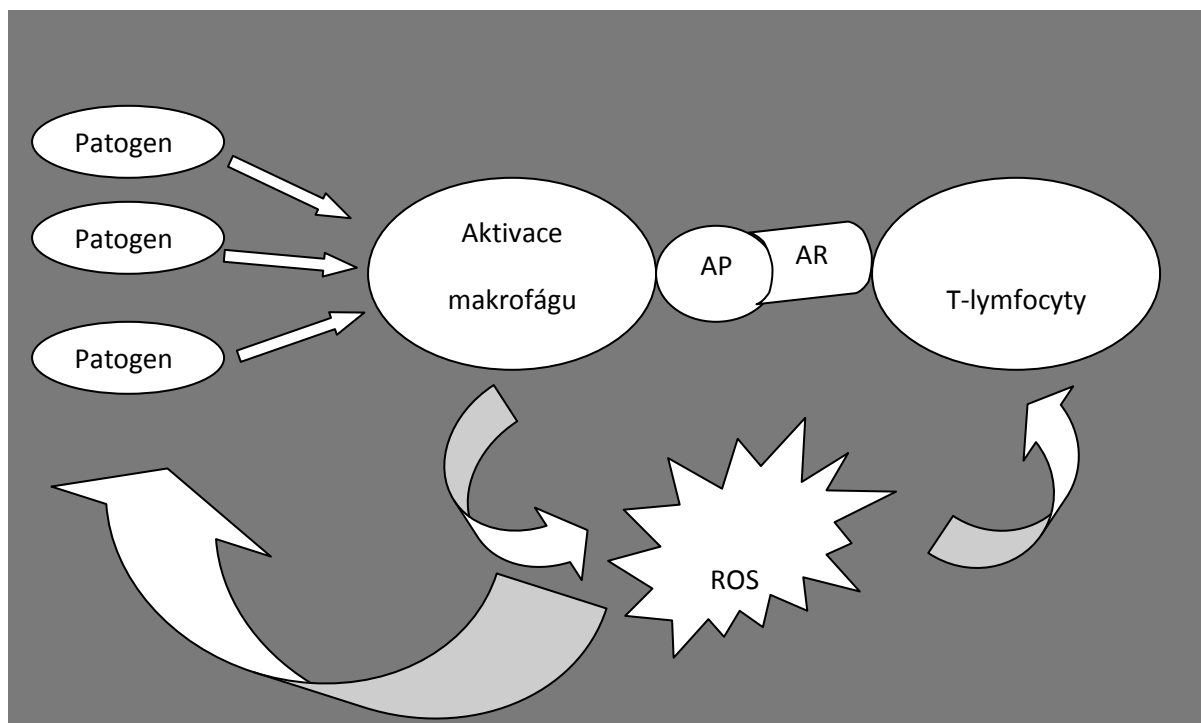
Aktivace fagocytů probíhá stimulací Fc-receptoru, lektinů, C3b a C5a složkami komplementu a dalšími působky. Po tzv. opsonizaci adherují bakterie k povrchu fagocytů a jsou obklopeny povrchovou membránou fagocytu a uzavřeny do nově vzniklé vakuoly – fagosomu. Už během vytváření fagosomu a hlavně po jeho ukončení dochází k jeho fúzi s lysosomy, a vznikne fagolysosom. Uvnitř fagolysosomu dochází k destrukci pohlcené částice za vzniku silně kyselého prostředí hydrolýzami, myeloperoxidázou, defensiny a sérovými proteiny, kolagenázou, gelatinázou a dalšími na kyslíku nezávislými procesy.

Dojde také k interakci Fc-receptorů a komplementových receptorů s opsonizovanými částicemi, což vede k rychlé aktivaci membránového enzymu NADPH oxidázy. Ten katalyzuje reakci, při níž NADPH reaguje s kyslíkem za vzniku NADP^+ a superoxidového

radikálu. Z něj dalšími reakcemi vzniká singletový kyslík, peroxid vodíku a hydroxylový radikál. Tato velmi reaktivní oxidační činidla narušují strukturu biopolymerů mikroorganismů, ničí aktivitu jejich enzymů a poškozují DNA. Vzniklý peroxid vodíku reaguje s chloridovým aniontem za vzniku baktericidních chlornanových aniontů. Děje zahájené aktivací NADPH oxidázy se nazývají oxidační vzplanutí, neboť jsou provázeny velkou spotřebou kyslíku. Dalším účinným mikrobicidním prostředkem fagocytů je oxid dusnatý, který produkuje enzymový komplex NOS. K aktivaci tohoto komplexu dochází zejména v makrofázích pod vlivem cytokinů produkovaných lymfocyty T_H1 (IFN- γ , TNF- α). NADPH oxidázový systém je účinný v ničení pohlcených extracelulárních patogenů, oxid dusnatý je hlavním nástrojem zabíjení intracelulárních parazitů makrofágy. Tyto produkty se mohou dostávat i mimo fagocyty a způsobují destrukce vlastních tkání v místě zánětu (Hořejší a Bartůňková 2005).

Velkou roli v imunitních reakcích hrají i lymfocyty. Ty jsou aktivovány nasednutím antigenních peptidů na příslušné receptory. Funkční aktivita T-lymfocytů je silně zvýšena přítomností ROS. Superoxid nebo fyziologicky významná hladina peroxidu vodíku zvyšují produkci IL-2 a tak povzbuzují aktivitu T-lymfocytů (Dröge 2002).

Patogeny způsobí masivní produkci ROS makrofágy v místě zánětu. Pokud některé patogeny uniknou destruktivnímu působení makrofágů, během několika dní dojde k jejich obrovskému nárůstu. Antigenní peptid produkovaný uvnitř aktivovaného makrofágu přítomný na MHC se připojí na antigenní receptor T-lymfocytu. Tato interakce spustí proliferaci a diferenciaci T-lymfocytů. Namnožené buňky se ihned začnou zapojovat do imunitních reakcí (viz. obrázek 4). ROS produkované makrofágy při zánětu zvyšují AR zprostředkované signální kaskády a snižují tím práh pro aktivaci T-lymfocytů. Bez tohoto účinku by T-lymfocyty vyžadovaly pro aktivaci relativně vysoké koncentrace antigenních peptidů. Tím by docházelo k velkým časovým ztrátám v boji proti patogenům (Dröge 2002).



Obr. 4 : Funkce ROS v imunologické odpovědi způsobené patogeny. (Upraveno z Dröge 2002). AP – antigenní peptid, AR – antigenní receptor

4.3 Volné radikály jako nástroj oxidáz a oxygenáz

Současné formy života potřebují na pokrytí svých energetických výdajů velké množství volné energie. Tu lze uvolnit pouze přenosem elektronů ze živin na kyslík. Funkčně posledním enzymem dýchacího řetězce ve vnitřní mitochondriální membráně je cytochromoxidáza, která přijímá elektrony pocházející ze živin a předává je na molekulární kyslík. Redukuje ho čtyřmi elektrony za vzniku dvou molekul vody, přičemž se uvolní energie pro syntézu ATP. Redukce kyslíku na aktivním centru enzymu probíhá ve čtyřech stupních. Podstatné je, že toxické meziprodukty (peroxid vodíku a superoxid), zůstávají navázány na enzym. Mimo něj by ihned tvořily reaktivní metabolity a poškozovaly by okolní biomolekuly. Monooxygenázy podobným způsobem aktivují kyslík v endoplazmatickém retikulu nebo v mitochondriích nadledvinek. V tomto případě je kyslík redukován třemi elektrony na úroveň hydroxylového radikálu, který je použit k hydroxylaci řady endogenních a exogenních látek,

včetně léků (aromatické uhlovodíky, aminy, steroidy,...). Tato hydroxylace je významnou reakcí při syntéze cholesterolu a při jeho přeměně na žlučové kyseliny. Xenobiotika se po hydroxylaci mohou konjugovat s hydrofilními látkami, stanou se rozpustnější ve vodě a snadněji se vyloučí z těla ven (Štípek et al. 2000).

5 VÝZNAM VOLNÝCH RADIKÁLŮ V PROCESU STÁRNUTÍ

5.1 Mitochondrie

Současné formy života potřebují na pokrytí svých energetických výdajů velké množství volné energie. Tu lze uvolnit pouze přenosem elektronů ze živin na kyslík. Metabolismus všech aerobních organismů je tedy závislý na spojení dýchacího řetězce a oxidativní fosforylace.

Mitochondrie vyrábějí asi 90% energie spotřebovávané buňkami, tkáněmi a orgány. Podílejí se na komplikovaných respiračních reakcích buňky, jejichž konečným produktem je molekula ATP, jejíž makroergní vazby slouží jako nosič energie. Oxidoredukčních reakcí se v mitochondriích účastní čtyři komplexy proteinů, koenzym Q a cytochrom C. Každý komplex se skládá ze 13 proteinů kódovaných mitochondriální DNA.

ATP se v buňce tvoří oxidativní fosforylací, která navazuje na Krebsův cyklus. Oxidativní fosforylace je proces buněčného dýchání, kdy je energie uvolněná oxidací živin využita k tvorbě ATP. Například energie vázaná v 1 molekule glukosy se přemění na makroergní vazby 38 molekul ATP. Energie z ATP je uvolňována hydrolytickou degradací na ADP. Konverzí ATP na ADP se získá energie o hodnotě asi 20,3 kJ/mol.

Funkce mitochondrií vyplývá z jejich bohatého enzymatického vybavení. Vnitřní membrána obsahuje složky dýchacího řetězce a enzymy tvorby ATP.

Dýchací řetězec představuje sled na sebe napojených redoxních párů nacházející se na vnitřní mitochondriální membráně přenášející atomy vodíku a poté jeho elektrony na

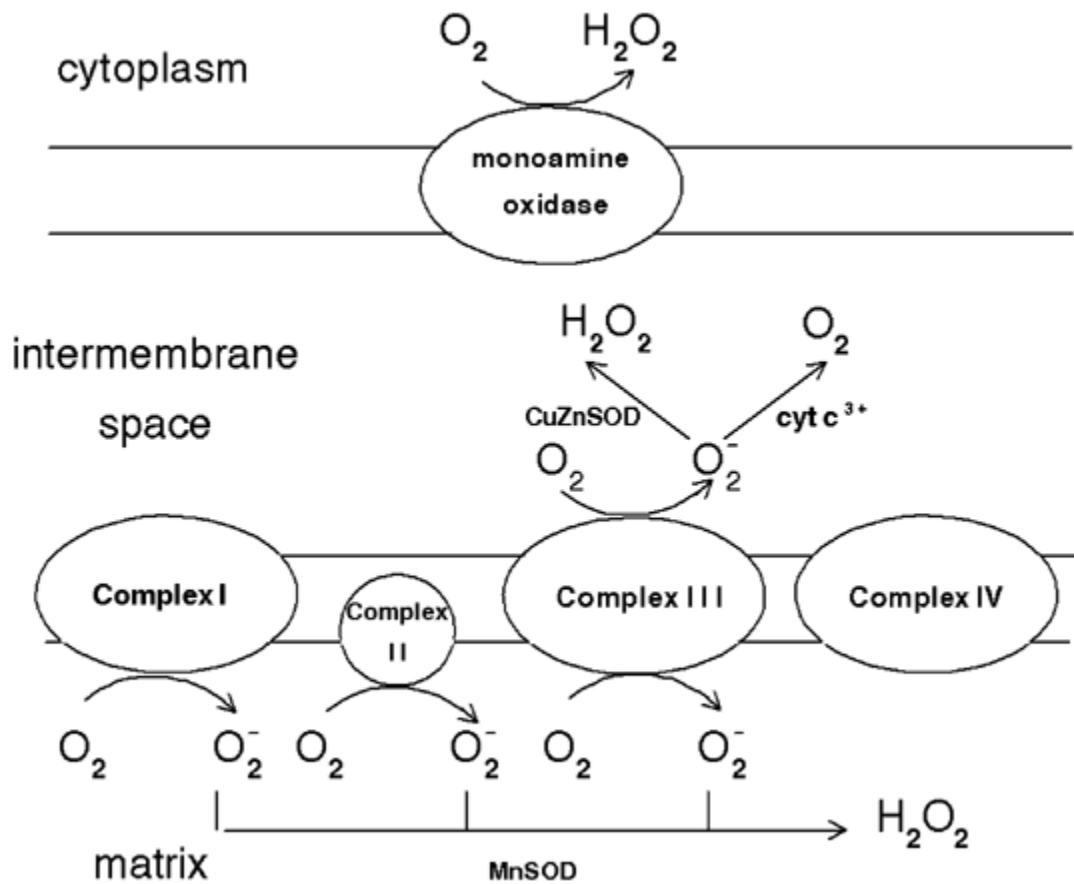
atmosférický kyslík. Poslední skupinu přenašečů tvoří enzym cytochromoxidáza, který na kyslík postupně přenesl 4 elektrony. Vzniklý anion O^{2-} ihned reaguje s okolními protony za vzniku dvou molekul vody. Uvolněná energie je využita pro tvorbu ATP.

Mitochondriální dýchací řetězec je složen z několika komplexů oxido-redukčních center, ze kterých mohou elektrony uniknout na kyslík a stát se tak zdrojem superoxidu. Za produkci superoxidu v plicní a srdeční tkáni se zdá být odpovědný komplex III a v mozkové tkáni komplex I (Koubková 2008).

Komplex I produkuje většinu superoxidu nejspíše v průběhu reverzního přenosu elektronů ze sukcinátu na NAD^+ . Avšak vznik superoxidu díky komplexu I nebyl ještě zcela objasněn. Výsledky studií naznačují, že zahrnuje FeS centrum N2 a související ubiqlinonová (koenzym Q) vazebná místa (Brand et al. 2004).

Součástí komplexu III je koenzym Q, který je plně redukovaný na vnitřní straně mitochondriální membrány a poté migruje na vnější stranu membrány a přináší s sebou $2H^+$, které jsou důležité pro udržení ADP fosforylace. Na vnější straně membrány je jeden elektron přemístěn do cytochromu c_1 a má za následek formaci $Q\cdot$. Druhý elektron je použit k redukci cytochromu b. Může se stát, že nějaký elektron unikne na kyslík a dojde k jeho redukci na superoxid a cytochrom b nemůže být redukován. Actimycin, inhibitor dýchacího řetězce vážící se na cytochrom b, může zvyšovat koncentraci $Q\cdot$ a tím i vznik superoxidu. Koenzym Q je zdrojem superoxidu, když je redukován pouze částečně (semichinonová forma), a antioxidantem je-li redukován zcela (Turrens 2003).

Redukcí vznikajícího superoxidu vznikají další reaktivnější volné radikály. Proto mají mitochondrie antioxidantní mechanismy, které zabraňují následnému poškození buněk. V matrix mitochondrií se nachází MnSOD, což je superoxidodismutáza, která ve svém aktivním centru obsahuje mangan. Je to enzym skládající se ze 4 proteinových podjednotek. Tento enzym přeměňuje vzniklý superoxid vzniklý v komplexech I a III na méně reaktivní peroxid vodíku a kyslík. V intermembránovém prostoru se o deaktivaci peroxidu vodíku starají CuZnSOD a cytochrom-c a dochází zde i ke spontánní dismutaci superoxidového radikálu (Turrens 2003).



Obr. 5 : Vznik superoxidu v mitochondriích a jeho inaktivace (převzato z práce Turrens 2003)

Většina živočišných buněk obsahuje stovky až tisíce mitochondrií. Jsou to jediné orgány, které mají vlastní DNA (mtDNA). Je kruhová a obsahuje 37 genů: 22 pro tRNA, 2 rRNA a 13 transmembránových proteinů, které jsou podjednotkami komplexů I, III, IV a V. Ostatní proteiny jsou kódovány nukleární DNA. Množství mtDNA je v porovnání s jadernou podstatně nižší (asi 1%). Je pravděpodobné, že vzhledem k hydrofobnímu charakteru syntetizovaných proteinů, může mtDNA být transportována do jádra a pak využívána v mitochondriích pro rychlou potřebu jejich funkcí.

Komplex I dýchacího řetězce obsahuje 7 mtDNA pro kodování proteinů. Struktura a funkce těchto molekul je poškozována vzrůstajícím počtem volných radikálů v průběhu

stárnutí. Děje se tak rychleji a intenzivněji v porovnání s ostatními proteiny komplexu II a III. Cytochrom c oxidáza také snižuje svoji aktivitu stářím buněk, což se projevuje zvyšující se produkcí superoxidu a peroxidu vodíku. Uvedené změny ve struktuře membránových proteinů zásadně ovlivňují oxidační fosforylaci v mozku a svalech (encefalomyopatie) a tak se dále znovu zvyšuje oxidační poškození proteinů vnitřní mitochondriální membrány i zvýšení počtu volných radikálů (pravděpodobně jedna z příčin Parkinsonovy choroby). Prozatím nebylo zcela prokázáno, že výsledkem uvolněného superoxidu z komplexu je poškození mtDNA.

Nefunkční mitochondrie jsou štěpeny lysosomy a eliminují se z buňky. Aktivita lysosomů však klesá stářím buněk a i méně funkční mitochondrie zůstávají, mění tvar a snižuje se jejich množství.

Lipidy mitochondriální membrány, nezbytné pro udržení její struktury a funkce jsou poškozeny uvolněným superoxidem zvláště z komplexu III. Ten způsobí lipoperoxidaci vnitřní membrány i poškození mtDNA a při masivním výskytu i nukleární DNA. Značně se mění membránový potenciál, jeho zvýšení zvyšuje produkce radikálu. V roce 1997 a 1998 byly snahy najít biomarkery stárnutí v buňkách létacího svalů hmyzu, protože enzymy syntézy ATP a akonitáza jsou v těchto buňkách výrazně a rychle oxidovány.

Dalším přenašečem elektronů v dýchacím mitochondriálním řetězci je CoQ. Jeho množství klesá s přibývajícím věkem organismu. 80-ti letý člověk má poloviční množství tohoto koenzymu ve srovnání s 20-ti letým. Výsledkem je nižší zisk energie a postiženy jsou nejdříve buňky těžce pracujících orgánů: srdce, ledvin, kosterního svalů a nervových buněk, které mají největší spotřebu ATP pro udržení stálé aktivity Na/K pumpy. Z toho vyplývá, že prvními příznaky snížené funkčnosti mitochondrií jsou pozorovány v nervových a svalových buňkách (Best 2008).

Mitochondriální teorie stárnutí poukazuje na skutečnost, že změny mtDNA jsou 20x častější než nDNA. Tato nukleová kyselina nemá ochranný obal histonů a její reparační systém je méně výkonný, než enzymy reparace nDNA. Barja (2000) uvádí výsledky porovnání délky života a množstvím markerů oxidačního poškození (mitochondriálního superoxidu, peroxidu vodíku a poškozené mtDNA v srdci a mozku) u dvou skupin. První skupinou byla běžná laboratorní zvířata a druhou tvořili nehumánní primáti. Nalezl shodu mezi velikostí přirozeného oxidačního stresu a délkou přežití zkoumaných jedinců.

V mnoha pracích je dokumentováno nebo jen zmíněno oxidativní poškození důležitých biomolekul v mitochondriích, které přispívají ke stárnutí organismu hlavně tím, že nejsou funkčně aktivní a nesyntetizují dostatek molekul ATP, která by pokryla energetické nároky buněk.

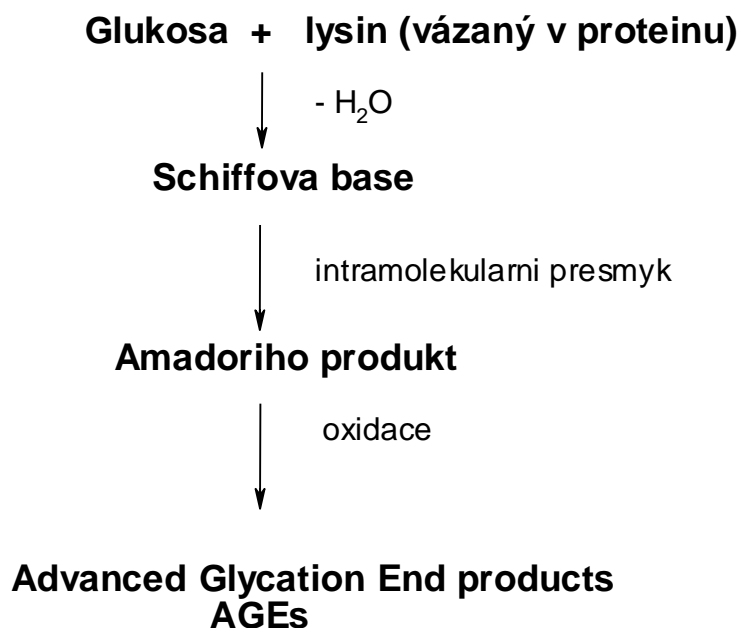
5.2 Glykace

Glykace (Maillardova reakce) je neenzymová glykosylace, kdy redukující cukr reaguje s volnou aminoskupinou aminokyseliny peptidického řetězce za tvorby specifických produktů. Nejčastější aminokyselinou je lysin a arginin a průběh reakce je schematicky znázorněn na obr. 6. Glukóza nebo jiný monosacharid (α -hydroxaldehydy) vytvoří s volnou aminoskupinou nestabilní Schiffovu bázi. Intermolekulárními přesmyky vzniká stabilnější Amadoriho produkt, který následnou oxidací přechází na konečný product glykace *Advanced Glycation End product(s)* – AGEs. Tato poslední fáze je nevratná a AGE je termodynamicky stabilní.

Monosacharidy, které se účastní glykace jsou schopny existence v lineární formě, která je více reaktivní. V pokusech *in vitro* jsou různě aktivní v porovnání s glukózou: galaktóza 5x, fruktóza 8x, deoxyglukóza 25x, ribóza 100x a deoxyribóza 200x aktivnější (Best 2008)

V podmínkách *in vivo* a *in vitro* byla od roku 1971 studována glykace hemoglobinu a kolagenu a brzy byl zjištěn její význam pro patogenezi různých onemocnění. Souvislost mezi glykací a diabetem byla prokázána zjištěním, že adukty bílkovin oční čočky a hexóz mají stejné vlastnosti jako adukty izolované z čoček postižených kataraktou (Obšil a Pavlíček 1997). Další souvislosti byly nalezeny při studiu autooxidace glukózy a oxidace Amadoriho produktů, které produkují peroxid vodíku a volné radikály, a vznikem a velikostí oxidativního stresu. Lipoperoxidace lipidové části LDL, fosfolipidů membrán a proteinů hrají velkou roli ve stárnutí buněk.

Rychlost Maillardovy reakce a akumulace AGEs jsou v přímé souvislosti s množstvím volných radikálů, což podporuje radikálovou teorii stárnutí. Best (2008) považuje AGEs za univerzální marker stárnutí kůže, plic, svalů, ledvin a krevního řečiště.



Obr. 6 : Stručné schéma glykace

I nízká aktivita glykace způsobuje fyzikální změny kolagenů. Výsledkem jsou změny pružnosti a permeability membrán doprovázející stárnutí buněk a změny membrán např. ledvinných buněk s následným selháním ledvin. Rychlost Maillardovy reakce a tvorby AGEs je urychlována až 50x volnými radikály (Obšil a Pavlíček 1997 a <http://www.anti-aging-guide.org/glycation-theory-of-aging.html> 2009).

5.3 Oxidační stres a poškození biomolekul

Oxidoredukční stav buňky je definován kapacitou antioxidačního systému, dostupností redukčních ekvivalentů a intenzitou oxidační zátěže, které je buňka vystavena příjmem ROS a RNS z okolí i z intracelulárních zdrojů. Oxidační stres je stav, kdy je narušena rovnováha mezi těmito faktory a dochází k oxidačním poškozením, indukovaným volnými radikály. Oxidační stres je vyvolán nadměrnou produkcí ROS nebo RNS, nedostatečnou funkcí antioxidačních systémů (SOD) nebo spojením obou faktorů.

5.3.1 Peroxidace lipidů

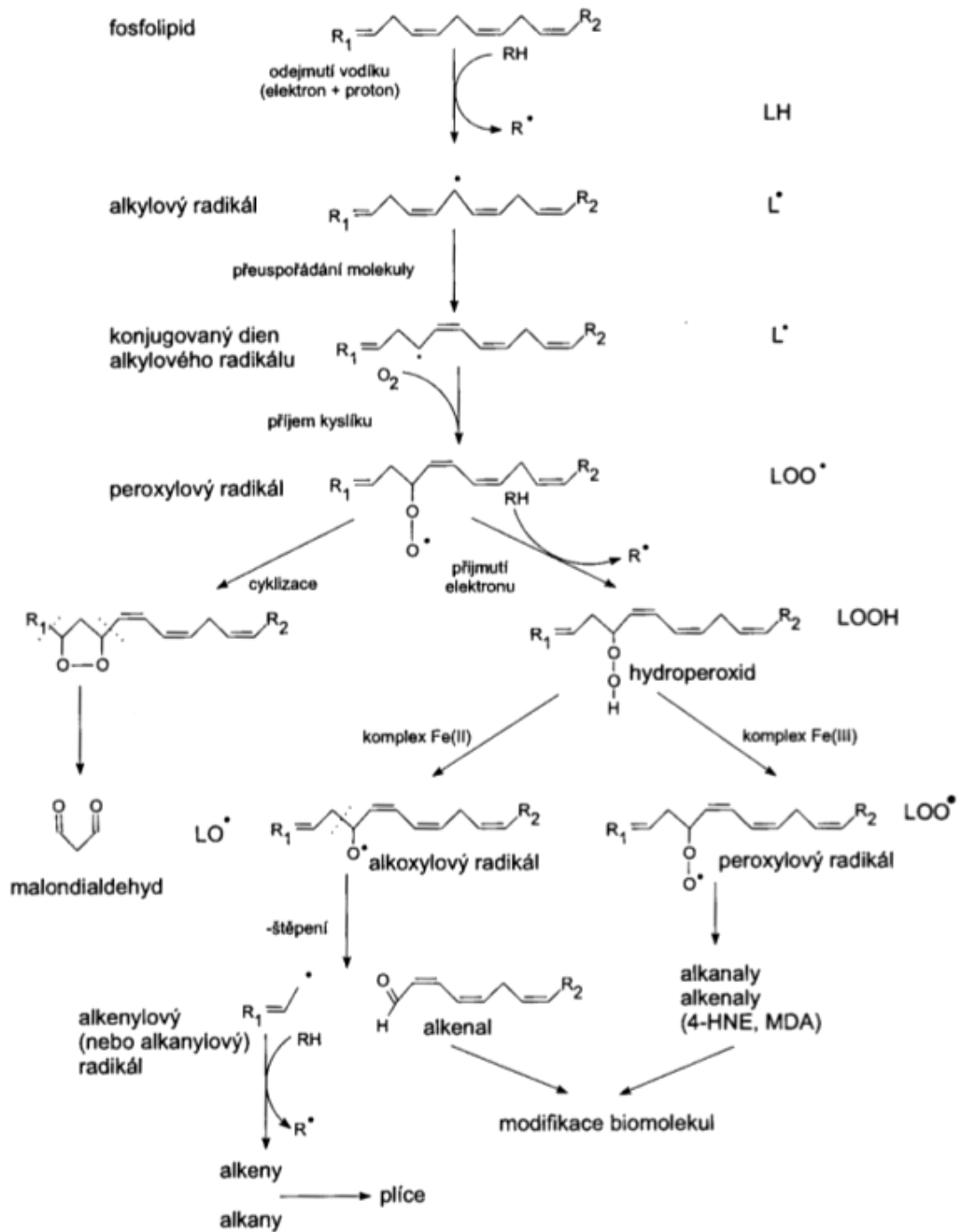
Peroxidace lipidů je autooxidační radikálová řetězová reakce, která vede k jejich poškození. Této reakci podléhají hlavně polynenasycené mastné kyseliny (PUFA), obsahující dvojné vazby náchylné k peroxidaci. Stejně jako ostatní radikálové reakce je peroxidace lipidů složena ze tří kroků. Iniclace, terminace a propagace.

Radikálovou reakci může iniciovat jakákoliv látka, která má schopnost vytrhnout atom vodíku z methylenové skupiny uhlovodíkového řetězce polynenasycené mastné kyseliny, tedy i ROS (OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, RO^\bullet , ROO^\bullet , ...). Mastná kyselina (LH) se změní na uhlíkový radikál (L^\bullet). Po vytržení vodíku se elektrony v uhlovodíkovém řetězci usprádají tak, že se střídá jednoduchá vazba s dvojnou a vznikne konjugovaný dien. Ten se spojí s molekulárním kyslíkem za vzniku peroxylového radikálu (Ambrožová 2008). Peroxylový radikál (LOO^\bullet) nacházející se uvnitř uhlíkatého řetězce mastné kyseliny může podlehnout cyklizaci a přemění se na cyklický peroxid, který po sekundární cyklizaci a spárování s kyslíkem přechází endoperoxid a ten na malondialdehyd, který je schopen reagovat s DNA bázemi a na buňky působí mutageně. Peroxylový radikál může také vytrhnout elektron ze sousední mastné kyseliny a takto vytvořit hydroxyperoxid (LOOH). Ten dále reaguje s redoxními kovy (např. Fe^{2+} , Fe^{3+}) a dochází k produkci alkoxylových (LO^\bullet) (Koubková 2008) nebo peroxylových radikálů. Po rozštěpení se mohou vytvářet molekuly, které jsou makery peroxidace lipidů (viz. obrázek 7). K terminaci dochází při styku radikálu s jiným radikálem nebo vitamínem E, který je zabudován do buněčné membrány.

V organismu probíhají 2 typy peroxidace lipidů. Jeden škodí a druhý slouží fyziologickým pochodům.

Neenzymová peroxidace lipidů je vyvolána nesespecifickým, mnohdy patologickým faktorem a probíhá výše popsaným způsobem. Dává směs různých produktů, neboť řetězce modifikovaných mastných kyselin se snadno štěpí na kratší produkty, včetně uhlovodíků, které vydechujeme (ethan, pentan) a toxických aldehydů (MDA a 4-HNE), které se pevně navazují na proteiny a mění jejich životnost a funkci. Takové peroxidace mění fluiditu membrán, zvyšují jejich propustnost pro ionty a tak působí lýzu buněk a snižují membránový potenciál.

Enzymová peroxidace lipidů probíhá na aktivních centrech hydroperoxidáz a endoperoxidáz (COX, lipooxygenáza) a produkuje stereosecifické a biologicky aktivní látky (prostaglandiny a leukotrieny), důležité v řízení buněčných dějů a v imunitních procesech. Volné radikály jsou nezbytnými meziprodukty těchto syntéz, nejsou však uvolňovány z enzymu a tak neškodí. Kromě toho vznikají i silné oxidanty, které jsou uvolňovány do prostředí a zneškodňovány antioxidačním systémem organismu (Štípek et al. 2000).



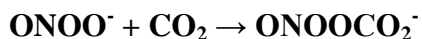
Obr. 7 : Schéma lipidové peroxidace. (Převzato z práce Štípek et al. 2000).

5.3.2 Poškození proteinů

Mechanismy spojené s oxidací proteinů ROS byly objasněny studiemi, ve kterých byly aminokyseliny, jednoduché peptidy a proteiny vystaveny ionizujícímu záření tak, aby se vytvořily ROS (hydroxylový radikál, superoxid). Výsledky těchto studií ukázaly, že reakce s hydroxylovým radikálem vedou k odnětí vodíkového atomu z α -uhlíku aminokyseliny a vytvoření radikálu, který pohotově reaguje s kyslíkem za vzniku peroxylového radikálu. Peroxylové radikály jsou pak převedeny na alkylperoxyd reakcemi s protonovanou formou superoxidového radikálu. Za nepřítomnosti ionizujícího záření mohou být reakce zahájeny hydroxylovým radikálem vyprodukovaným Fentonovou reakcí. Za nepřítomnosti záření jsou proteiny odolné proti škodlivosti peroxidu vodíku, pokud nejsou přítomny kovy (Fe, Cu).

Poškození proteinů, katalyzované kovy, zahrnuje oxidativní štěpení, ztrátu histidinového zbytku, zesítnění tyrosinů a formace proteinů. Aminokyselinové zbytky proteinů jsou náchylné k oxidaci ionizujícím zářením a reakcí s volnými radikály. Zbytky prolinu, histidinu, argininu, lysinu a cysteinu jsou velmi citlivé k oxidaci redukčními kovy (Fe, Cu). Železo se naváže vazbou na protein. Fe^{2+} -proteinový komplex reaguje s peroxidem vodíku Fentonovou reakcí a tvoří hydroxylový radikál.

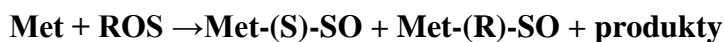
Oxid dusnatý reaguje rychle se superperoxidovým radikálem na vysoce toxický peroxyinitrit, který nitruje cystenové sulfhydrylové skupiny proteinů, nitruje tyrosinové a tryptofanové zbytky proteinů a oxiduje metioninové zbytky na methioninsulfoxid. Nicméně proces modifikace proteinů peroxyinitritem je silně potlačený fyziologickou koncentrací CO_2 . S ním peroxyinitrit rychle reaguje za vzniku $ONOO^-$ (nitroperoxykarbonátu).



Nitrace tyrozinových zbytků je ireverzibilní proces a pravděpodobně předchází fosforylaci nebo adenylaci tyrosinových zbytků regulačních proteinů.

Cysteinové a metioninové zbytky proteinů jsou zvláště náchylné k oxidaci ROS. Nicméně oxidace siřných aminokyselin jsou reverzibilní. Oxidované produkty cysteinu, intra- (R-S-S-R) a intermolekulární (R₁-S-S-R₂) proteinové zkřížené vazby derivátů mohou být opraveny disulfidovými výměnnými reakcemi katalyzovanými thioltransferázou. Oxidace

metioninového zbytku proteinu vedou ke vzniku směsi S- a R-izomerů methioninsulfoxidu. Met-(S)-SO a Met-(R)-SO.



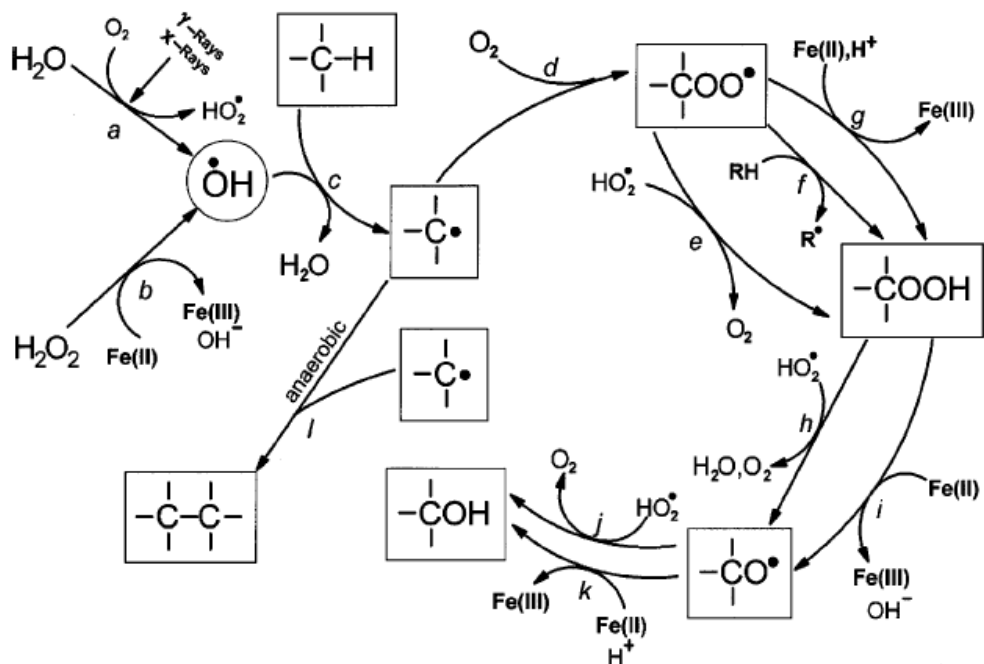
Protože téměř všechny formy ROS jsou schopny oxidace methioninového zbytku proteinu na methioninsulfoxid, je předpokládáno, že cyklická oxidace a redukce methioninových zbytků slouží jako antioxidační ochrana buněk před oxidativním poškozením (Valko et al. 2006).

S membránovými proteiny a s proteiny lipoproteinových částic (VLDL, LDL) reagují krom jednoduchých ROS a RNS též alkoxylové a peroxylové radikály lipidů (LO^\bullet , LOO^\bullet), které vznikají při lipoperoxidaci. Proteiny jsou poškozovány také železem koordinovaným na jejich strukturu. Lyzylový zbytek v proteinu ($\text{R-CH}_2\text{-NH}_2$) slouží jako jeden z ligandů schopných vázat Fe^{2+} , takže s peroxidem dává Fentonovu reakci a hydroxylový radikál hned na místě svého vzniku vytvoří alkylový radikál ($\text{R-}\bullet\text{CH-NH}_2$). Přesun elektronu na Fe^{3+} zregeneruje Fe^{2+} a z radikálu vznikne Schiffova báze (R-CH=NH), která spontánně hydrolyzuje na R-CHO a NH_3 . Modifikovaný protein je substrátem řady nespecifických proteáz, které ho odstraní (Štípek et al. 2000).

Při zánětu produkují neutrofilny superoxidový radikál a také uvolňují myeloperoxidázu, která katalyzuje konverzi peroxidu vodíku a chloridového aniontu na kyselinu chlornou. HOCl oxiduje methionin, chloruje tyrosin, dává vznik chloraminovým derivátům aminoskupin lysinu, oxiduje sulfhydrylové skupiny. Další reakce HOCl se superoxidem vede k produkci hydroxylového radikálu, který představuje další mechanismus iniciace oxidace proteinů (Koubková 2008).

Oxidované proteiny jsou často neaktivní a jejich odhalení je spojeno se zvýšením vnímavosti k proteázám. Takto buňky mohou odstranit oxidované proteiny proteolýzou. Ale ne všechny poškozené proteiny dokáží buňky odstranit. Ty se postupně hromadí v buňkách a promítnou se ve stárnutí a patologických stavech. Například cukrovka, ateroskleróza a neurodegenerativní onemocnění. Oxidace proteinů může někdy hrát kontrolní roli v růstu a vývoji buněk. Proteiny jsou tedy klíčovými cíly při samopoškození v místě zánětu (Dean et al. 1997).

V případě poškození proteinů se neodstartuje řetězová reakce jako u peroxidace lipidů, poškození se však znásobí tím, že proteiny ztratí svoji enzymovou, signální či transportní funkci (Koubková 2008).



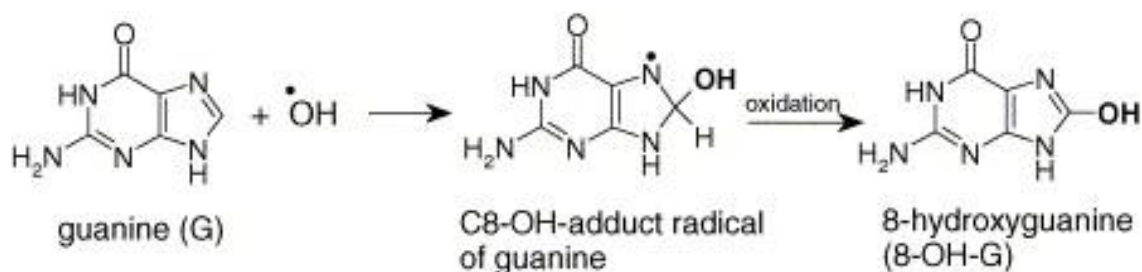
Obr. 8 : Schéma oxidace proteinové kostry polypeptidů volnými radikály. (Převzato z práce Koubková 2008).

- a, b – vznik hydroxylového radikálu
- c – vytržení vodíku z α -uhlíku aminokyseliny a vytvoření radikálu na centrálním uhlíku
- d – v přítomnosti kyslíku vznikne peroxylový radikál
- e, f – reakcí s protonovanou formou superoxidového radikálu nebo vytržením atomu vodíku z další molekuly je přeměněn na alkylperoxid
- h – další reakce s protonovaným superoxidem mohou vést ke vzniku alkoxylového radikálu
- j – konverzí alkoxylového radikálu vznikají hydroxyderiváty
- g, i, k – při nepřítomnosti ionizujícího záření jsou stejné procesy zahájeny Fentonovou reakcí, která je hlavním zdrojem hydroxylových radikálů. Železo je schopno nahradit protonovaný superoxid v reakcích vedoucích ke vzniku alkylperoxidu, alkoxylového radikálu a hydroxyderivátů
- l – v nepřítomnosti kyslíku spolu radikály aminokyselin reagují za vzniku zkřížených vazeb

5.3.3 Poškození DNA

ROS jsou v buňkách tvořeny různými cestami. Je odhadováno, že lidská buňka je vystavena denně až $1,5 \cdot 10^5$ oxidativních zásahů. Hydroxylový radikál reaguje se všemi součástmi molekuly DNA. Dochází k poškození purinových a pyrimidinových bází. Stálá modifikace genetického materiálu, vyplývající z těchto poškození, je prvním krokem k mutagenезi, karcinogenезi a stárnutí. Poškození, které vyvolávají volné radikály, se vyskytují v nejrůznějších rakovinných tkáních. Při oxidaci DNA bylo identifikováno více než 100 různých produktů. Poškození indukovaná ROS zahrnují zlomy DNA v jednom či obou vláknech, purinové, pyrimidinové modifikace a vznik překřížení mezi molekulami DNA. Tyto poškození DNA mohou vést k zastavení transkripce, k indukci signálních cest, celkové nestabilitě genomu a replikačním chybám, což vše může vést k rozvoji rakoviny (Valko et al. 2006).

Primární reakcí hydroxylového radikálu s DNA je vyjmutí vodíkového atomu z deoxyribózy, což vede k destrukci sacharidu a přerušení řetězce. Hydroxylový radikál je schopen addovat k purinovým a pyrimidinovým bázím a tak je změnit na hydroxy- a oxoderiváty. Nejvíce jsou prostudovány následky vzniku 8-hydroxyguaninu (viz. obr. 9) (Štípek et al. 2000). Jeho přítomnost v lidské moči byla poprvé zaznamenána Amesem a jeho spolupracovníky. Sledování hladin 8-hydroxyguaninu je důležité, protože jeho zvýšené množství je markerem poškození DNA (Koubková 2008).



Obr. 9 : Reakce guaninu s hydroxylovým radikálem. (Převzato z práce Valko et al. 2006).

Tato modifikace nastane přibližně v jednom z 10^5 guaninových zbytcích v normální lidské buňce. Tabákový kouř a ostatní karcinogenní zdroje ROS zvyšují oxidativní poškození DNA o 35-50%. Odhaduje se to z hladiny 8-oxoguaninu v leukocytech a z jeho exkrece močí. Kasai a kolektiv demonstroval, jak těžká fyzická práce, denní a noční směny, kouření a nízký příjem masa zvyšují hladinu 8-oxoguaninu. Naopak lehčí fyzická aktivita (např. sport) jeho hladinu redukuje. Tyto výsledky při porovnání s předchozími daty získanými ze studií s krysami ukazují, že životní styl může významně ovlivnit úroveň oxidativního poškození (Valko et al. 2006).

Bylo zjištěno, že i RNS, jako peroxinitrity a oxid dusnatý, poškozují DNA. Reakcí peroxinitritu s guaninem vzniká 8-nitroguanin. Jeho spojení s kancerogenezí nebylo zatím prokázáno.

V procesu kancerogeneze hraje roli i oxidativní poškození mtDNA. Mutace a pozměněná exprese mitochondriálních genů, které kódují komplexy I, III, IV a V byly nalezeny u různých typů rakovin (Valko et al. 2006). V porovnání s nDNA je mtDNA více náchylná k oxidaci, má limitovanou opravnou kapacitu a není chráněna histony. Množství informací ze studií mtDNA podporuje účast mitochondrií na vzniku rakoviny. Dosud to však nebylo uspokojivě dokázáno (Koubková 2008).

Buňky však disponují opravnými mechanismy, které jsou schopny některá poškození DNA opravit. Na zlomy v řetězci DNA se naváže poly(ADP)ribózapolymeráza (PARP). Současně je indukována syntéza transkripčního faktoru p53, který se jako produkt supresorového genu přesune do jádra, aby zastavil buněčný cyklus. V tomto stadiu se signální mechanismy buňky rozhodují, zda lze opravit DNA nebo spíše aktivovat kaskádu cysteinových proteáz, která odstraní PARP a spustí apoptózu. Pokud se buňka rozhodne k opravám, PARP sama sebe modifikuje (poly(ADP)ribozylace), oddělí se od DNA a poly(ADP) se odbourá. Do procesu vstoupí reparační enzymový systém, který zlom opraví. Proces je však energeticky náročný a může skončit nekrotizací buňky (Štípek et al. 2000).

V nDNA je až 90% oxidovaných bází opraveno jednonukleotidovou excizí a zbývajících 10% složitějším mechanismem zvaným *long-patch* (vystřížení bází). Například jednonukleotidová *bázová elize* je primární cestou opravy 8-hydroxyguaninu (Koubková 2008).

Zatímco opravné mechanismy nDNA jsou dostatečně prozkoumány, o opravných mechanismech mtDNA víme jen málo. Ve srovnání s opravnými mechanismy nDNA je reparační kapacita mtDNA velmi nízká. Což častěji vede k mitochondriálním dysfunkcím a vzniku degenerativních nemocí (Valko et al. 2006).

Nyní vědci z University of Michigan zjistili, že RNA-polymeráza II nejen provádí přepis z DNA do mRNA, ale rovněž je schopna aktivovat protein p53, pokud narazí na určitá poškození DNA. RNA-polymeráza II neustále během „své práce“ projíždí DNA. Pokud narazí na nějakou nesrovnalost, zastaví transkripci a vyšle signál, který aktivuje protein p53, který buď zastaví buněčné dělení (pokud se buňka dělí) a zařídí opravu poškozeného místa nebo uvede buňku do kaskády reakcí vedoucích a apoptóze, pokud je oprava nemožná (Šípek 2007).

6 ONEMOCNĚNÍ SPOJENÁ S OXIDATIVNÍM STRESEM

Oxidativní stres je porušení rovnováhy mezi produkcí oxidačních látek a antioxidační kapacitou buňky. Oxidativní stres je spojován se vznikem mnoha onemocnění (DM, rakovina, kardiovaskulární onemocnění, neurodegenerativní poruchy, onemocnění GITu, stárnutí, ...).

Charakteristickým rysem může být prooxidativní posun v thiol/disulfidovém redoxním stavu a snížení clearance glukózy. Tento stav se nazývá „mitochondriální oxidativní stres“, kde hlavním zdrojem ROS jsou mitochondrie kosterních svalů. Do této skupiny patří DM a rakovina. Druhou skupinu tvoří onemocnění vyznačující se zánětlivě-oxidačními podmínkami (*inflammatory oxidative conditions*) a zvýšenou aktivitou NAD(P)H oxidázy nebo XO. Sem patří hlavně kardiovaskulární onemocnění – ateroskleróza, hypertenze (Koubková 2008).

Onemocnění, jejichž příčinou může být nadměrná produkce volných radikálů je mnoho. Zaměřím se jen na několik z nich.

6.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus je onemocnění charakterizované hyperglykemií, která je způsobena nedostatkem inzulínu nebo rezistencí buněk na něj. Rozlišujeme 2 typy. Diabetes I. typu (IDDM) vzniká v důsledku selektivní destrukce B-buněk pankreatu vlastním imunitním systémem, což vede k absolutnímu nedostatku inzulínu. Jelikož je ničení buněk zakódováno v genetické informaci, řadí se DM I. typu mezi autoimunitní choroby. Trpí jím asi 10% pacientů a rozvíjí se v raném věku. Typ II (NIDDM) postihuje zbylých 90% pacientů a nejčastěji se rozvíjí u starších, obézních pacientů. U tohoto typu DM je sice vytvářen inzulín, ale nedostává do buněk – tzv. inzulínová rezistence.

DM je vždy provázen oxidačním stresem. V krvi a tkáních je prokazatelně vyšší tvorba ROS a lipoperoxidů a současně snížené hladiny antioxidačně působících látek a antioxidačních enzymů. Podle současných názorů hraje oxidační stres významnou roli v etiopatogenezi DM obou typů a má klíčový význam pro vznik a rozvoj diabetických komplikací (Štípek et al. 2000).

V krvi nemocných s DM a u diabetických potkanů je prokazatelně vyšší tvorba volných radikálů a lipoperoxidů. Příčiny zvýšeného oxidačního stresu při DM nejsou zcela objasněny. Zdrojem volných radikálů může být COX, 15-lipoxygenáza nebo NOS, která při nedostatku substrátu nebo kofaktorů pro syntézu oxidu dusnatého produkuje volné radikály. Dalším významným zdrojem reaktivních metabolitů při inzulínové rezistenci může být zvýšená aktivita protein kinázy C indukovaná neesterifikovanými mastnými kyselinami nebo hyperglykemií. Stimulace protein kinázy C vede ke zvýšené aktivitě NADPH oxidázy, která je považována za hlavní zdroj volných radikálů (Kazdová et al. 2008).

Významný podíl na zvýšení oxidativního stresu při DM může mít hyperglykémie spojená s oxidací glukózy. Glukóza a její metabolity reagují s peroxidem vodíku za přítomnosti iontů železa nebo mědi a vytváří se hydroxylový radikál. Konečným produktem glukózy jsou reaktivní dikarboxylové sloučeniny, které se mohou podílet na fragmentaci polypeptidových řetězců (Kazdová et al. 2008). Aldehydická skupina glukózy může přímo reagovat s volnými aminoskupinami proteinů a lipidů – tzv. glykace, která při zvýšených koncentracích glukózy dosahuje patologické úrovně. Vzniká Shiffova báze, která se po určité

době přeměny na Amadoriho produkt (vytváří se intramolekulárním přesmykem Shiffovy báze za vzniku ketoaminu, který je vlastně derivátem fruktosaminu). Pokud tato sloučenina přetrvává týdny až měsíce dochází ke tvorbě AGEs (Koubková 2008). AGEs jsou rozpoznány specifickými receptory (RAGE) na povrchu monocytů, makrofágů, lymfocytů, endotelových buněk, buněk hladké cévní svaloviny a fibroblastů (Štípek et al. 2000). Po jejich navázání na RAGE dochází k uvolnění cytokinů (IL-1, IL-6, IL-18 a TNF- α), které mohou působit na trombocyty a negativně ovlivnit fibrinolytický systém (Kazdová et al 2008). AGEs také stimulují syntézu adhezivních molekul v endotelových buňkách a zvyšují tak adhezivitu monocytů a jejich prostup do cévní stěny, čímž se podílejí na aterogenezi (Štípek et al. 2000).

Nejvíce se glykace projevuje u proteinů s dlouhým poločasem života jako je kolagen, jehož porušená funkce významně přispívá k ateroskleróze. Z dalších komplikací to je 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 nefopatie, která se manifestuje hromaděním depozit AGEs, což vede ke glomeruloskleróze (Koubková 2008).

6.2 Neurodegenerativní onemocnění

Přenos informace nebo signálu je zajišťován pomocí neurotransmiterů (ACH, dopamin, aj), které je přenášejí mezi jednotlivými synapsi. Při degeneraci nervových buněk dochází k nedostatku těchto neurotransmiterů a rozvoji příznaků choroby.

V poslední době se pozornost obrací na spoluúčast ROS na etiopatogenezi těchto onemocnění. Neurodegenerativní onemocnění jsou chronická degenerativní onemocnění CNS, při kterých zanikají některé populace neuronů a to má pak za následek vážné neurologické a psychické příznaky. Ty psychické se projevují ztrátou paměti a rozumových schopností, poruchami chování až celkovým úpadkem osobnosti, ty neurologické se týkají hlavně koordinace a řízení pohybu a řeči. Příčiny a patofyziologie těchto onemocnění jsou doposud málo známé. Možnosti léčení jsou nedostatečné, prognózy špatné. Přesto lze mluvit o určitém pokroku. Naději vzbudil výzkum zaměřený na lepší pochopení biologické a genetické podstaty onemocnění. Příčinou bývá genetická abnormalita, která vyvolá omezení produkce některé

potřebné bílkoviny nebo dochází k modifikaci její struktury. Buňka může vyprodukovat i protein vyloženě toxický. Porucha metabolismu buňky vede k morfologickým odchylkám a ke ztrátě funkcí poškozených populací neuronů. Většina neurodegenerativních onemocnění je dědičná, ale dědičnost není u všech chorob stejně významná. U Huntingtonovy choroby je výrazná, u Parkinsonovy se uplatňuje málo. Mutace zasáhne buď jeden gen nebo změní delší úsek DNA a zasáhne tak i geny sousední. Pro Alzheimerovu chorobu jsou typické mutace několika genů na různých chromozómech.

Podle biochemických důsledků genetické mutace je lze rozdělit do dvou kategorií:

1) polyglutaminová onemocnění a 2) α -synukleinopatie a taupatie. Stranou stojí např.: Wilsonova choroba a amyotrofická laterální skleróza.

Polyglutaminová onemocnění jsou charakteristické výskytem mutací, při nichž se patologicky zvýší počet sekvencí určitých tripletů v jednom genu (expanze trinukleotidových repetitivních sekvencí). Opakující se triplet CAG způsobuje při transkripci patologické zvýšení glutaminu v kódovaném proteinu. V jádrech neuronů se hromadí polyglutaminové inkluze a vedou k porušení jejich funkce. Expanze tripletu CAG se podílí hlavně na rozvoji Huntingtonovy choroby (čím více repetitivních, tím dříve choroba začíná). Kromě Huntingtonovy choroby patří to této skupině spinobulbární svalová atrofie a některé druhy spinocerebrálních ataxií.

Druhá skupina neurodegenerativních onemocnění je spojena s hromaděním dvou patologických proteinů. Proteinu Tau, který vytváří v neuronu jakýsi smotek a neuronu α -synukleinu, který vytváří v těle neuronů Lewyho tělíska. Hromadění proteinu tau je charakteristická pro Parkinsonovu chorobu, Alzheimerovu chorobu, progresivní supranukleární obrnu a některá prionová onemocnění. Lewyho tělíska se objevují u Parkinsonovy choroby, některých forem Alzheimerovy choroby a některých prionových onemocnění (Horáček a Motlová 1999).

Předpokládá se, že významnou roli při vzniku neurodegenerativních poruch hrají mitochondrie a oxidativní stres. Mnoho genů asociovaných těmito chorobami také reguluje mitochondriální funkce, redoxní stav i uvolňování neurotransmiterů do presynaptické štěrbině. Mitochondrie jsou klíčové cytoplazmatické orgány odpovědné za tvorbu ROS i ATP, regulující hladinu intracelulárního Ca^{2+} a apoptózu. Neurony jsou díky své vysoké

metabolické aktivitě a spotřebě velkého množství energie 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. 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 (Koubková 2008). Výsledky nedávných studií poukazují na to, že mitochondriální dysfunkce a oxidativní poškození se podílejí na patogenezi neurodegenerativních chorob a přispívají ke stárnutí. Biochemické studie a studie na zvířecích modelech odhalily, že mutované proteiny těchto nemocí jsou propojeny s mitochondriemi. Tyto proteiny blokují transport nukleárních mitochondriálních proteinů v mitochondriích, přerušují přesun elektronů a podporují vznik volných radikálů, které jsou příčinou mitochondriální dysfunkce a nakonec i poškození neuronů (Reddy 2008).

6.2.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je neurodegenerativní onemocnění mozku, při kterém dochází ke změně osobnosti, poruchám paměti až demenci. Jako první popsal toto onemocnění Alois Alzheimer v roce 1907. Etiologie je komplexní. Zahrnuje tvorbu a ukládání intracelulárních smotků polymerizovaného proteinu tau, depozita extracelulárního β -amyloidu a především degeneraci neuronů. Poškozena je zejména funkce cholinergního systému (*neokortexu a hippocampu*), úbytek ACH v mozkové tkáni, který mozek potřebuje k přenosu nervových vzruchů. Tím dochází ke snížení schopnosti učení, paměti a emocionálních funkcí. Předpokládá se, že β -amyloid působí neurotoxicky (např. podporou tvorby volných radikálů). Uvažuje se i o nadměrné glutamátové aktivitě, která aktivuje NMDA-receptory a může přispívat ke smrti neuronů (Martínková et al. 2007).

Primární příčiny onemocnění nejsou známy, stále však přibývají důkazy o účasti ROS a RNS v mechanismu vývoje choroby. Hlavní složkou amyloidních depozit hromadících se v mozku je amyloidní peptid β ($A\beta$), který vzniká z amyloidového prekurzorového proteinu (APP). Při fyziologických úpravách APP α -sekretázou vzniká solubilní peptid APPs, který je neuroprotektivní, neboť chrání neurony před glutamátovou neurotoxicitou. Patologický $A\beta$

vzniká působením β - a γ -sekretázy a může usmrtit neurony buď přímým neurotoxickým účinkem nebo nepřímo aktivací mikroglie. V prvním případě nejspíš dochází k interakci $A\beta$ s NMDA-receptorem, stimulující excitotoxický účinek glutamátu s intenzivní tvorbou oxidu dusnatého, superoxidu a jiných radikálů. Některé výzkumy dokazují, že $A\beta$ může katalyzovat vznik volných radikálů i sám o sobě. Pro tuto reakci je významná schopnost APP vázat a redukovat Cu^{2+} s následnou Fentonovou reakcí. Druhá hypotéza předpokládá nepřímý účinek agregátů $A\beta$ cestou aktivace klidové mikroglie a následné intenzivní produkce zánětlivých faktorů včetně volných radikálů a cytokinů (Štípek et al. 2000). Agregovaná forma $A\beta$ je neurotoxická především proto, že vytváří kalciové kanály, jimiž dochází k neřízenému vstupu vápníku do buňky. Toto nadbytečné množství vápníku není buňka schopná pufrovat a hyne (Cibičková a Palička 2005).

Mezi makroskopicky patrné změny patří zúžení mozkových závitů, dilatace mozkových komor, kortikální i subkortikální atrofie některých mozkových struktur (*amygdaly, hippocampus, temporální laloky*) (Cibičková a Palička 2005).

V průběhu života se ve tkáních hromadí AGEs a postupně se posunuje rovnováha mezi vznikem a jejich odstraňováním. AGEs se mohou tvořit i v CNS a nakonec se projevit vznikem senilních plaků. AGEs cestou specifického receptoru RAGE nebo amyloidního peptidu $A\beta$ mohou v neuronech, astrocytech a mikroglii aktivovat signální cestu, která stimuluje NADPH oxidázu produkující superoxid a ten jako druhý posel předá signál na transkripční faktor NF- κ B, indukující syntézu iNOS a oxidu dusnatého. AGEs hrají i roli ve stabilizaci amyloidních agregátů při tvorbě senilních plaků. Uplatňují se zřejmě i v riziku, které představuje přítomnost alely, která odpovídá za syntézu apolipoproteinu apoE4, který se účastní transportu lipidů. Izoforma apoE4 má ve své struktuře více glykovatelných míst, což usnadňuje její připojení do amyloidních struktur a urychlení tvorby 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).

V roce 2006 tým okolo neurobiologa F. LaFerlyho z University of California v Irvinu, prokázal pozoruhodný efekt molekuly označované jako AF267B. Na myši nervové tkáni postižené Alzheimerovou chorobou tato molekula redukuje výskyt senilních plaků a neurofibrilárních smotků v mozku. Molekula AF267B prochází stěnami mozkových cév do

nervové tkáně, takže nemusí být podávána přímo do mozku, a to hlavně do *hippocampu* a mozkové kůry, ale nemá dostatečný efekt v *amygdalae*. První předběžné výsledky klinických zkoušek dokazují, že dobrovolníci snášejí tuto molekulu dobře i ve vysokých dávkách, u kterých lze očekávat léčebný efekt (Petr 2006).

6.2.2 Parkinsonova choroba

Je to idiopatické degenerativní onemocnění mozku, ke kterému přispívá jak určitá genetická predispozice, tak pravděpodobně i exogenní podmínky rozhodující o vlivu neurotoxinů a oxidativního stresu. Primární abnormalitou je ztráta mozkových buněk produkující dopamin v bazálních gangliích (*substantia nigra*).

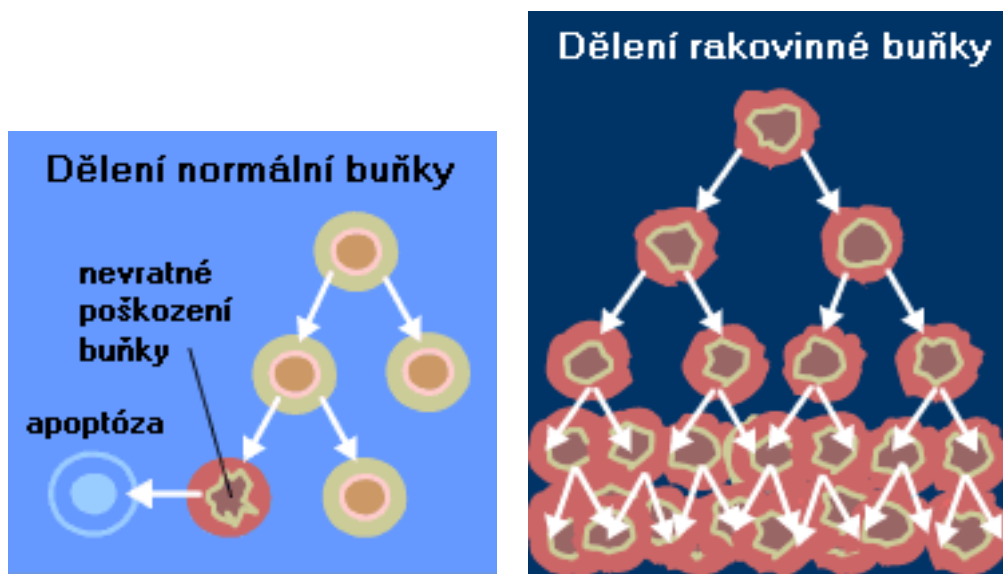
Jde především o úbytek nigrostriálních dopaminových neuronů v *pars compacta*. Následují kompenzační mechanismy (hyperaktivita zbývajících neuronů, pokles denzity autoreceptorů), které mohou zastít začátek onemocnění. Avšak pokračující ztrátou neuronů ubývá inhibičního vlivu dopaminergních neuronů na *corpus striatum*, kde je velké množství excitačních cholinergních interneuronů, podílejících se na řízení funkce kosterního svalstva. Se ztrátou dopaminergních neuronů se aktivita cholinergních interneuronů zvyšuje a následně se rozvíjí extraparamidová symptomatologie jako porucha funkce kosterního svalstva (Martínková et al. 2007).

V posledních letech bylo shromážděno mnoho dokladů o tom, že klíčovým procesem degenerace dopaminergních neuronů je oxidační stres. I u zdravých lidí se *pars compacta* projevuje zvýšenou oxidační aktivitou ve srovnání s jinými oblastmi mozku. To vyplývá z metabolismu dopaminu. Autooxidací dopaminu vznikají semichinony, chinony a neuromelanin, látky metabolicky spjaté s tvorbou ROS. Vedlejším produktem oxidace dopaminu monoaminoxidázou je peroxid vodíku. Za normálních okolností jsou ROS odstraněny antioxidačním systémem. U nemocných Parkinsonovou chorobou byla nalezena zvýšená peroxidace lipidů a známky oxidačního poškození proteinů a DNA. U parkinsoniků bylo nalezeno 30-40% snížení aktivity mitochondriálního komplexu I v *pars compacta*. Insuficience komplexu I, zastavení transportu elektronů a tím i pumpování protonů ve vnitřní

mitochondriální membráně vede k poklesu membránového potenciálu. Následkem toho dochází k otevření membránových pórů, jimiž do cytoplazmy projdou malé proteiny (cytochrom c) spouštějící apoptózu (Štípek et al. 2000).

6.3 Rakovina

Rakovina je skupina nemocí, které se vyznačují nekontrolovaným buněčným dělením a schopností těchto rychle se dělících buněk napadat jiné tkáně a rozšiřovat se do jiných částí těla. Ke vzniku rakoviny dochází tehdy, když je poškozena DNA takovým způsobem, že dojde k deregulaci buněčného dělení. Když jsou normální buňky staré nebo poškozené, tak zanikají buněčnou smrtí – apoptózou. Rakovinné buňky se však dokáží apoptóze vyhnout. Buněčné dělení je fyziologický proces, ke kterému dochází neustále téměř ve všech tkáních. Za normálních okolností je rovnováha mezi buněčným dělením a apoptózou pevně regulována tak, aby byla zajištěna integrita tkání a orgánů. Mutace vedoucí k rakovině tuto rovnováhu porušují. Nekontrolované a často velmi rychlé a nepřesné dělení buněk může vést buď k nádoru benignímu nebo malignímu. Benigní tumory nemají schopnost metastázovat, proto nejsou tolik nebezpečné jako maligní, které tuto schopnost mají (www.rakovina-info.cz).



Obr. 10 : Dělení normální a rakovinné buňky

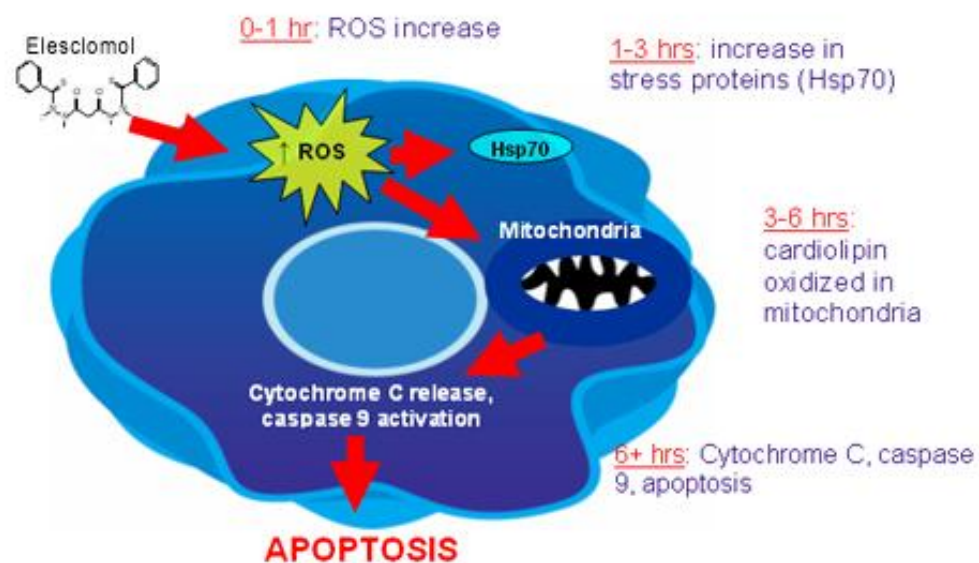
Kancerogeneze je vícestupňový proces hromadění několika mutací (jedna mutace nestačí k přeměně zdravé buňky na maligní). Mutace, které vedou k vývoji nádoru, postiženým buňkám nijak neškodí, ale naopak je zvýhodňují v soutěži o přežití nad zdravými buňkami. Odhaduje se, že k rozvoji plně maligního fenotypu je nezbytná kumulace 4-8 různých genetických změn v buňce. Mutace, které souvisejí s kancerogenezí, nastávají především ve dvou typech genů. V protoonkogenech a nádorových supresech. Protoonkogeny kódují proteiny, které urychlují buněčný cyklus a podporují růst tkání v důsledku aktivního dělení buněk (proliferaci). Aktivita protoonkogenů vede k proliferaci i v nepřítomnosti fyziologické hladiny prorůstového signálu. Přeměna protoonkogenů v onkogen je provázena jeho hyperaktivací. Mutace protoonkogenů mají proto aktivující a dominantní povahu, pro kterou platí, že jediná mutovaná kopie genu je dostatečná pro neregulovanou aktivaci daného procesu. Až na několik vzácných výjimek se onkogeny vyskytují pouze v somatických nádorových buňkách. Nádorové supresory (antionkogeny) kódují proteiny, jejichž úloha spočívá ve zpomalování proliferace. Z hlediska vzniku rakoviny jsou nebezpečné takové mutace nádorových supresorových genů, které vedou k inaktivaci jejich proteinových produktů. Jsou proto recesivní, a aby se mutace nádorového supresoru uplatnila v kancerogenezi, musí proběhnout inaktivace obou jeho alel. Na rozdíl od onkogenů mohou být mutantní formy nádorových supresorových genů dědičné a predisponují postiženého jedince ke vzniku určitého druhu rakoviny. Tento jedinec obvykle zdědí zárodečnou mutaci jedné alely daného nádorového supresoru, a dokud nedojde k somatické mutaci druhé alely, k tvorbě nádoru nedochází. Pokud je však vyřazena funkce zbývající „zdravé“ alely nádorového supresoru, je pravděpodobnost vzniku nádoru velmi vysoká.

Konkrétních genů, které mohou být u nádorů mutovány a přispívat tak k procesu kancerogeneze, bylo nalezeno velké množství (Šmardová a Šmarda 2005).

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 plynoucího 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 indukčních cest, replikačním chybám a nestabilitě genomu.

Mutace a pozměněná exprese genů hrají klíčovou roli při vzniku rakoviny. Prokázalo se, že ROS interferují s expresí několika genů a jsou tedy nápomocné karcinogenezi. Tumor supresorový protein p53 hraje klíčovou roli v ochraně buňky před karcinogenezí. Mutace v tomto proteinu mohou vést k jeho inaktivaci, která byla nalezena u více než poloviny rakovin. Protein je aktivován UV zářením, hypoxií či γ -paprsky a zabraňuje rozštěpení řetězců DNA do doby než jsou provedeny chromozomální opravy nebo než buňka vstoupí do apoptózy (Koubková 2008).

Firma Synta Pharmaceuticals zkouší nový lék proti rakovině. Molekula Elesclomol (dříve STA-4783) je přímý silný aktivátor oxidačního stresu, která dokáže spustit apoptózu rakovinných buněk. Elesclomol je malá molekula, která po vstupu do rakovinné buňky aktivuje signální cestu, díky níž se rychle začnou tvořit ROS a buňka je vystavena oxidativnímu stresu. Při oxidativním stresu se prudce zvýší hladina stresového proteinu Hsp70. To, že elesclomol působí skrz ROS, bylo dokázáno několika pokusy. Po použití molekuly došlo k výraznému zvýšení oxidativního stresu v buňce. Přímá celulární měření zjistila v buňce zvýšené hladiny peroxidu vodíku. Efekt elesclomolu byl zastaven použitím inhibitory vzniku ROS. Když hladina ROS v rakovinné buňce přesáhne určitou hranici dojde k spuštění apoptózy uvolněním cytochromu c z mitochondrií a aktivací signální cesty. A při zvýšení hladiny Hsp70 dochází k aktivaci imunitního systému, který začne rakovinné buňky likvidovat. Molekula má široký potenciál pro použití u mnoha typů rakoviny (www.syntapharma.com 2007; Kirshner et al. 2008). Nyní se zkouší v kombinaci s paclitaxelem, kde se předpokládá silnější účinek proti rakovinným buňkám a zvýšení přežívání jedinců.



Obr. 11 : Působení elesclomolu (Převzato z www.syntapharma.com/prdcancer.aspx)

Během 1 hodiny způsobí elesclomol nárůst ROS. Během dalších 3 hodin dojde k nárůstu stresového proteinu Hsp70. Následně dochází k aktivaci signální apoptózní cesty v mitochondriích a k samotné apoptóze buňky.

7 ANTIOXIDAČNÍ OCHRANA ORGANISMU

7.1 Endogenní antioxidační ochrana

Mechanismy ochrany proti volným radikálům se mohou rozdělovat do mnoha skupin.

1) Mechanismy, zabraňující tvorbě volných radikálů – například eliminace iontů Fe a Cu různými chelatačními činidly (transferrin, deferoxamin, albumin, ferritin, ceruloplasmin, haptoglobin, aj.), odstranění peroxidů katalázou nebo peroxidázou,...

2) Systémy vychytávající již vytvořené volné radikály:

Vychytávače (*Scavengers*) – SOD vychytává superoxid a mění ho na kyslík a vodu.

Lapače (*Trappers*) – vit. E lapá hydroxylový radikál a mění ho na reaktivně stabilní radikál.

Zhášeče (*Quenchers*) – β -karoten zháší singletový kyslík

3) Reparační systémy, které odstraňují poškození způsobené volnými radikály

Lipofilní enzymy (FLA₂), které odštěpí oxidačně poškozené VMK

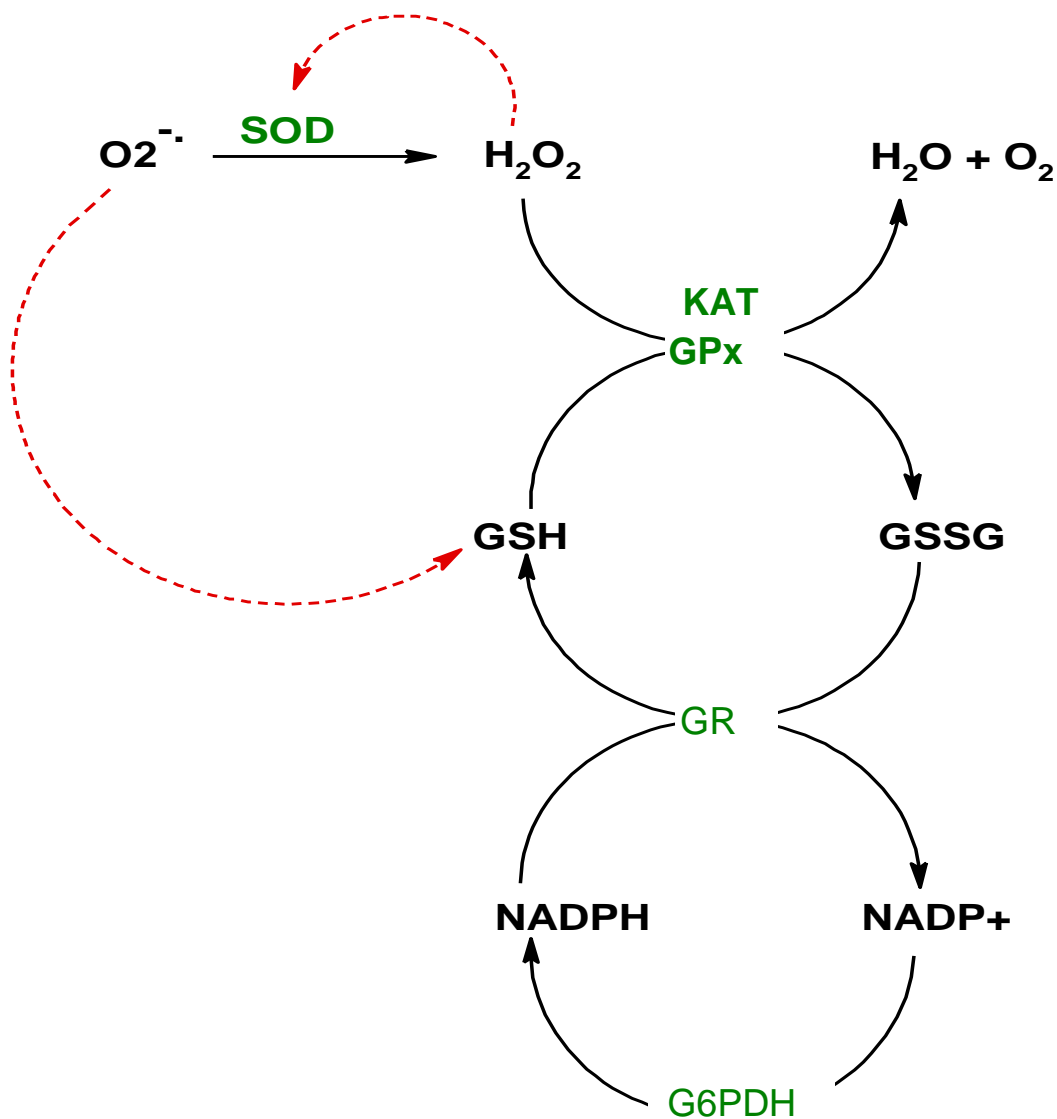
Proteolytické enzymy, rozkládající poškozené proteiny

Reparační endonukleázy opravující poškozenou DNA (Mojžiš 2008)

Dále můžeme dělit antioxidanty na intracelulární (SOD, kataláza, glutathionperoxidáza), membránové (vit.E, karotenoidy, koenzym Q) a extracelulární antioxidanty (transferrin, ceruloplasmin,...).

Použiji dělení na enzymatické a neenzymatické antioxidační systémy.

7.1.1 Enzymové antioxidační systémy

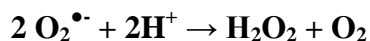


Obr. 12 : Vzájemná souvislost hlavních antioxidačních enzymů.

Superoxiddismutáza (SOD) převádí superoxid na peroxid vodíku. Ten je katalázou (KAT) nebo glutathionperoxidázou (GPx) přeměňován na vodu a kyslík. GPx používá k odstranění peroxidu vodíku jako substrát glutathion (GSH). Vznikne oxidovaná forma GSH (GSSG), která je redukována zpět na GSH glutathionreduktázou (GR). GR využívá k redukci GSSG koenzym NADPH, který se tvoří v pentózovém cyklu účinkem glukóza-6-fosfátdehydrogenázy (G6PDH).

SUPEROXIDDISMUTÁZA (SOD)

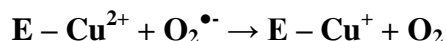
Nachází se v každé buňce. Patří mezi oxidoreduktázy a urychluje dismutaci superoxidu o 4 řády.



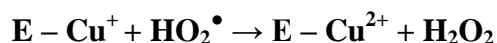
Rozeznáváme 3 druhy SOD lišící se kofaktorem. Tím je vždy atom kovu hrající roli v katalytickém účinku enzymu (Racek a Holeček 1999).

1. MnSOD – je enzym nacházející se v mitochondriích. U vyšších organismů se skládá ze 4 podjednotek, přičemž na každou podjednotku připadá 0,5 až 1 ion Mn
2. FeSOD – je dimer, který má 1–2 ionty Fe. Byla izolována z *E.coli* a dalších bakterií. V živočišné buňce se nevyskytuje (Mojžiš 2008).
3. Cu/ZnSOD – je enzym dimerické struktury. Nachází se mezimembránovém prostoru mitochondrií, hepatocytech, mozku, erytrocytech, a to v cytoplasmě. Každá z podjednotek obsahuje po jednom iontu obou kovů. Cu slouží jako redoxní centrum, Zn má strukturální (Racek a Holeček 1999) a stabilizační úlohu. Díky účinku Zn se aktivita enzymu nemění v rozmezí pH 5–9,5 (Mojžiš 2008). Vlastní reakční mechanismus je následující:

Ion Cu^{2+} v molekule enzymu je redukován první molekulou superoxidu na Cu^+ .



Další molekula superoxidu je pak v protonizované formě (proton získá z argininu v blízkosti aktivního centra) jakožto hydroperoxylový radikál schopna znova oxidovat Cu^+ a tak regenerovat původní formu enzymu. V této druhé reakci se tvoří molekula peroxidu vodíku (Racek a Holeček 1999).



|

Arg

|

Arg

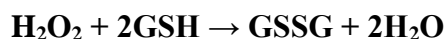
4. Extracelulární Cu/ZnSOD – je tetramer. Každá podjednotka obsahuje Cu^{2+} a Zn^{2+} . Předpokládá se, že jí produkují endotelové buňky. Přesný biologický význam není znám. Předpokládá se, že může regulovat aktivitu NO^\bullet a jeho metabolitů (Mojžiš 2008).

Chybění aktivity SOD má pro postižený organismus závažné následky. U člověka vede deficit Cu/ZnSOD k těžkému poškození motorických neuronů v mozkové kůře a míše. Onemocnění se dědí autosomálně dominantně a je známo pod názvem amyotrofická laterální skleróza (Racek a Holeček 1999). V důsledku snížené aktivity enzymu dochází k hromadění superoxidu v neuronech, kde reaguje s NO^\bullet za vzniku peroxynitritového radikálu, což vede k poškození proteinů a degenerativním změnám (Mojžiš 2008).

Zvýšená aktivita Cu/ZnSOD ve tkáních doprovází četná tzv. onemocnění z volných radikálů. Zvýšená tvorba superoxidu vede totiž ke stimulaci syntézy enzymu (Racek a Holeček 1999) a dochází ke zvýšené tvorbě peroxidu vodíku, který poškozují DNA prostřednictvím hydroxylového radikálu. Zvýšená exprese SOD byla zaznamenána u nemocných s Downovým syndromem (Mojžiš 2008), revmatoidní artritidou, sklerotickým postižením cév, Alzheimerovou chorobou i diabetem (Racek a Holeček 1999). SOD se může podat i jako léčebný prostředek. V některých zemích se používala jako prevence proti radiačnímu poškození, při transplantacích, při léčbě artritidy, cystitidy,...

GLUTATHIONPEROXIDÁZA (GPx)

Peroxid vodíku, vzniklý dismutací superoxidu, je odstraňován peroxidázami nebo katalázami (o těch se zmíním dále). Nejvýznamnějším enzymem ze skupiny peroxidáz v živočišných buňkách je glutathionperoxidáza (GPx). Tento enzym využívá jako substrátu k odstranění peroxidu vodíku redukovaný glutathion (GSH), jenž oxiduje.



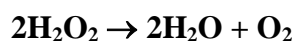
Vzniklá oxidovaná forma (GSSG) je regenerována zpět na GSH glutathionreduktázami, které využívají k redukci GSSG koenzym NADPH.



GPx se vyskytuje ve třech různých formách, které se nacházejí v různých oddílech buňky. První dvě formy se nacházejí v cytoplazmě (cGPx) a krevní plazmě, tedy v ECT (eGPx). Jedná se o bílkovinu obsahující ve svém aktivním centru speciální aminokyselinu, selenocystein. Třetí typ GPx je vázán na membráně a odtud i název fosfolipidová GPx (pGPx). Tento enzym redukuje nejen peroxid vodíku, ale i lipidové hydroperoxydy, které přeměňuje na příslušné hydroxylové deriváty lipidů. Tím chrání fosfolipidy buněčných membrán a přerušuje řetězovou reakci poškození lipidů volnými radikály (lipoperoxidaci) (Racek a Holeček 1999).

KATALÁZA (KAT)

Katalázy rozkládají peroxid vodíku přímo, na rozdíl od peroxidáz, které k odstranění peroxidu oxidují jiný substrát (obsahující skupinu –SH).



Působí přitom na peroxid vodíku ve vysokých koncentracích. Kataláza je tetramerní hemoprotein obsahující 4 molekuly NADPH. V lidském organismu nacházíme nejvyšší aktivitu v mitochondriích a peroxisomech hepatocytů a v cytoplazmě erytrocytů. Kataláza chrání tyto buňky před toxickým vlivem vyšší koncentrace peroxidu vodíku. Navazuje tak, spolu s peroxidázami, na činnost SOD. V případě, že vazebné místo enzymu pro NADPH je obsazeno, přeměňuje kataláza peroxid vodíku i v nízkých koncentracích (Racek a Holeček 1999).

GLUTATHIONTRANSFERÁZY (GST)

Jsou nezávislé na selenu a katalyzují reakci, při níž je sulfhydrylová skupina GSH navázána na elektrofilní organickou látku. Tímto způsobem se v těle detoxikují xenobiotika. Jejich substrátem je, pro organismus velmi toxický 4-HNE (vznikající při peroxidaci lipidů), který je konjugací s GSH inaktivován a vyloučen z těla. GST jsou tedy významnými ochrannými prvky při procesu peroxidace lipidů.

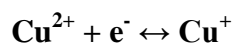
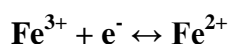
7.1.2 Neenzymatické antioxidační systémy

Do této skupiny můžeme začlenit vysokomolekulární a nízkomolekulární antioxidanty.

7.1.2.1 Vysokomolekulární antioxidanty

- **Proteiny vážící přechodné kovy**

Železo a měď jsou esenciálními složkami našeho organismu, účastní se syntézy širokého spektra enzymů a dalších proteinů, významných pro transport kyslíku, tvorbu oxidu dusnatého, respiraci a ostatní redoxní reakce. Na druhou stranu se tyto kovy stávají nebezpečnými a to díky jejich schopnosti podléhat jednoelektronovému transferu.



Jsou velmi účinnými katalyzátory konverze peroxidu vodíku na hydroxylový radikál a rozkladu lipidových peroxidů na reaktivní alkoxylové a peroxylové radikály.

Transferrin a laktoferrin

Transferrin je součástí krevní plazmy. Laktoferrin se nachází v leukocytech. Oba váží železo ve formě Fe^{3+} a tím ho zbavuje možnosti vstoupit do Fentonovy reakce.

Ferritin

Vyskytuje se ve tkáních a v malém množství i v krvi. Ferritin dokáže železo nejen vázat, ale i skladovat. Ionty železa vstupují do ferritinu ve formě Fe^{2+} a zde jsou oxidovány a Fe^{3+} . Narozdíl od transferrinu váže železo slaběji a v přítomnosti superoxidu se může železo uvolnit a katalyzovat tvorbu volných radikálů (Mojžiš 2008).

Ceruloplazmin

Patří mezi proteiny sloužící jako zásobárna mědi. Nachází se v plazmě. Váže měď, která je podstatná pro jeho ferroxidázovou aktivitu – oxidaci Fe^{2+} na Fe^{3+} . Současně se kyslík oxiduje 4 elektrony na vodu bez toho, aby vznikaly toxické meziprodukty (Attieh et al. 1999).

Haptoglobin a hemopexin

Vází extracelulární hem.

- **Proteiny s thiolovými skupinami**

Albumin

Patří mezi jedny z neúčinnějších thiolových antioxidantů. Váže ionty mědi. Nazývá se také „sebeobětující“ antioxidant. Cu^{2+} se může za přítomnosti peroxidu vodíku oxidovat na vysoce toxický Cu^{3+} , který albumin poškodí. Albuminu je však hodně a velmi rychle se obměňuje, proto biologické důsledky tohoto poškození nejsou tak významné. Albumin významně doplňuje účinek ceruloplasminu. Strukturní stabilita albuminu je zajištěna 17 disulfidickými vazbami. Albumin chrání i před poškozením kyselinou chlornou (Mojžiš 2008).

7.1.2.2 Nízkomolekulární antioxidanty

Koenzym Q (ubichinon/ ubichinol)

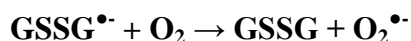
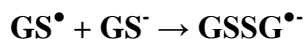
Je ve skutečnosti celá rodina benzochinonů, lišících se délkou lipofilního řetězce. U savců je nejrozšířenější koenzym Q_{10} (Štípek et al. 2000). Koenzym Q je důležitým článkem transportního řetězce elektronů v mitochondriích, kde podléhá simultánní oxidaci a redukci přes svůj radikálový meziprodukt – ubisemichinol. Ve své redukované formě, ubichinolu, je obsažen ve všech membránách a lipoproteinech (Ernster a Dallner 1995), kde tlumí radikálové reakce ve spolupráci s tokoferolem.

Glutathion (GSH, GSSG)

Je to jednoduchý tripeptid, složený ze tří aminokyselin – glutaminu, cysteinu a glycinu, vyskytující se ve všech savcích buňkách v poměrně vysoké koncentraci (0,1-10 mmol/l). Převažuje jeho redukovaná forma. Je jedním z nejvýznamnějších pufrů buňky, protože se snadno oxiduje a s další molekulou glutathionu tvoří GSSG. Působí jako kofaktor oxidoreduktáz, udržuje v redukované formě sulfhydrylové skupiny proteinů, cysteinu, podílí se na transportu některých aminokyselin do buněk a odstraňování ROS a regeneruje askorbát a tokoferol. Reaguje neenzymově s hydroxylovým radikálem, peroxidem vodíku, peroxylovými radikály na glutathionový radikál GS^\bullet , který je méně reaktivní než ROS.



Tento radikál však může reagovat s další molekulou GSH (disociovaným na GS⁻) za vzniku velmi silného reductantu – radikálu oxidovaného glutathionu (GSSG^{•-}), který je schopen redukovat kyslík na superoxid (Štípek et al. 2000).



GSH je nezbytným substrátem GPx. Při zvýšené tvorbě ROS se zvětšuje poměr GSSG/GSH ve tkáni a lze pozorovat únik GSSG z buněk. Převážná většina buněčného GSSG se však redukuje zpět na GSH glutathionreduktázou. Spotřebovává se též v glutathiontransferázové reakci při konjugacích s produkty peroxidace lipidů. Jedním z příznaků oxidačního stresu tkáně je pokles hladiny GSH v buňkách (Štípek et al. 2000).

Kyselina lipoová

Ve většině buněk je kofaktorem pyruvátdehydrogenázového a α -glutarátdehydrogenázového komplexu. Reaguje také s alkylperoxylovými, askorbylovými a tokoferyllovými radikály, superoxidem, kyselinou chlornou, oxidem dusnatým a hydroxylovým radikálem. Navíc regeneruje ostatní antioxidanty.

Bilirubin

Je konečný produkt degradace sloučenin obsahujících hem (kataláza, hemoglobin, myoglobin,...). Je to lineární tetrapyrrol, který má kromě metabolického významu i význam antioxidační. Vyskytuje se typicky vázaný na albumin v poměru 1:1. Jeho antioxidační působení *in vivo* spočívá zřejmě ve vychytávání peroxylových radikálů a zhasení singletového kyslíku (Halliwell a Gutteridge 2001).

Kyselina močová

Je produktem oxidace hypoxanthinu a xanthinu, katalyzované XO a konečným produktem odbourávání purinů. Dlouho byla považována za odpadní látku. Antioxidační schopnosti spočívají ve vychytávání alkoxy radikálů a kyseliny chlorné a ve vazbě železa a mědi do formy, která nepodporuje radikálové reakce. Po reakci s hydroxylovým radikálem a perferyllovými radikály (komplexy železa s aktivním kyslíkem) se urát mění v radikály, které mohou biologicky škodit (Štípek et al. 2000).

Melatonin

Je hormon epifyzy a ovlivňuje cikardiální rytmy. Řídí biorytmy, ovlivňuje imunitní systém, stimuluje regenerační procesy, nescificky má vliv na téměř všechny buňky těla. Nescifické působení melatoninu je dáno jeho lipofilním charakterem a spočívá v jeho antioxičních účincích. Při farmakologických hladinách vychytává hydroxylové radikály (Štípek et al. 2000). Současný stav znalostí potvrzuje, že melatonin pozitivně ovlivňuje proces stárnutí. Faktem je, že prodlužuje střední délku života experimentálních živočichů. Zlepšuje celkový fyzický stav organismu a zlepšuje stav imunitního systému. Předpokládá se, že i v tomto případě jde o jeho současné působení antioxiční a endokrinní (Ďoubal et al. 1997).

7.2 Exogenní antioxičt

Antioxičt jsou látky omezující aktivitu volných radikálů. Snižují pravděpodobnost jejich vzniku nebo je převádějí do méně reaktivních nebo nereaktivních stavů. Antioxičt můžeme dělit na přirozené a syntetické. Antioxičt obsažené v potravě prodlužují jednak její trvanlivost a jednak má jejich užívání příznivé účinky na zdraví, neboť snižují riziko vzniku kardiovaskulárních chorob a některých typů rakoviny. Odborníci se shodují na tom, že účinnost přirozených antioxičtů přijímaných přirozeně je výrazně vyšší než u stejné dávky podané v čisté podobě jakožto potravinový doplněk. Navíc nedávné výzkumy ukazují, že při dlouhodobém užívání antioxičtů v čisté podobě dochází k tzv. zvratu antioxičtů, kdy se jeho antioxiční účinek změní v prooxidační. Tato vlastnost, jejíž mechanismus nebyl dosud pochopen, byla pozorována u β -karotenů (provitamin A), vitamínu E, vitamínu C a flavonoidů. U antioxičtů přijímaných přirozenou cestou nebyl žádný zvrát zaznamenán (<http://cs.wikipedia.org/wiki/Antioxičt>).

Antioxičt najdeme mezi prvky, vitamíny, enzymy a mnoha dalšími typy látek. Největší skupinu antioxičtů zahrnují tzv. flavonoidy, kterým se díky přirozenému původu říká bioflavonoidy. Jde převážně o rostlinná barviva obsažená v kůře, slupkách, plodech, listech, květech, semenech, stoncích, kořenech, ... Omezují působení volných radikálů na buňky, tkáň a orgány a snižují riziko vzniku kardiovaskulárních chorob, rakoviny, krevních sraženin, snižují krevní tlak, posilují imunitu, koncentraci a paměť a oddalují stárnutí. Flavonoidů je mnoho druhů. Některé bioflavonoidy působí synergicky s vitamínem C. Chrání

jej a prodlužují jeho účinek. V některých rostlinách je až 40 druhů antioxidantů. Antioxidanty nechrání jen tělo před působením volných radikálů, ale i jiné antioxidanty před degradací.

Mezi antioxidanty můžeme zařadit vitamíny A, E, C, B2, prvky Se, Ge, Cu, Zn, Mn, karotenoidy, lykopen, lutein, kvercetin a další bioflavonoidy, některé třísloviny (např. z čínského čajovníku), koenzym Q10, skvalen, taurin, melatonin a mnoho dalších. Z potravin, které obsahují nejvíce antioxidantů můžeme jmenovat borůvky, lososa, černý a zelený čaj, zeleninu, ovoce, drůbež, byliny, bílé i červené víno a spousty dalších zdrojů.

Kdybych se měla podrobněji zabývat antioxidanty, vydalo by to na další samostatnou obsáhlou práci. Prospěšnost antioxidantů je mediálně vyzdvihována, proto bych se chtěla také zaměřit na již zmiňovaný „zvrat antioxidantů“ .

7.2.1 Vitamin E

Vitamin E v lidském organismu působí jako účinný antioxidant membrán, který aktivně vstupuje do řetězové reakce, přerušuje kaskádu reakcí volných radikálů a chrání biomembrány před oxidativním atakem těchto radikálů. Obsah vitamínu E v membránách nízkodensitních lipoproteinů, hepatocytů i celých orgánů určuje jejich citlivost na poškození hydroxylovými, alkoxylovými a peroxylovými radikály i singletovým kyslíkem. Tyto radikály nejen poškozují lipidy, ale sekundárně produkují hydroperoxydy lipidů, které se rozkládají na alkoxylové a organické peroxylové radikály a tak způsobují řetězovou reakci peroxidace lipidů. Nejsilnějším antioxidantem ze skupiny tokoferolů je α -tokoferol, který je zároveň nejhojněji zastoupen v lidském organismu. α -tokoferol nemůže zabránit počáteční tvorbě radikálů, ale chrání lipidy tak, že minimalizuje formování sekundárních radikálů vychytáváním peroxylových radikálů (přeměňuje je na hydroperoxydy, které odstraňuje glutathionperoxidáza), takže se nemohou dále účastnit řetězových reakcí. Rychlou reakcí α -tokoferolu s peroxylovými radikály vznikají relativně stabilní tokoferoxylové radikály, které mohou být buď regenerovány reakcí s askorbátem či jiným antioxidantem vodního prostředí (glutathion, urát), nebo se dva tokoferoxylové radikály spojí a vytvoří stabilní sloučeninu, popřípadě je tento radikál kompletně oxidován na tokoferolchinon (Young a Woodside 2001).

Vitamin E jako každá redukující sloučenina může působit jak anti-, tak i prooxidačně v závislosti na složkách přítomných v reakční směsi. Zatím byla prooxidační funkce vitaminu E prokázána pouze *in vitro* ve frakci LDL u pacientů s defektem v genu α -TTP. Prooxidační aktivita vznikajících α -tokoferoxylových radikálů v LDL způsobuje vznik lipidových radikálů, takže obohacení LDL frakce α -tokoferolem může spíše urychlovat oxidaci LDL. Tento náleznemůže vyvrátit roli α -tokoferolu jako antioxidantu *in vivo*, protože v daném prostředí jsou přítomny další antioxidanty, jako kyselina askorbová a ubichinol, vedle kterých nemůže α -tokoferol fungovat jako prooxidant (Carr et al. 2000).

7.2.2 Vitamín C

Kyselina askorbová jakožto donor elektronů je účinným redukujícím činidlem v mnoha intra- i extracelulárních reakcích. Je kofaktorem nebo kosubstrátem osmi enzymů. Kromě biosyntézy kolagenu, karnitinu a katecholaminů ve spojení s kurdějemi existují i další funkce vitaminu C. Na jeho příjmu a koncentraci v séru jsou dále závislé aktivity enzymů mono- a dioxygenázy při amidaci peptidů a metabolismu tyrozinu, cholesterol 7 α -monooxygenáza v metabolismu cholesterolu a steroidů. Role vitaminu C v těchto případech spočívá v redukci centrálních kovových iontů uvedených mono- i dioxygenáz, když díky svému redoxnímu potenciálu udržuje tyto ionty v redukováném stavu. Další aktivity vitaminu C zahrnují udržování tiolů v redukováném stavu a ochranný a šetřící efekt pro glutation (důležitý intracelulární antioxidant a kofaktor enzymů) a tetrahydrofolát (biosyntéza katecholaminů). Extracelulární funkce vitaminu C by mohly spočívat především v ochraně LDL proti oxidaci, v regeneraci tokoferolu z tokoferoxylového radikálu a v regeneraci glutationu z jeho oxidované formy. Dále redukuje železo z potravy a zvyšuje tak jeho intestinální absorpci nebo blokuje reakci, při které vznikají karcinogenní nitrosaminy. Vitamin C je důležitý ve vodě rozpustný antioxidant působící v biologických tkáních, kde snadno vycytává reaktivní kyslíkové a dusíkaté radikály a tím efektivně chrání ostatní substráty před oxidativním poškozením. Antioxidační účinek askorbátu spočívá v tom, že redukuje anorganické i organické radikály, jako superoxid, peroxylový a hydroxylový radikál, oxid dusičitý a reaguje se sigletovým kyslíkem a kyselinou chlornou. Působí rovněž jako kooxidant při regeneraci

α -tokoferolu, když při eliminaci radikálů rozpustných v tuku vznikají tokoferoxylové radikály, přičemž se mění na askorbylový radikál. Tato jeho funkce je potenciálně velmi důležitá, neboť tak zabraňuje prooxidačnímu působení α -tokoferolu. Vitamin C je považován za ideální antioxidant, protože obě jeho formy, askorbát i askorbylový radikál mají nízký jednoelektronový redukční potenciál. Další jeho výhoda spočívá ve stabilitě a nízké reaktivitě askorbylového radikálu, který vzniká při vychytávání kyslíkových a dusíkatých radikálů. Dvouelektronový oxidační produkt askorbátu, kyselina dehydroaskorbová, může být glutationem redukována zpět na askorbát a jeho enzymy nebo je ihned hydrolyzována na kyselinu 2,3-diketogulonovou (Carr a Frei 1999).

Interakce vitaminu C s volnými katalyticky aktivními ionty kovů by mohla přispět k oxidativnímu poškození produkcí hydroxylových a alkoxylových radikálů. Zda se tyto mechanismy vyskují i *in vivo* není jisté (Carr a Frei 1999). Skupina kolem Carra a Freie (1999) studovala prooxidační aktivitu vysokých množství vitaminu C na oxidaci DNA, peroxidaci lipidů a proteinů pomocí chromatografie. Po dlouhém bádání jak *in vitro* tak *in vivo* došli k závěru, že vitamin C nemá vliv na zvýšení oxidačního poškození DNA. Ale i k tomu, že nemá žádný vliv na snížení oxidace DNA volnými radikály. Bylo zjištěno, že v přítomnosti kovových iontů vystupuje vitamin C jako prooxidační činidlo *in vitro*. Při testech s LDL došli vědci k závěru, že nadbytek vitamin C nijak negativně neovlivňuje peroxidaci lipidů, spíše naopak chrání LDL před peroxidací. Pokud je ale vitamin C přidán k již mírně oxidovanému LDL, působí jako prooxidant. V dalších studiích se přišlo na to, že endogenní vitamin C není schopen bránit oxidaci proteinu *in vitro* způsobenou peroxylovými radikály, cigaretovým kouřem nebo kyselinou chlornou. Ale bylo dokázáno, že vitamin C chrání před oxidací způsobenou UV zářením. Při testování *in vivo* nebyl žádný větší efekt prokázán (Carr a Frei 1999).

7.2.3 Flavonoidy

Flavonoidní látky neboli flavonoidy jsou velice rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů. Jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu, tvořeného dvěma benzenovými kruhy spojenými heterocyklickým pyranem. Běžně bývají všechny tři kruhy

substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami a jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm substituce a oxidace. Rozeznáváme následující základní struktury flavonoidů: katechiny, leukoanthokyanidiny, flavanony, flavanonoly, flavony, flavonoly a anthokyanidiny. Přírodní flavonoidy se nejčastěji vyskytují ve formě O-glykosidů, obsahují tedy ve své molekule necukernou součást (aglykon) a cukernou složku. Flavonoidy působí i proti bakteriím, virům a mají protizánětlivé účinky. Působení flavonoidů proti ateroskleróze se vysvětluje jejich antioxidačními účinky proti lipoperoxidaci a zhasením ROS, především hydroxylových radikálů. Flavonoidy brání iniciaci lipoperoxidace a následných řetězovým radikálovým reakcím tím, že přímo zhasí radikály peroxidů lipidů a tím, že chelatují ionty přechodných kovů, které se na iniciaci lipoperoxidace podílejí. Flavonoidy také regenerují antioxidační vitamíny C a E a inhibují aktivitu COX a lipooxygenázy, jež tvoří radikály lipidů enzymaticky (Kondrová et al. 2006).

Kolektiv LF UK a Centra pracovního lékařství v Praze prováděli pokusy s mikrosomy s NADPH, Fe^{3+} , doxorubicinem a askorbátem. A došli k závěru, že morin, resveratrol a kaempferol zvyšují tvorbu hydroxylových radikálů v NADPH systému, což by mohlo naznačovat jejich prooxidační účinek. Ostatní látky tvorbu radikálů snižovaly nebo neovlivňovaly. Přítomnost doxorubicinu v NADPH systému zesílila antioxidační účinky většiny flavonoidů, kdežto v kombinaci s Fe^{3+} působil doxorubicin prooxidačně (Kondrová et al. 2006). Prooxidační vlastnosti quercetinu, morinu, naringeninů a hesperetinu se zdají být příčinou zvýšené produkce superoxidu a peroxidu vodíku při autooxidaci, způsobující poškození DNA v lymfocytech (Yen et al. 2003).

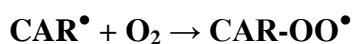
7.2.4 Karotenoidy

Karotenoidy jsou pigmenty, které se nacházejí v rostlinách a mikroorganismech. V přírodě se vyskytuje přes 600 druhů karotenoidů. Různé studie prokázaly, že karotenoidy mohou předejít nebo inhibovat určité typy rakoviny, aterosklerózu, a věkem spojené degradace svalů a další nemoci. Antioxidační aktivita karotenoidů vyplývá ze schopnosti kojugovaného systému dvojných vazeb delokalizovat nespárované elektrony. Díky tomu mají β -karoteny vynikající schopnost fyzicky zhaset singletový kyslík bez degradace a dobrou

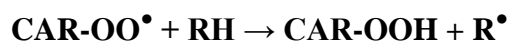
chemickou reaktivitu s volnými radikály (peroxylový, hydroxylový a superoxidový radikál). V dostatečně vysokých koncentracích mohou karotenoidy chránit lipidy proti jejich peroxidaci.

Burton a Ingold jako jedni z prvních prezentovali názor, že karotenoidy by mohly působit i prooxidačně. β -karoteny mají schopnost zvýšit celkový radikálový výnos organismu. U.S. National Cancer Institute provedl na podporu této hypotézy pokus s α -tokoferolem a β -karotenem. V této studii bylo podáváno 20mg β -karotenu denně mužům kuřákům ve věku 50-69 let ve Finsku po dobu 5-8 let. Výsledky studie byly velice překvapující. Bylo zde významné až 18% navýšení výskytu rakoviny plic s navýšením úmrtnosti o 8%. Výsledky této studie ukazují, že β -karoten, konkrétně jeho trans-izomer, nesnižuje riziko vzniku rakoviny. Nicméně výsledky nevyklučují ochrannou roli β -karotenu.

Klíčové faktory, které determinují přeměnu karotenoidů z antioxidační na prooxidační formu jsou parciální tlak kyslíku (pO_2) a koncentrace karotenoidu. Při vyšším pO_2 radikál karotenoidu (CAR^\bullet), vzniklý odnětím vodíku, může reagovat s kyslíkem a vytváří karoten-peroxylový radikál ($CAR-OO^\bullet$).



Vzniklý karoten-peroxylový radikál působí jako prooxidant podporující oxidaci nenasycených lipidů (RH).



Při nízkých pO_2 (cca 20 kPa) se karotenoidy (hlavně β -karoten) chovají jako antioxidanty. Naopak při vysokých pO_2 se antioxidační aktivita mění na prooxidační. Anti-/prooxidační aktivitu též ovlivňuje koncentrace karotenoidu. Vysoké koncentrace podmiňují prooxidační aktivitu karotenoidů.

Karotenoidy a kyselina retinová mohou regulovat transkripční faktory. Kyselina retinová může inhibovat buněčnou proliferaci a zvyšuje buněčnou diferenciaci. Přítomnost β -karotenu v buňkách vystavených oxidačnímu stresu potlačuje aktivaci NF- κ B a produkci IL-6 a TNF- α . Karotenoidy mohou ovlivňovat apoptózu a mají antiproliferativní účinek na některé rakovinné buňky (Valko et al. 2006).

8 DISKUZE A ZÁVĚR

Tvorba volných radikálů je následkem aerobního způsobu života a je nevyhnutelná. Jejich nadprodukce je příčinou různého poškození organismu. Volné radikály pozměňují základní stavební kameny organismu jako jsou lipidy, proteiny a DNA a jsou potenciálními biomakery vzniku rakoviny, aterosklerózy, diabetu, neurodegenerativních onemocnění a mnoha dalších a celkově se podílejí na stárnutí organismu.

Volné radikály jsou pro organismus i nezbytně důležité. Ať už se jedná o imunitní ochranu, signální děje v buňkách či o oplodnění vajíčka spermií.

Tělo má svůj antioxidační systém, který za normálních podmínek udržuje takovou hladinu volných radikálů, která je potřebná pro fyziologické děje organismu. Avšak za přispění dnešního konzumního života, stresu a znečištění planety, jsou volné radikály tvořeny i jinými mechanismy než buňkami vlastního těla a dochází k porušení fyziologické rovnováhy ve směru ke škodlivému působení volných radikálů a vzniku výše zmíněných nemocí ve větší míře.

Díky obrovským reklamním kampaním, máme všichni pocit, že nabízené přípravky s obsahem antioxidantů, nás před škodlivým působením volných radikálů ochrání. Ale je tomu opravdu tak? Většina preparátů s obsahem antioxidantů jsou jen doplňky stravy a jejich účinek a přínos pro organismus je diskutabilní.

Někteří autoři dokonce předpokládají, že exogenní čisté formy antioxidantů mohou za určitých okolností svůj účinek oxidační změnit na prooxidační a vlastně tím tělu ublížit než pomoci.

Ale je škodlivý vliv volných radikálů na organismus opravdu tak markantní? Nehledě na řadu studií posledních let, vědci pořád ještě překvapivě málo vědí o všech detailech procesu stárnutí. Teorie o tom, že stárnutí je důsledek molekulárního poškození, které vyvolaly volné radikály, existuje už přes 50 let. Předpokládá se, že antioxidanty pomáhají organismu zbavit se volných radikálů a tím zpomalují proces stárnutí.

Nové pokusy, provedené skupinou Davida Gemse (2008) ukazují, že význam poškození, vyvolaných volnými radikály, není veliké a že tajemství stárnutí je třeba hledat na úplně jiném místě.

Vědci geneticky modifikovali hlístice (*Caenorhabditis elegans* - Hád'átko obecné) tak, že jejich těla byla schopna vylučovat protilátky, které likvidovaly volné radikály. To by teoreticky mělo dát těmto hlísticím výhodu, v porovnání s „obyčejnými červy“ , v prodloužení střední délky života. Nicméně tito červi žili stejně dlouho jako ostatní červi, kteří byli vystaveni oxidativnímu stresu (<http://news.bbc.co.uk/2/hi/health/7754644.stm>).

Z této studie vyplývá, že stále dostatečně nerozumíme mechanismům stárnutí a oxidativní stres nemusí být podstatným faktorem stárnutí buněk a tkání .

9 POUŽITÉ ZKRATKY:

4-HNE – 4-hydroxy-2-nonanal

5-HT – serotonin – 5-hydroxytryptamin

ACH – acetylcholin

ADP – adenosin difosfát

AGEs – advanced glycation end products

ANG II – angiotensin II

ATP – adenosin trifosfát

BMPs – bone morphogenetic proteins

CAG – triplet nukleotidových bází cytosin-adenosin-guanin

cAMP – cyklický adenosin monofosfát

cGMP – cyklický guanosin monofosfát

CNS – centrální nervový systém

COX – cyklooxygenáza

COX – cyklooxygenáza

DM – diabetes mellitus

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ERK – extracellular signal- regulated kinase

FAD – flavinadeninukleotid oxidovaná forma

FLA₂ – fosfolipáza A₂

FMN – flavinmononukleotid

GABA – γ -aminomáselná kyselina

GIT – gastrointestinální trakt

GSH – redukovaný glutathion (thiol)

GSSG – oxidovaný glutathion (disulfid)

HSMCs – human aortic smooth muscle cells

Hsp70 - heat-shock protein 70

IDDM – insulin-dependent DM

IFN- γ – interferon γ

IL-1 – interleukin 1

LDL – low density lipoprotein

MAPK – mitogen – activated protein kinase

MCP-1 – monocyte chemoattractant protein 1

MDA – malondialdehyd

MHC - major histocompatibility komplex

mtDNA – mitochondriální DNA

NAD⁺ - nikotinamidadenindinukleotid oxidovaná forma

NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát redukovaná forma

nDNA – jaderná DNA

NF- κ B – jaderný faktor κ B

NIDDM – non insulin-dependent DM

NMDA – specifický receptor pro navázání glutamátu (N-methyl-D-aspartát)

NOS – syntáza oxidu dusnatého

PDGF – platelet - derived growth factor (růstový faktor odvozený od krevních destiček)

PRR – Pattern Recognition Receptor

PUFA – polyunsaturated fatty acids

Q• - radikál koenzymu Q

RNA – ribonukleová kyselina

RNS – reaktivní formy dusíku

ROS – reaktivní formy kyslíku

RTKs – receptor tyrosine kinases

SOD – superoxiddismutáza

TGF- β 1 – transforming growth factor

TNF- α – tumor nekrotizující faktor α

VMK – vyšší mastné kyseliny

VR – volné radikály

XO – xanthin oxidáza

α -TTP - α -tocopherol transfer protein

10 POUŽITÁ LITERATURA:

- Ambrožová G. Vliv vysoce nenasycených mastných kyselin a jejich metabolitů na fyziologické funkce profesionálních fagocytů. (Diplomová práce). Brno 2008. Masarykova univerzita. Ústav experimentální biologie. Oddělení fyziologie a imunologie živočichů.
- Anti Aging Guide. Glykation theory of aging [online]. [cit. 2009-04-26]. Dostupné z WWW: <<http://www.anti-aging-guide.org/glycation-theory-of-aging.html>>
- Attieh ZK, Mukhopadhyay CK, Seshadri V, Tripoulas NA, Fox PL. Ceruloplasmin ferroxidase activity stimulates cellular iron uptake by a trivalent cation-specific transport mechanism. *J. Biol. Chem.* 1999;274:1116-1123
- Barja G, Herrero A. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *The FASEB Journal* 2000;14:312-318
- Best B. Mechanisms of Aging [online]. [cit. 2008-07-16]. Dostupné z WWW: <www.benbest.com/lifeext/aging/html>
- Boroň J. Interakce proteinov s koncami chromozomov a ich vplyv na starnutie buněk. (Bakalářská práce). Brno 2008. Masarykova univerzita. Ústav experimentální biologie. Oddělení genetiky a molekulární biologie.
- Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL, Parker N. Mitochondrial superoxide: production, biological effect and activation of uncoupling proteins. *Free radic. Biol. Med.* 2004;37:755-767
- Carr A, Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions?. *The FASEB Journal* 1999;13:1007-1024
- Carr A, Frei B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *Amer. Jour. of Clin. Nutric.* 1999;69:1086-1107
- Carr AC, Zhu BZ, Frei B. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circulation Research.* 2000;87:349-354

- Cibičková L, Palička V. Alzheimerova choroba, cholesterol a apolipoprotein E – nové souvislosti. *Klin. Biochem. Metab.* 2005;13(34):127-130
- Cong YS, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002;66:407-425
- Dean RT, Fu SL, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* 1997;324:1-18
- Ďoubal S, Klemra P, Filipová M, Dolejš J. Teoretická gerontologie. Karolinum Praha, 1997, 93 s. ISBN 80-7184-481-0.
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 2002;82:47-95
- Ernster L, Dallner G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochem. Biophys. Acta.* 1995; 1271:195-204
- Forstermann U, Boissel JP, Kleinert H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J.* 1998;12:773-790.
- Griedling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH/NADPH oxidáze activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Cirk. Res.* 1994;74:1141-1148
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press. 2001
- Hampl V, Výuka LF2 UK Praha, Přednášky 2000 [online]. [cit. 2008-12-12]. Dostupné z WWW: <<http://physiology.lf2.cuni.cz/teaching/nitricox/index.htm>>
- Heinecke JW. Mass spectrometric quantification of amino acid oxidation products in proteins: insights into pathways that promote LDL oxidation in the human artery wall. *FASEB J* 1999;13: 1113–1120
- Horáček J, Motlová L. Neurodegenerativní onemocnění: Od molekulární genetiky k léčbě. *Vesmír* 1999/6;78:307-309
- Hořejší V, Bartůňková J. Základy imunologie. 3. vydání. Triton Praha 2005, 279 s. ISBN 80-7254-686-4

- Christi MT, Jennifer AC, John RH, Karleen SC. TNF- α and IL-1 α induce heme oxygenase via protein kinase C, Ca²⁺, and phospholipase A₂ in endothelial cells. *Am J Physiol. Heart Circ Physiol.* 1999;276:H1493-H1501
- Kazdová L, Malínská H, Marková I, Oliyarnyk O. Antioxidanty, diabetes a kardiovaskulární onemocnění [online]. Institut klinické a experimentální medicíny. Praha. [cit. 2009-03-03]. Dostupné z WWW : <http://www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/1/L_20.doc>
- Kirshner JR, He SQ, Balasabramanyam V, Kepros J, Yang CY, Zhang M, Du ZJ, Barsoum J, Bertin J. Elesclomol induces cancer cell apoptosis through oxidative stress. *Molecular cancer therapeutics* 2008;7:2319-2327
- Kodíček M. *kyslík singletový*. From *Biochemické pojmy : výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2008-12-07].
- Kondrová E, Ozgová Š, Gut I. Přirozené fenolické látky jako antioxidanty a prooxidanty a mechanismy jejich působení. *České pracovní lékařství* 2006;4:195-200
- Koubková L. Oxidativní stres a jeho vliv na biologický systém. Stručný přehled. (Bakalářská práce). Hradec Králové 2008. Universita Karlova. Farmaceutická fakulta.
- Kubešová H, Weber P, Meluzínová H, Polcarová V, Mazalová K, Malásková L. Změny stárnoucího organismu z hlediska patofyziologie. *Čes. Ger. Rev.* 2005;3:18-23
- Kvasničková E. UK Hradec Králové, Přednášky 2008
- Loison A, Festa-Bianchet M, Gaillard JM, Jorgenson JT, Jullien TA. Age-specific survival in five population of ungulates: evidence of senescence. *Ecology* 1999;80:2539-2554 (Abstrakt)
- Martínková J. Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů. Grada 2007, 380s., ISBN 978-80-247-1356-4
- Marumo T, Shini-Kerth VB, Fisslthaler B, Busse R. Platelet-derived growth factor-stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF-kappaB and expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle cells. *Circulation* 1997;96:2361-2367

- Michlová J, Štercl I. Imunoendokrinní vztahy a stárnutí. Endokronologie 2007;3:150-154
- News BBC: Antioxidants „cannot slow aging“ [online]. [cit. 2009-01-20]. Dostupné z WWW: <<http://news.bbc.co.uk/2/hi/health/7754644.stm>>
- Nouza K. Stárne imunita s námi nebo my s imunitou. Medicina 1999;5:19-24)
- Obšil T, Pavlíček Z. Glykace proteinů a fosfolipidů. Maillardova reakce in vivo. Chem. Listy 1997;91:558-569
- Onkologické centrum J.G.Mendela, Nový Jičín: Fagocytóza [online]. [cit. 2008-12-06]. Dostupné z WWW: <http://www.onkologickecentrum.cz/downloads/laboratore/imunologie/clanky/Fagocyt_oza.pdf>.
- Petr J. Objev látky blokující postup Alzheimerovy choroby [online]. [cit. 2009-03-06]. Dostupné z WWW: <www.osel.cz/index.php?clanek=1747>
- Piek E, Heldin CH, Dijke PT. Specificity, diversity, and regulation in TGF- β superfamily signaling. The FASEB Journal. 1999;13:2105-2124
- Prof. MVDr. Mojžiš J., CSc. Výuka LF UPJŠ Košice, Přednášky 2008
- Racek J, Holeček V. Enzymy a volné radikály. Chemické listy 1999; 93:774-780
- Rakovina info. Informační portál zabývající se rakovinou 2007, 5/10/2007 [cit. 2009-3-16]. Dostupné z WWW: <<http://www.rakovina-info.cz/definice-rakoviny/>>
- Reddy PH. Mitochondrial medicine for aging and neurodegenerative diseases. Neuromolecular medicine 2008;10:291-315
- Richterová L. Reaktivní sloučeniny kyslíku. (Bakalářská práce). Brno 2008. Masarykova univerzita. Přírodovědecká fakulta.
- Rychlíková J, Štercl I. Imunosenescence-vymezení pojmu a možné souvislosti. Alergie 2004;4:204-247
- Řemínek R. Cytochromy P450 (Bakalářská práce). Brno 2006. Masarykova univerzita. Přírodovědecká fakulta.
- STA-4783 Mechanism of Action. 2007 [online]. [cit. 2009-03-18]. Dostupné z WWW: <www.syntapharma.com>

- Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modification in atherosclerosis. *Physiol. Rev.* 2004; 84: 1381-1478 - i telove antioxydanty.najit
- Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 1995;270:296-299
- Šípek A. RNA-polymeráza II a poškození DNA. *Genetika – novinky z genetiky* [online]. [cit. 2009-04-08]. Dostupné z WWW: <<http://genetika.bloguje.cz/587315-rna-polymerasa-ii-a-poskozeni-dna.php>>
- Šmardová J, Šmarda J. Jak vznikají nádory? [online]. [cit. 2009-03-16]. FN a MU v Brně 2005. Dostupné z WWW: <http://universitas.muni.cz/2005_4/smarda.html>
- Štípek, Stanislav, et al. *Antioxydanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing 2000, 320s. ISBN 80-7169-704-4
- Thannickal J, 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. Rev.* 2003;552:335-344
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem.-Biol. Interactions* 2006;160:1-40
- Weinert BT, Timiras PS. Theories of aging. *J. Appl. Physiol.* 2003;95:1706-1716
- Wikipedie: Otevřená encyklopedie: Antioxidant [online]. [cit. 2009-01-16]. Dostupné z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Antioxidant>>
- Yen GC, Duh PD, Tsai HL, Huang SL. Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2003;67:1215-1222
- Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.* 2001;54:176-186
- Zafari AM, Fukai MU, Avers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Tailor WR, Griendling KK. Role of NADH/NADPH Oxidase- Derived H₂O₂ in Angiotensin II- Induced vascular hypertrophy. *Hypertension.* 1998;32:488-495

