

Klinická biochemie II

Oxidační stres

Úvod do problematiky RONS

- Fyziologický i patogenetický význam
- Prostředníky přenosu energie
- Faktory imunitní ochrany
- Signální molekuly buněčné regulace
- Působí toxicky a jako dezinformační agenti
- Reakce s různými biologickými strukturami



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

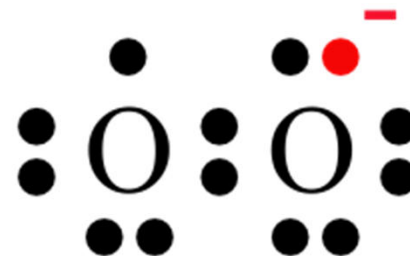


Univerzita
Pardubice

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

- Volný radikál
- ROS
- RNS
- RONS



ROS

Superoxid	$\bullet\text{O}_2^-$
Hydroxylový radikál	$\bullet\text{OH}$
Peroxyl	$\text{ROO}\bullet$
Alkoxyl	$\text{RO}\bullet$
Hydroperoxyl	$\bullet\text{O}_2\text{H}$
Peroxid vodíku	H_2O_2
Kyselina chlorná	HClO
Ozon	O_3
Singletový kyslík	$^1\text{O}_2$



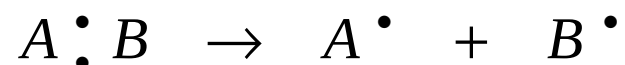
RNS

Oxid dusnatý	$\text{NO}^\bullet$
Oxid dusičitý	$\text{NO}_2^\bullet$
Nitrosyl	NO^+
Kyselina dusitá	HNO_2
Oxid dusitý	N_2O_3
Oxid dusičitý	N_2O_4
Nitronium	NO_2^+
Peroxynitrit	ONOO^-
Alkylperoxynitrit	ROONO



Vznik VR

- Homolytické štěpení



- Redukce
- Oxidace



Řetězová reakce

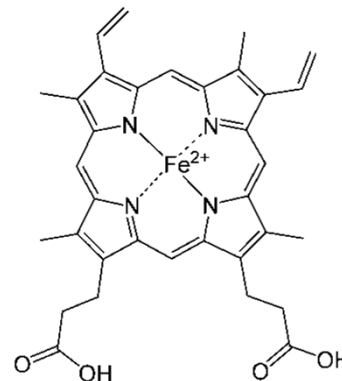
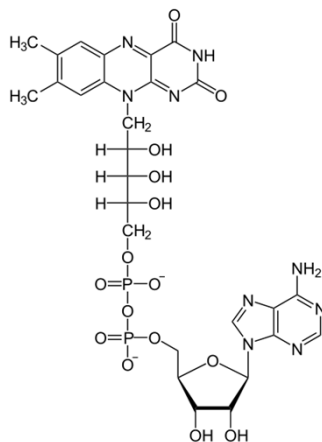
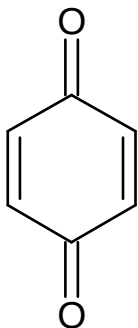
- Iniciace
 - Vznik radikálu
- Propagace
 - Vznik dalších radikálů
- Terminace
 - Různým způsobem

Molekula kyslíku

- Tripletový dioxygen
 - Biradikál
 - Shodný spin
 - Překonání spinové restrikce $\rightarrow {}^1\text{O}_2$

Zdroj VR v organismu

- Membránově vázané enzymy
 - Vzniká superoxid

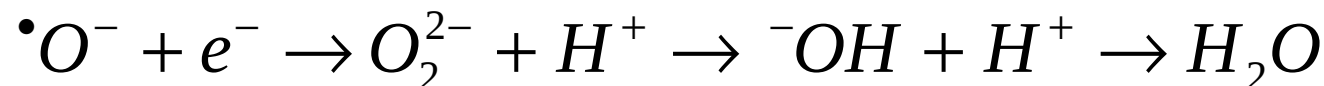
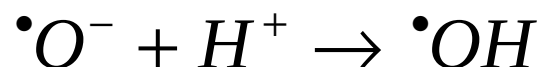
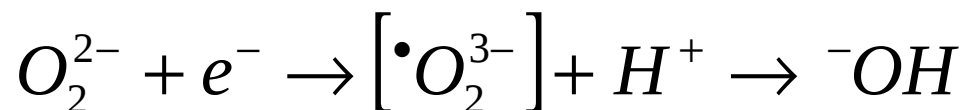
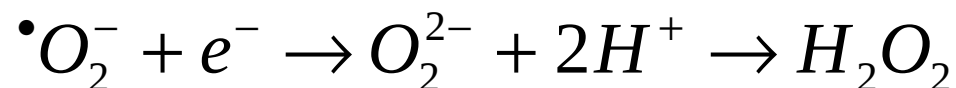
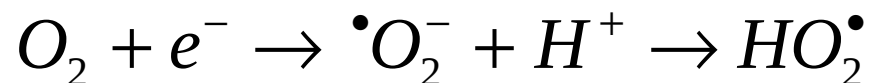


Zdroj VR v organismu

- Respirační řetězec

Zdroj VR v organismu

- Respirační řetězec



Zdroj VR v organismu

- ER: cytochrom P450



Zdroj VR v organismu

- Leukocyty
 - Respirační vzplanutí



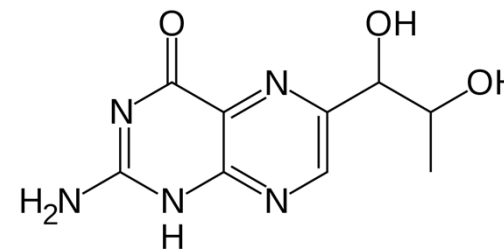
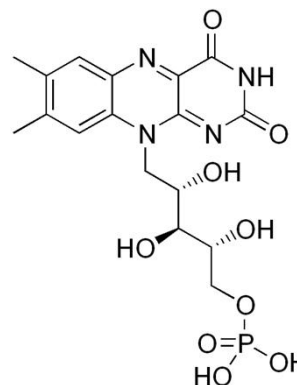
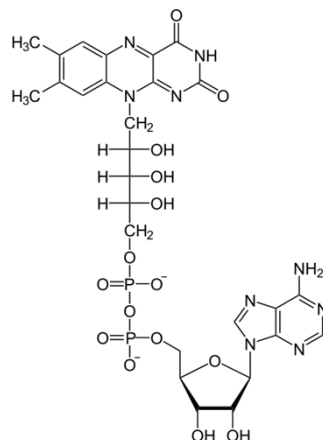
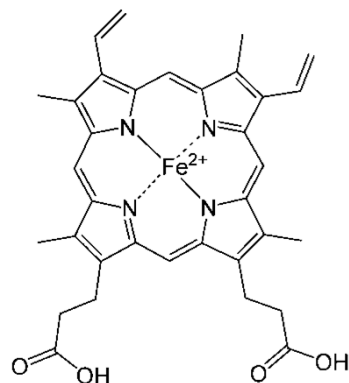
Zdroj VR v organismu

- Náhodná oxidace Hb na metHb
 - Superoxid



Zdroj VR v organismu

- Syntéza NO•
– NOS



Přehled RONS

- Superoxid

– Dismutace, urychlována SOD



Přehled RONS

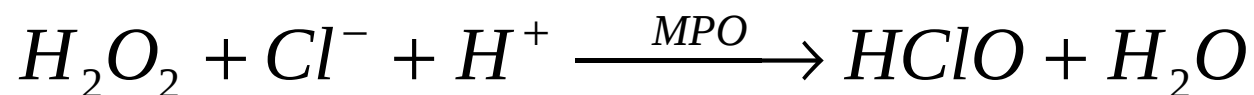
- Peroxid vodíku
 - Účastní se vzniku VR
 - **Přítomnost tranzitních kovů (Fe^{2+} , Cu^{+})**
 - Haber-Weissova (Fentonova) reakce



Přehled RONS

- Kyselina chlorná

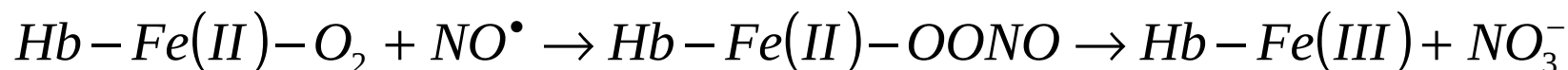
– Myeloperoxidasa



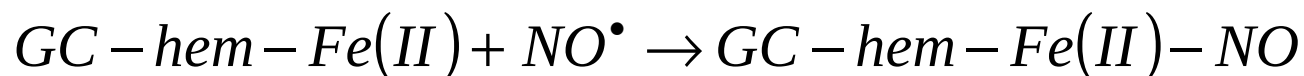
Přehled RONS

- **Radikál oxidu dusnatého**

- Buněčná signalizace
- Vychytáván v erytrocytech



- Guanylátcyklasa
 - Stimulace cGMP → vasodilatace



Přehled RONS

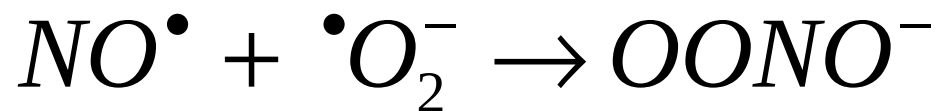
- **Radikál oxidu dusnatého**

- Snadno reaguje s Tyr, Cys, GSH, albuminem, sekundárními aminy



Přehled RONS

- Peroxynitrit



- Silné oxidační činidlo

- **Protonovaný peroxynitrit**



- Nitrace a hydroxylace Tyr (3-nitrotyrosin)

Antioxidační ochranný systém

- Bránit se nadměrnému množství RONS
 - Regulace aktivity enzymů
 - Vychytávání tranzitních prvků
 - Transferrin, ferritin
- Záchyt a odstranění VR, které se již vytvořily
 - Scavengers, trappers, quenchers
 - Enzymy, látky dávající s RONS stálejší produkty



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Univerzita
Pardubice

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

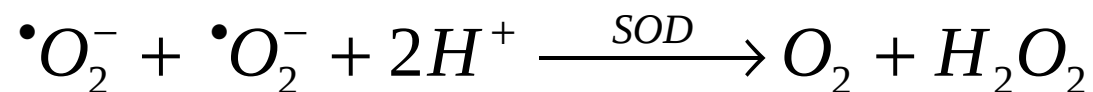
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Antioxidační ochranný systém

- Reparační mechanismy poškozených biomolekul
 - Fosfolipasa
 - Odstranění modifikovaných proteinů
 - Reparační enzymy opravující poškozenou DNA

Enzymové antioxidační systémy

- SOD

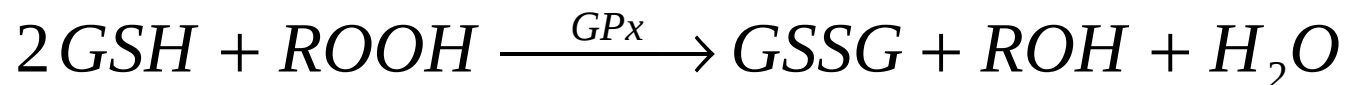
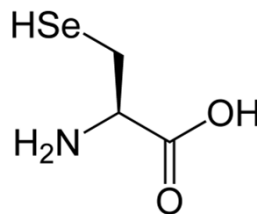


– Cu,Zn-SOD

– Mn-SOD

Enzymové antioxidační systémy

- Glutathionperoxidasy
 - Rozkládá hydroperoxydy
 - Fosfolipasa A₂
 - Selenoproteiny

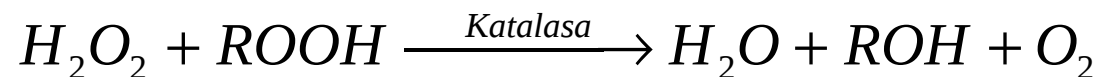
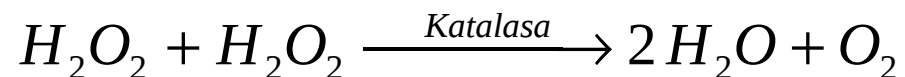


Enzymové antioxidační systémy

- Glutathiontransferasy
 - Konjugační reakce
 - Detoxikace xenobiotik (4-HNE)

Enzymové antioxidační systémy

- Katalasa



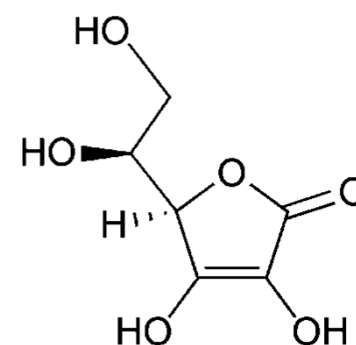
Vysokomolekulární endogenní antioxidanty

- Vazba přechodných prvků
 - Transferrin, laktoferrin (PMN), ferritin, haptoglobin (Hb), hemopexin (hem), ceruloplasmin (ferrooxidasová aktivita $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$)
 - Thiolové skupiny proteinů
 - Chaperony
 - Vazba oxidací poškozených BK → proteosomy



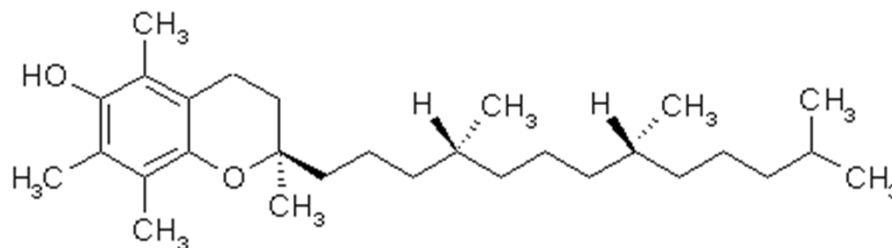
Nízkokomolekulární endogenní antioxidanty

- Askorbát
 - Kolagen, D $\rightarrow$ NA, vstřebávání železa
 - Redukční činidlo ($\bullet\text{O}_2^-$, $\bullet\text{OH}$, $\text{RO}_2\bullet$, reaguje s $^1\text{O}_2$ a HClO)
 - Regeneruje tokoferyllový radikál
 - **Může redukovat Fe^{3+} a Cu^{2+}**
 - **Fentonova reakce !**



Nízkokomolekulární endogenní antioxidanty

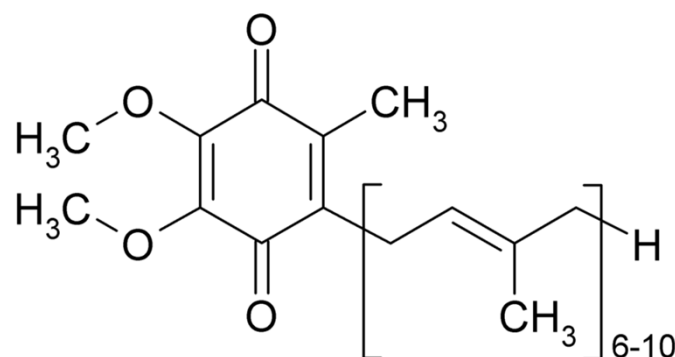
- α -Tokoferol



- 8 isomerů, biologicky nejúčinnější je A
- Antioxidant membrán
- Přeměňuje alkylperoxylové radikály ($\text{LOO}^\bullet$) na hydroperoxy ($\rightarrow \text{GPx}$)

Nízkokomolekulární endogenní antioxidanty

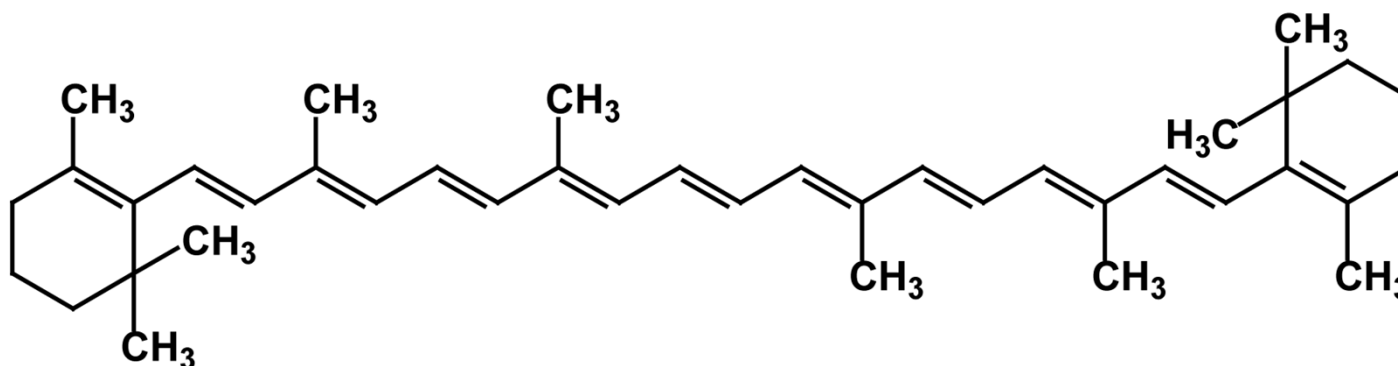
- Ubichinon/ubichinol (koenzym Q)



- U savců nejrozšířenější CoQ₁₀
- Přenašeč elektronů v dýchacím řetězci
- Spolupráce s AT, regeneruje AT

Nízkokomolekulární endogenní antioxidanty

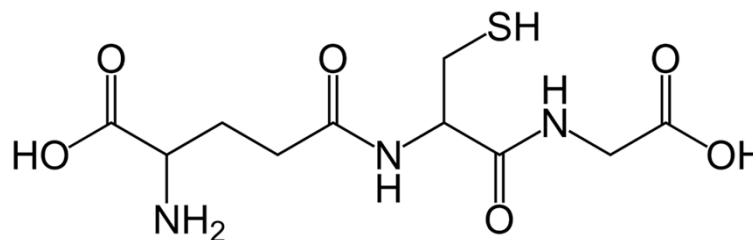
- Karotenoidy, β -karoten



- Odstraňování radikálů centrovaných na uhlík a $\text{ROO}\bullet$ v lipidech
- Mohou zhaset singletový kyslík

Nízkokomolekulární endogenní antioxidanty

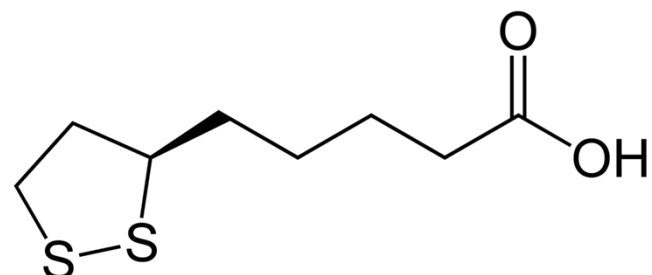
- Glutathion



- Redox pufr buněk
- Odstraňuje ROS, udržuje v redukované formě thiolové skupiny významných látek
- Regeneruje α - tokoferol a askorbát
- GPx, GST

Nízkokomolekulární endogenní antioxidanty

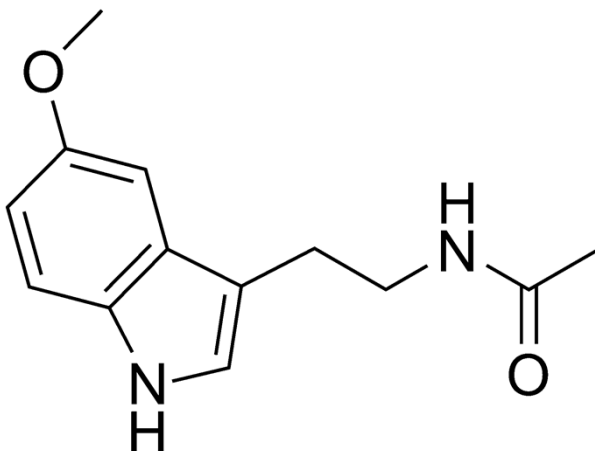
- Kyselina lipoová



- Kofaktor PDH a α -KGD komplexu
- Reaguje s $\text{RO}_2^\bullet$, askorbylovými radikály, $\text{HO}^\bullet$, $\text{NO}^\bullet$, tokoferyllovými radikály, $^\bullet\text{O}_2^-$ a HClO

Nízkokomolekulární endogenní antioxidanty

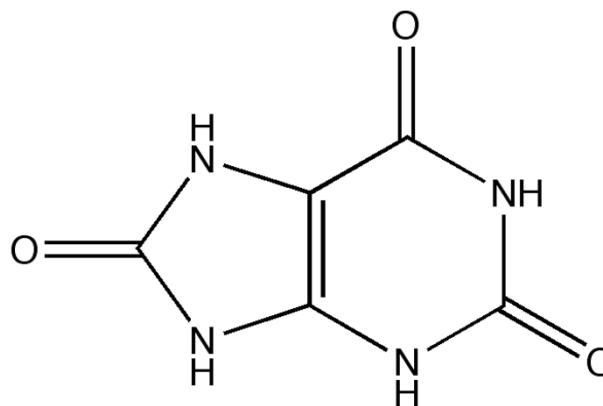
- Melatonin



- Hormon epifysy
- Lipofilní molekula, vychytává •OH

Nízkokomolekulární endogenní antioxidanty

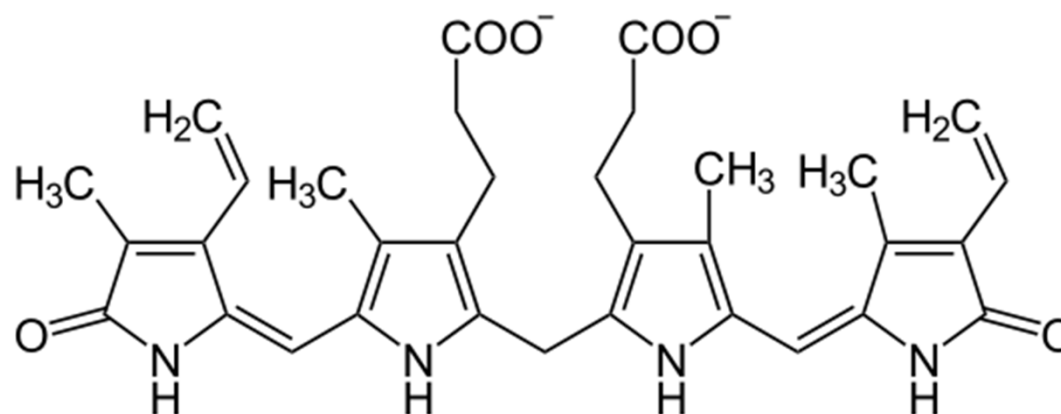
- Kyselina močová



- V tubulech 90 % resorbováno
- Vychytává $\text{RO}^\bullet$, HClO , váže ionty železa a mědi

Nízkokomolekulární endogenní antioxidanty

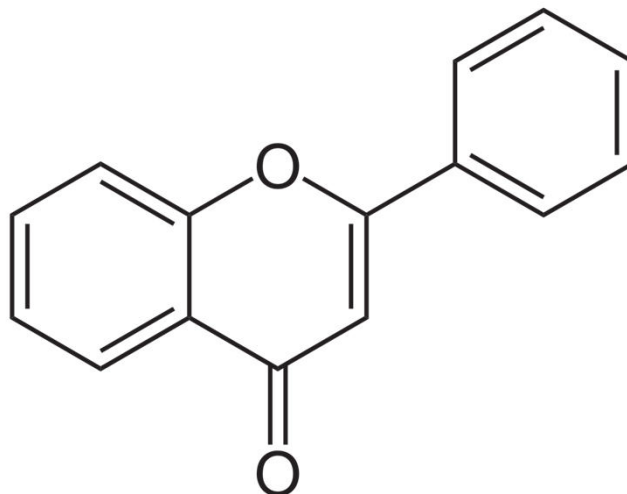
- Bilirubin



- Inhibuje peroxidaci lipidů (regeneruje AT)
- Zháší ¹O₂

Nízkomolekulární endogenní antioxidanty

- Flavonoidy



- Působí protizánětlivě, antikarcinogenně, zasahují do buněčného signálního systému, chelatují železo

Vztahy mezi antioxidanty

- Funkce jednoho antioxidantu podmiňuje účinek jiného článku soustavy
- Příklad:
 - SOD → CAT (GPx) → GSH → pentosový cyklus
 - Deficit G-6-P-DH



Prolomení antioxidační ochrany

- Oxidační stres
 - Nadměrná produkce RONS
 - Metabolismus
 - Reoxygenace tkáně po ischemii
 - Příjem oxidoredukčně aktivních xenobiotik
 - Uvolnění železa, mědi
 - Nedostatečná funkce antioxidační ochrany



Železo

- Potrava: $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ (redukující látky, AA)
→ enterocyty → plasmatický transferrin
(ceruloplasmin) → ferritin (vlastní
ferroxidasová aktivita)

Měď

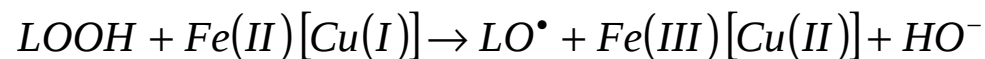
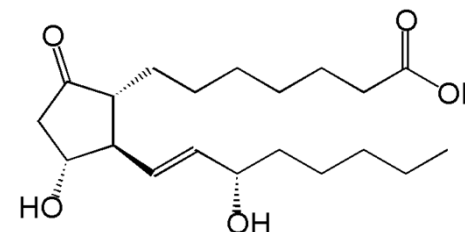
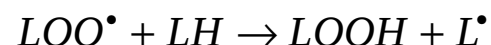
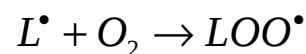
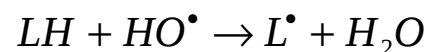
- GIT → albumin → játra → ceruloplasmin (váže 6 atomů Cu) → KO
 - Wilsonova choroba
 - Defekt intracelulárního transportu v hepatocytu
 - Defektní pumpa P-Cu-ATPasa (přenos z cytosolu do GA → CP → endosom → žluč
 - Měď se hromadí v cytosolu
 - Vzniká defektní CP bez ferroxidasové aktivity
 - V séru nízká hladina CP, v játrech se hromadí měď a nevylučuje se žlučí



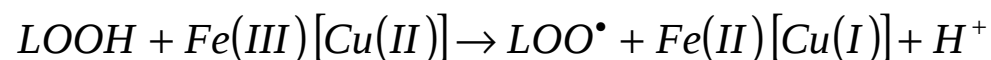
Poškození biomolekul

- Peroxidace lipidů

- PUFA



nebo

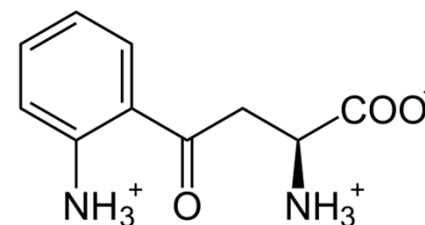


- Enzymová peroxidace lipidů

- Hydroperoxidasy, endoperoxidasy (PG, LT)

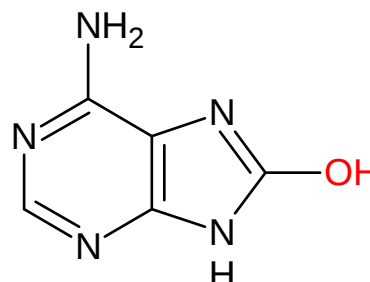
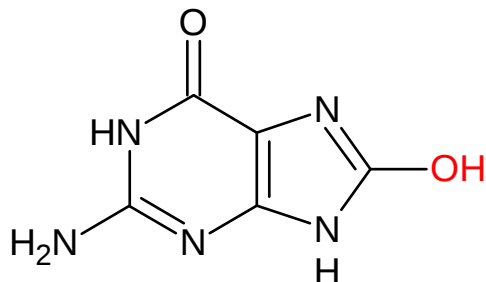
Poškození biomolekul

- Poškození proteinů
 - Oxidace AA zbytků
 - Sulfoxid Met, kyselina cysteinová, kynurenin
 - Řada AA hydroxylována
 - Změna aktivity, iontové pumpy, $\uparrow$ Ca^{2+} : aktivace proteas a fosfolipas



Poškození biomolekul

- Poškození DNA
 - HO• reaguje s deoxyribosou → MDA
 - Chybné párování bází
 - Apoptosa, mutagenese, karcinogeneze, stárnutí
 - 8-hydroxyguanin, 8-hydroxyadenin



Poškození enzymových komplexů a buněčné signalizace

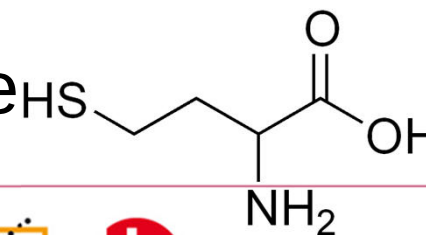
- $\bullet\text{OH}$
 - Uvolňuje Fe z enzymových center Fe/S
 - Akonitasa
 - Ferrochelataza
- $\text{NO}\bullet$
 - Váže se na Fe v aktivním centru řady enzymů
 - CAT
 - Cytochrom-P450

VR v patologických procesech

- Nekrosa a apoptosa
- Hypoxie, ischemie a oxygenace
 - XOD (O-forma)
- Zánět
- Stárnutí
 - Lysosomy: lipofuscin

VR v patogenezi vybraných onemocnění

- Plicní onemocnění
 - Kouření
 - Syndrom dechové tísně dospělých (ARDS)
- KVO
 - Aterosklerosa
 - NO•
 - Modifikace LP
 - Hyperhomocysteinemie



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



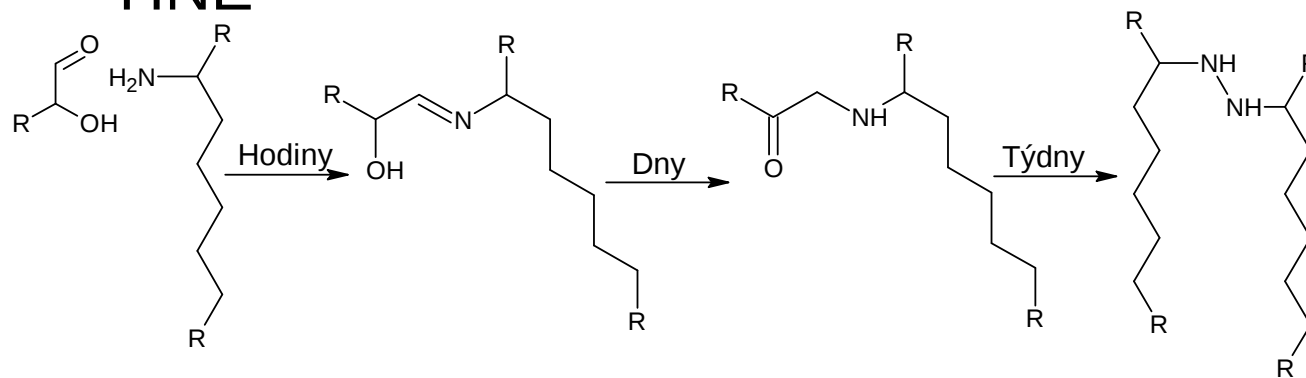
Univerzita
Pardubice

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

VR v patogenezi vybraných onemocnění

- Diabetes mellitus
 - Glukosa: glykace
 - Autooxidace glukosy a AGE: ROS, MDA, 4-HNE



VR v patogenezi vybraných onemocnění

- Diabetes mellitus
 - Diabetická retinopatie, nefropatie a neuropatie



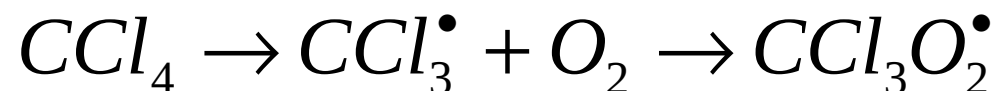
VR v patogenezi vybraných onemocnění

- Onemocnění ledvin
 - NO• ovlivňuje tubulární funkce
 - VR a glomerulonefritidy

VR v patogenezi vybraných onemocnění

- Onemocnění GIT a jater

- Střevní záněty
- Játra



- Ethanol

- Indukuje P450IIE1 (mikrosomální ethanolový oxidační systém)
 - » $\bullet O_2^-$, H_2O_2 , $CH_3-C^\bullet H-OH$



VR v patogenezi vybraných onemocnění

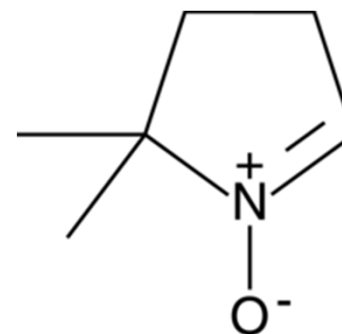
- Neurodegenerativní onemocnění
 - Parkinsonova choroba
 - Autooxidace dopaminu: ROS
 - Alzheimerova choroba
 - Zásah do cholinergního systému?
 - Amyloid → senilní plaky
 - Amyloidní prekursorový protein → **amyloidní peptid β**

Laboratorní metody k posouzení oxidačního poškození organismu

Přímá detekce VR

- Technicky a finančně velmi náročné
- Spíše výzkumné účely
- ESR

– 5,5-dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid



Přímá detekce VR

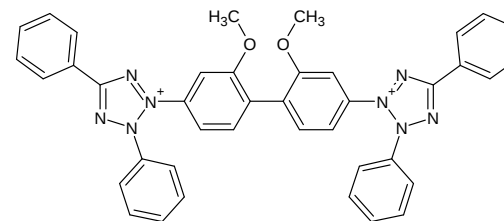
- Pulsní radiolysa
 - Ionizační záření (< 1 s)
 - Detekce: spektrofotometrie, luminiscence, NMR

Přímá detekce VR

- Chemiluminescence buněk a tkání
- Fluorescenční sledování VR
 - Citlivá kamera sledující fluorescenci
 - NADH, retinol, etidiumbromid

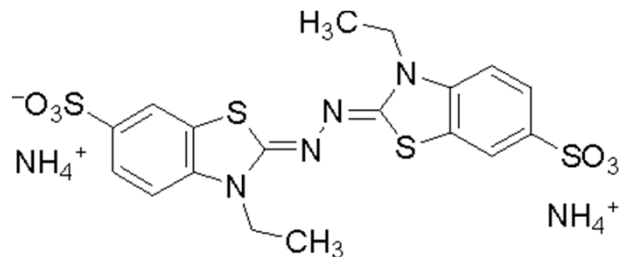
Přímá detekce VR

- Stanovení superoxidu
 - Přímá fotometrie
 - Redukce detektorové molekuly
 - Nitrotetrazoliová modř
 - Cytochrom c
 - Elektroda s cytochromem c



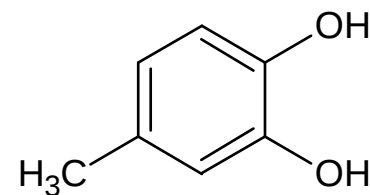
Přímá detekce VR

- Stanovení peroxidu vodíku
 - Přímá fotometrie
 - Měření kyslíku po přidání katalasy
 - Fluorimetrická detekce s použitím peroxidasové reakce; ABTS
 - » Kyselina 2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová]



Přímá detekce VR

- Aromatická hydroxylace jako ukazatel tvorby hydroxylového radikálu
 - Acetylsalicylát
 - 2,3-DHB, 2,5-DHB, katechol



– HPLC-ED

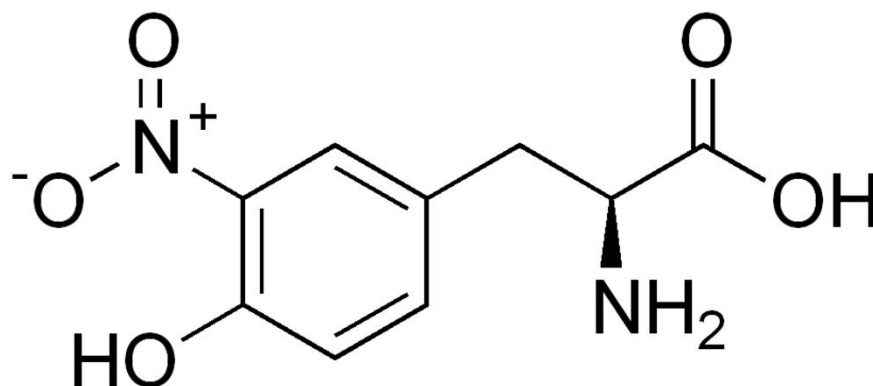
Přímá detekce VR

- Přímé měření radikálu oxidu dusnatého
 - Porfyrinová elektroda
 - Přímě do žíly
 - Reakce $\text{NO}^\bullet$ s Hb $\rightarrow$ nitrosylHb (paramagnetický)
 - ESR



Přímá detekce VR

- Stanovení peroxynitritu
 - Přímá fotometrie
 - Nepřímé stanovení jako 3-nitrotyrosin
 - HPLC, imunochemicky



Měření produktů oxidačního stresu

- Pro klinickou praxi použitelnější
- Stanovení konjugovaných dienů a lipoperoxidů
 - Mikroperoxidasa, HPLC s chemiluminescenční detekcí



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



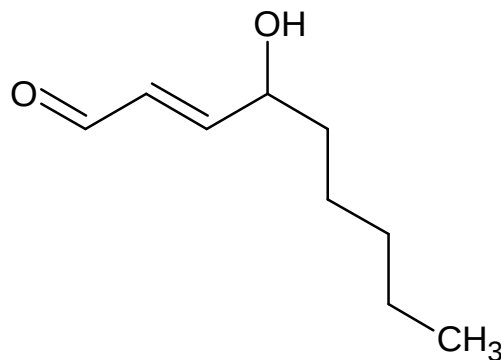
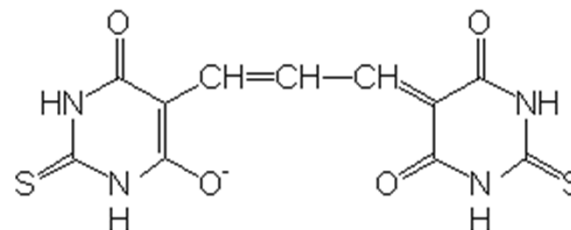
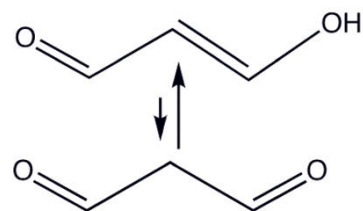
Univerzita
Pardubice

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

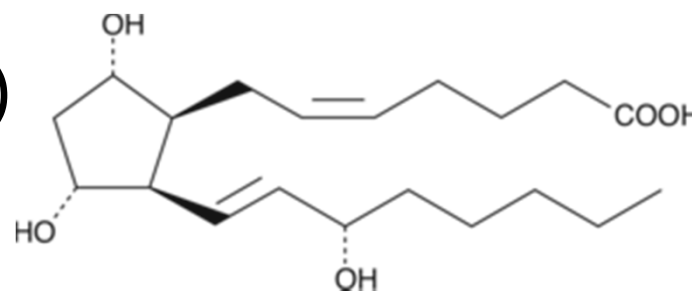
Měření produktů oxidačního stresu

- Stanovení MDA
 - 2-TBA, 2,4-DNPH
 - BHT, EDTA
 - HPLC
- Stanovení 4-HNE
 - 2,4-DNPH
 - GC-MS



Měření produktů oxidačního stresu

- Stanovení F_2 -isoprostanů
 - Neenzymová peroxidace kyseliny arachidonové
 - Extrakce, hydrolýza, GC-MS, HPLC, imunochemicky
 - 8-iso-PGF_{2α} (8-epi-PGF_{2α})

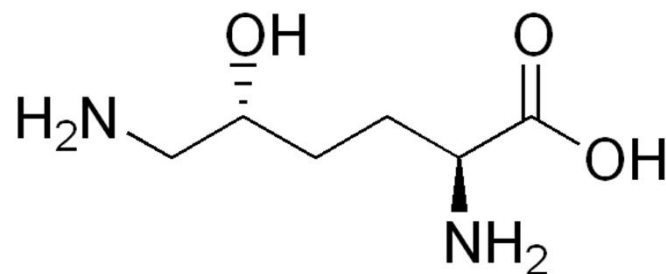


Měření produktů oxidačního stresu

- Stanovení vydechovaných těkavých uhlovodíků
 - Ethan, propan
 - Absorpce ($-100\text{ }^{\circ}\text{C}$), desorpce, GC-FID

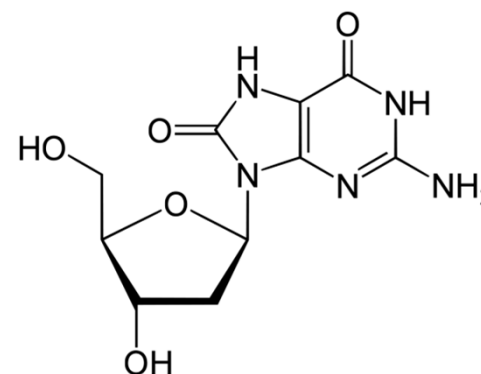
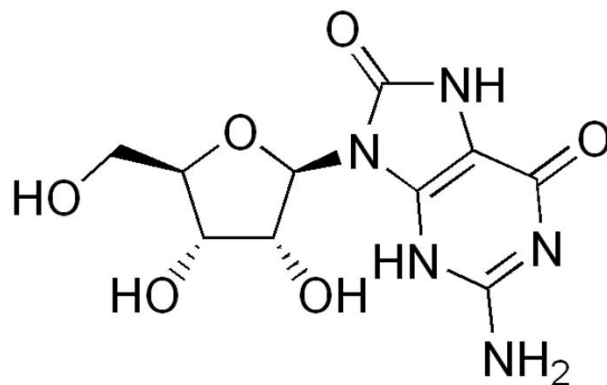
Měření produktů oxidačního stresu

- Stanovení karbonylových skupin proteinů
 - 2,4-DNPH, HPLC
- Stanovení proteinových hydroperoxidů
 - Delipidace, hydrolýza, redukce (NaBH_4)
 - HPLC hydroxyderivátů AA



Měření produktů oxidačního stresu

- Měření oxidačních derivátů NK
 - 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin, 8-hydroxyguanosin

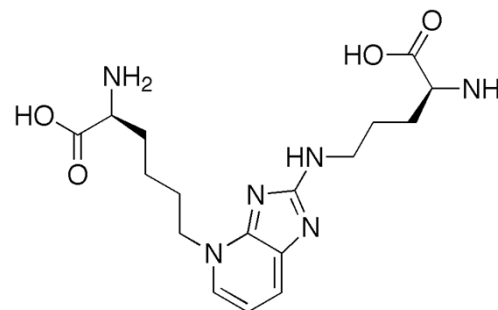
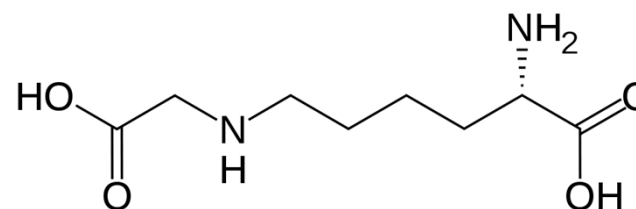
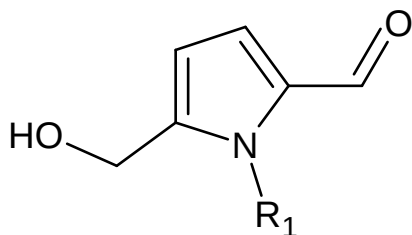


Měření produktů oxidačního stresu

- Stanovení autoproti látek proti oxidačně modifikovaným molekulám
 - Ox-LDL: ELISA

Měření produktů oxidačního stresu

- Stanovení AGE
 - Imunochemicky, HPLC
 - N(6)-karboxymethyllysine
 - Pentosidin
 - Pyrralin

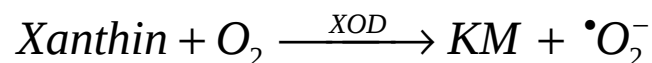


Měření antioxidantů

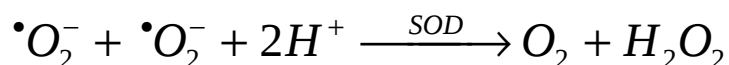
- Stanovení glutathionu
 - Různá derivatizační činidla
 - HPLC-UV/Vis, EC, MS, FD, HPCE
- Stanovení askorbátu
 - HPLC-UV/Vis, EC, MS, FD, HPCE
- Stanovení tokoferolů, ubichinolu, karotenoidů a retinoidů
 - Tma, -80 °C, extrakce (n-hexan)
 - HPLC-UV/Vis, EC, MS

Měření antioxidantů

- Stanovení superoxiddismutasy
 - Labilita substrátu ($\bullet\text{O}_2^-$)
 - Přímá metoda
 - Měření $\bullet\text{O}_2^-$
 - Nepřímá metoda
 - RANSOD

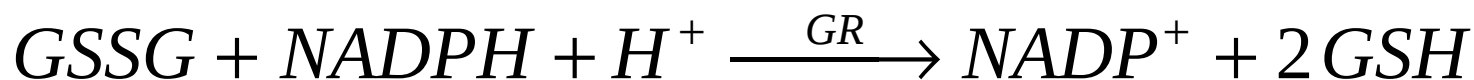
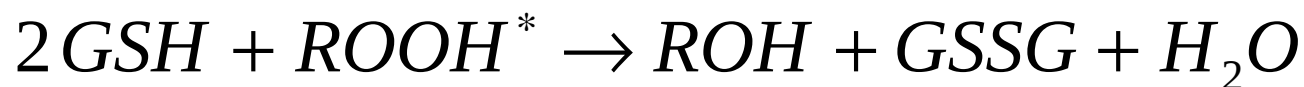


$\bullet\text{O}_2^- + 2 - (4 - \text{jodofenyl}) - 3 - (4 - \text{nitrofenol}) - 5 - \text{fenyltetrazoliumchlorid} \rightarrow \text{formazan}$
nebo

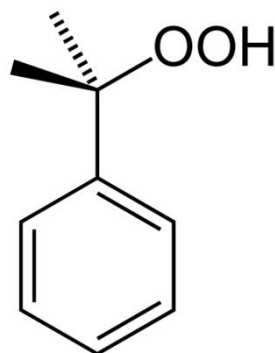


Měření antioxidantů

- Stanovení glutathionperoxidasy
 - Nepřímé stanovení



* *Kumenhydroperoxid*



Měření antioxidantů

- Stanovení katalasy
 - Úbytek přidaného H_2O_2 (fotometricky: 240 nm)
 - Přírůstek O_2 (polarografie)



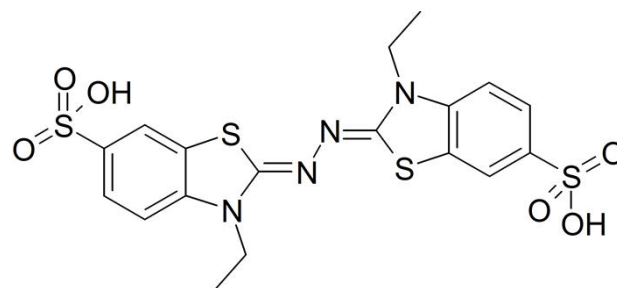
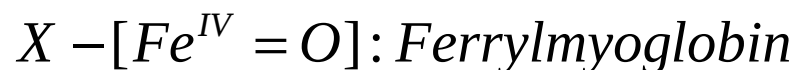
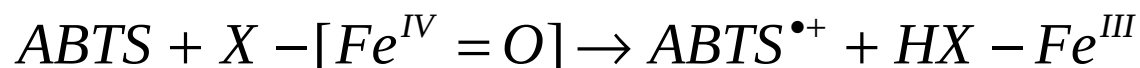
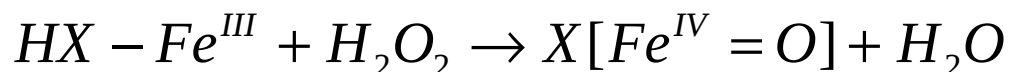
Stanovení stopových prvků

- Se, Zn, Fe, Cu
- AAC, ICP-MS



Testování antioxidační kapacity

- Celková antioxidační kapacita



Testování antioxidační kapacity

- Peroxidovatelnost LP
 - Lipoperoxidace se indukuje iontem Cu^{2+}
 - Sleduje se tvorba konjugovaných dienů (234 nm)

Závěry

- VR a RONS jsou fyziologickou součástí životních dějů
- Destruktivní účinky a jedovatost
- Antioxidanty
- Centrální význam železa a Fentonovy reakce
- Klinická aplikace zmíněných poznatků je zatím omezena
- Klinické studie antioxidační léčby dospívají k rozporným výsledkům

