

Reaktivní formy kyslíku

Doc. RNDr. Jiří Dostál, CSc.

Biochemický ústav LF MU

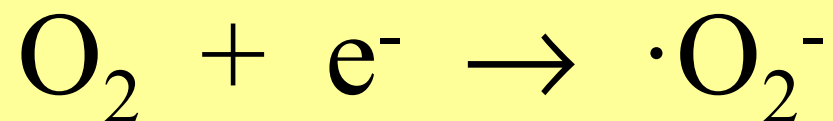
Reaktivní formy kyslíku v organismu

Radikály	Neutrální, anionty, kationty
Superoxid $\cdot\text{O}_2^-$	Peroxid vodíku HOOH
Hydroxylový radikál $\cdot\text{OH}$	Hydroperoxydy* ROOH
Peroxylový radikál* $\text{ROO}\cdot$	Kyselina chlorná HClO
Alkoxylový radikál $\text{RO}\cdot$	Singletový kyslík $^1\text{O}_2$
Hydroperoxylový radikál $\text{HOO}\cdot$	Peroxyinitrit ONOO^-
Oxid dusnatý $\text{NO}\cdot$	Nitronium NO_2^+

* Deriváty fosfolipidů během lipoperoxidace: $\text{PUFA-OO}\cdot$, PUFA-OOH

Superoxidový anion-radikál $\cdot\text{O}_2^-$

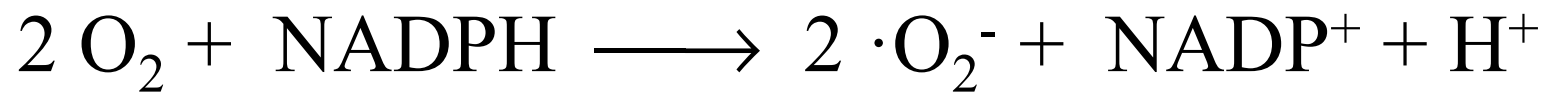
- vzniká jednoelektronovou redukcí dikyslíku
- relativně málo reaktivní



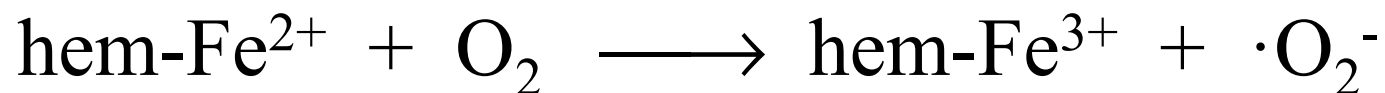
[toto není reakce, pouze jeden redoxní pár]

Vznik superoxidu v organismu

- **tzv. respirační vzplanutí** (NADPH oxidasa, fagocytující leukocyty)

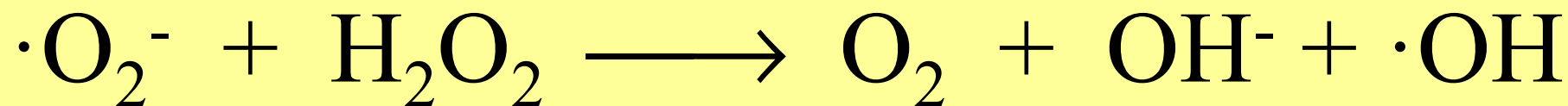


- **spontánní oxidace hemoproteinů**



[toto jsou reakce, tedy kombinace dvou redoxních párů]

Vysoce reaktivní hydroxylový radikál $\cdot\text{OH}$ vzniká ze superoxidu



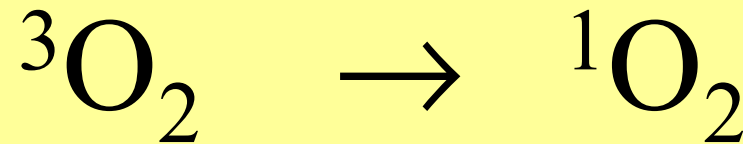
Reakci katalyzují **redukované** ionty kovů (Fe^{2+} , Cu^+)
(tzv. Fentonova reakce)

Jazyková poznámka

Název	Význam
Hydroxid	anion OH^-
Hydroxyl	radikál $\cdot\text{OH}$ nebo skupina $-\text{OH}$
Hydroxy	předpona v názvech organických sloučenin: 2-hydroxypropanová kyselina (mléčná)
Hydroxo	předpona ligandu OH^- v komplexech: $\text{Na}[\text{Al}(\text{OH})_4]$ tetrahydroxohlinitan sodný

Singletový kyslík $^1\text{O}_2$

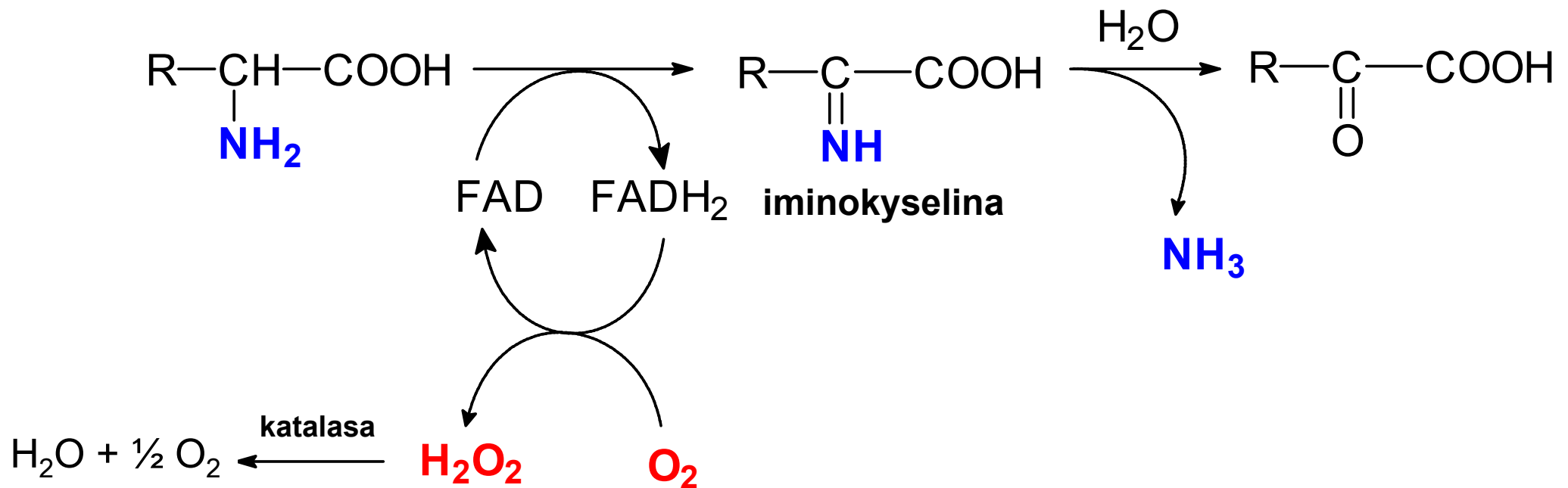
- excitovaný stav tripletového dikyslíku
- vzniká mj. po absorpci světla některými pigmenty (porfyriny)



Peroxid vodíku H_2O_2

- poměrně nestálá sloučenina, snadno se rozkládá se na vodu a kyslík
- vzniká v organismu při deaminaci AK
 - dvouelektronová redukce O_2
- ve Fentonově reakci produkuje $\cdot\text{OH}$
- může oxidovat -SH skupiny enzymů

Oxidační deaminace aminokyselin poskytně amoniak, oxokyselinu a peroxid vodíku

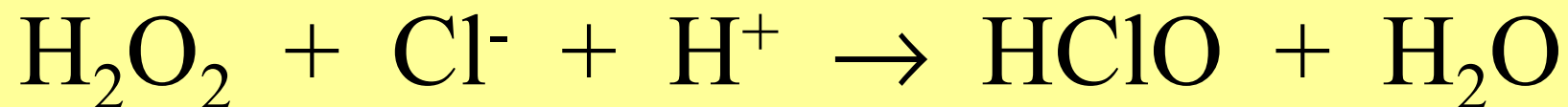


Srovnejte: redukce dikyslíku

Typ redukce	Dílčí reakce (redoxní pár)
Čtyřelektronová	$\text{O}_2 + 4 \text{e}^- + 4 \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$
Jednoelektronová	$\text{O}_2 + \text{e}^- \rightarrow \cdot\text{O}_2^-$
Dvouelektronová	$\text{O}_2 + 2 \text{e}^- + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$

Kyselina chlorná HClO

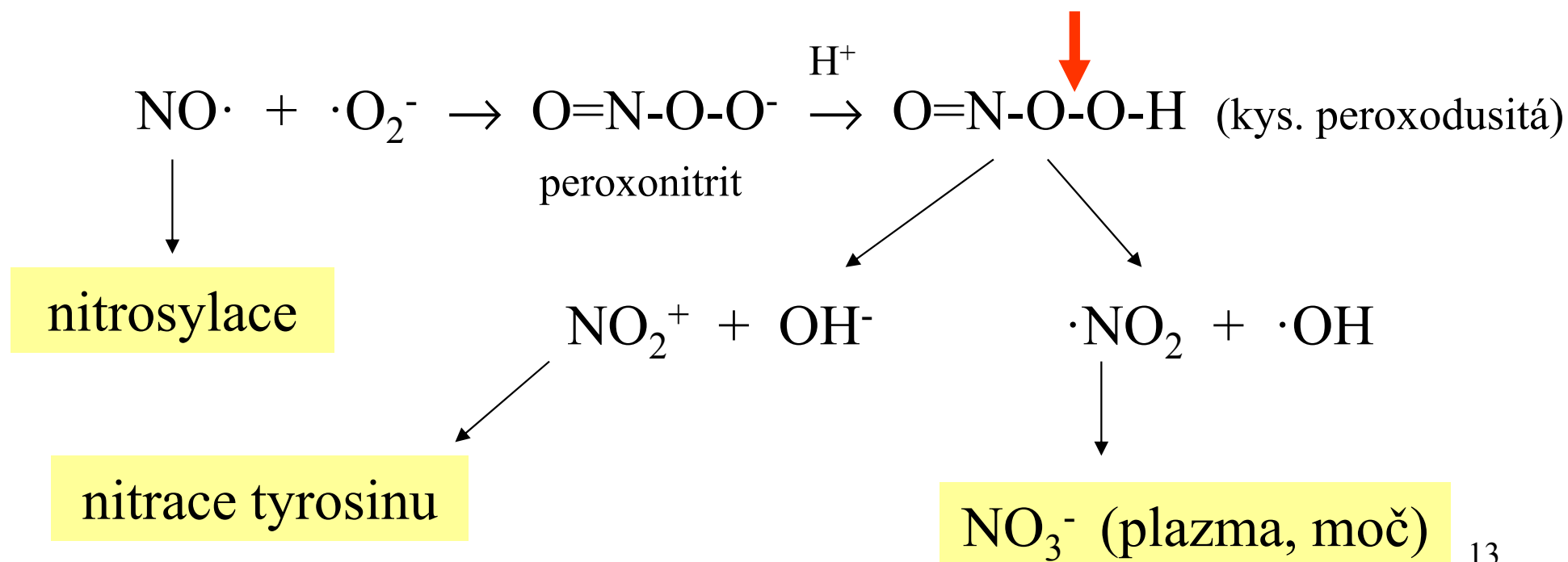
- vzniká v neutrofilních granulocytech z peroxidu vodíku a chloridového aniontu
- reakci katalyzuje myeloperoxidasa
- HClO má silné oxidační a baktericidní účinky



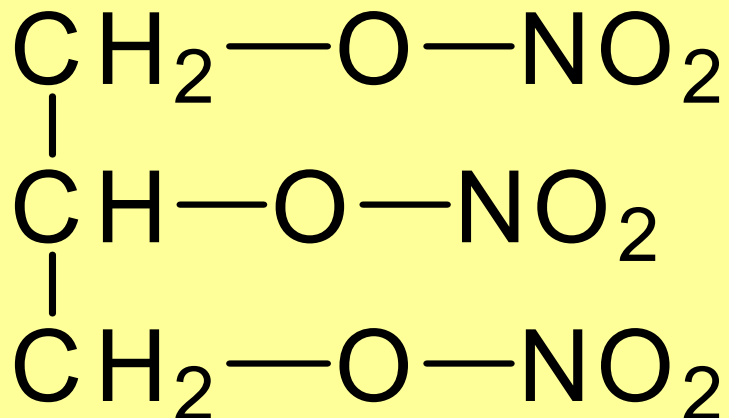


Oxid dusnatý NO· vzniká z argininu

- exogenní zdroje: léčiva, vazodilatancia
- NO· se váže na guanylátcykласu \Rightarrow cGMP \Rightarrow relaxace hladké svaloviny (hlavně cév)
- NO· je radikál a poskytuje další reaktivní metabolity:



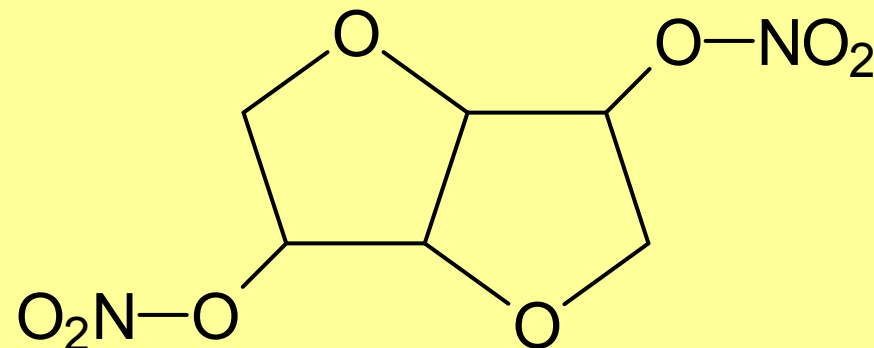
Sloučeniny uvolňující NO



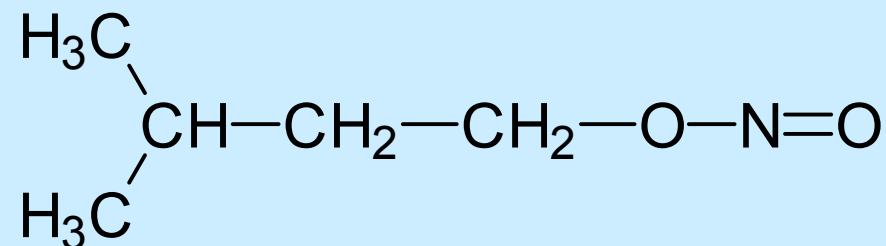
glycerol trinitrát (glyceroli trinitras)
nažloutlá olejovitá kapalina
klasické léčivo, působí rychle
sublinguální tablety, sprej, náplast



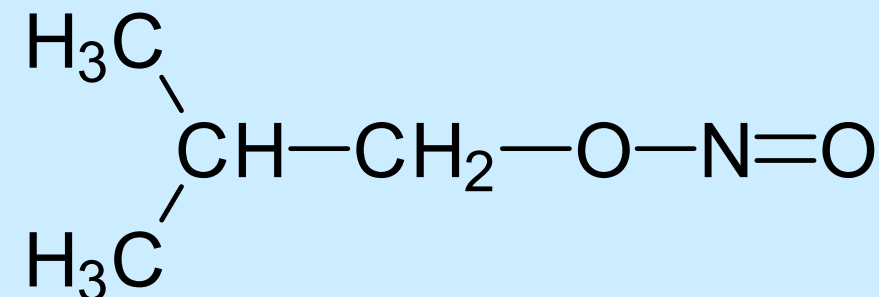
nitroprusid sodný (natrii nitroprussias)
pentakyanonitrosylželezitan disodný
rubínově červené krystaly
extrémně účinný, i.v. infuze



isosorbid dinitrát (isosorbidi dinitras)
výhodnější farmakokinetické vlastnosti



amyl-nitrit (amylis nitris)
těkavá kapalina, inhalační aplikace



isobutyl-nitrit
těkavá kapalina, nová droga
poppers, rush, liquid aroma ...

Pozitivní účinky kyslíkových radikálů

- **meziprodukty** oxidasových a oxygenasových reakcí (cyt P-450), během reakcí jsou radikály vázané na enzym, takže nepoškozují okolní struktury
- **baktericidní účinek** fagocytů, respirační vzplanutí (NADPH-oxidasa)
- **signální molekuly** (první poslové), zatím jasně prokázáno u $\text{NO}\cdot$, u některých dalších radikálů se předpokládá podobné působení

Negativní účinky kyslíkových radikálů

Sloučenina	Poškození	Následky
PUFA	ztráta dvojných vazeb tvorba aldehydů a ROO·	změna propustnosti membrán poškození membr. enzymů
Proteiny	agregace a síťování fragmentace + štěpení modifikace -SH a fenylu	změny v transportu iontů vstup Ca ²⁺ do cytosolu změny v aktivitě enzymů
DNA	štěpení deoxyribosy modifikace bází zlomy řetězce	mutace translační chyby inhibice proteosyntézy

Antioxidační systémy organismu

1. Enzymy (endogenní)

superoxiddismutasa, katalasa, glutathionperoxidas

2. Vysokomolekulární antioxidanty (endogenní)

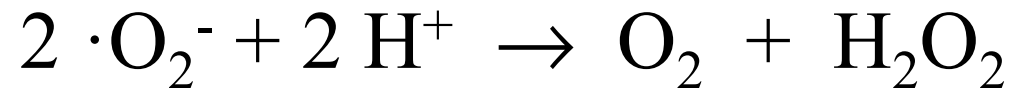
transferrin, ferritin, ceruloplazmin aj., vážou volné ionty kovů

3. Nízkomolekulární antioxidanty (exogenní, endogenní)

- redukující látky s fenolovým -OH (tokoferol, flavonoidy, urát)
- redukující látky s enolovým -OH (askorbát)
- redukující látky s -SH skupinou (glutathion, dihydrolipoát)
- látky s rozsáhlým systémem konjugovaných dvojných vazeb (karotenoidy)

Superoxiddismutasa

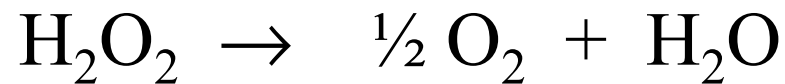
- obsažena v každé buňce,
- fylogeneticky velmi starý enzym
- katalyzuje dismutaci superoxidu



- oxidační čísla kyslíku v reakci: $(-1/2) \rightarrow (0) + (-I)$
- dvě izoformy: SOD1 (Cu, Zn, cytosol),
SOD2 (Mn, mitochondrie)

Eliminace H₂O₂ v organismu

- **katalasa** - disproportionace H₂O₂, obsažena v erytrocytech

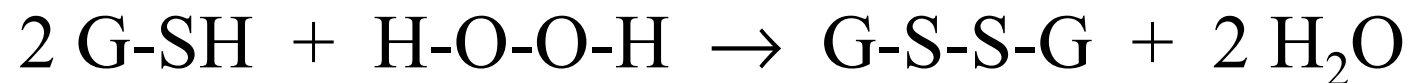


Proč šumí H₂O₂
při aplikaci na ránu?

- **glutathionperoxidasa**

- obsahuje selenocystein, druhý substrát - glutathion (G-SH)

redukuje H₂O₂ a hydroperoxydy fosfolipidů (ROOH)



neškodný derivát

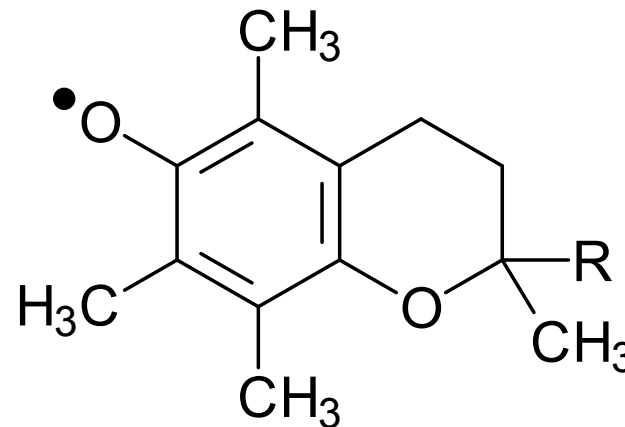
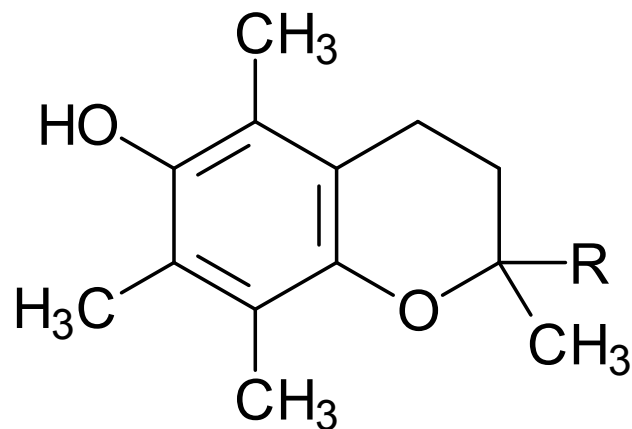
Nízkomolekulární antioxidanty

Lipofilní	Hydrofilní
Tokoferol	L-askorbát
Karoteny	Flavonoidy
- lykopen	Dihydrolipoát ^a
- lutein, zeaxanthin	Glutathion ^a
Ubichinol ^a	Močová kyselina ^a

^a Endogenní sloučeniny.

Tokoferol

- Lipofilní antioxidant buněčných membrán a lipoproteinů
- Redukuje peroxylové radikály fosfolipidů na hydroperoxydy, které jsou dále redukovány GSH, tokoferol se oxидуje na stabilní radikál
- $\text{PUFA-O-O}\cdot + \text{Toc-OH} \rightarrow \text{PUFA-O-O-H} + \text{Toc-O}\cdot$
- $\text{Toc-O}\cdot$ se částečně redukuje na Toc-OH askorbátem n. GSH (fázové rozhraní)
- $\text{Toc-O}\cdot + \text{askorbát} \rightarrow \text{Toc-OH} + \text{semidehydroaskorbát}$



Karotenoidy

- Karotenoidy jsou polyisoprenoidní uhlovodíky (tetraterpeny)
- Odstraňují peroxylové radikály, samy se při tom mění na stabilní karotenový radikál
- Mají schopnost zhaset (deexcitovat) singletový kyslík
- Zdroje v potravě: listová zelenina, žlutě, oranžově a červeně zbarvená zelenina a ovoce
- Nejúčinnější antioxidant je **lykopen**, vyskytuje se pouze v některých potravinách, **hlavně rajčata** a výrobky z nich (kečupy, protlaky) – je termicky stabilní
- Vysoký příjem lykopenu ve středomoří



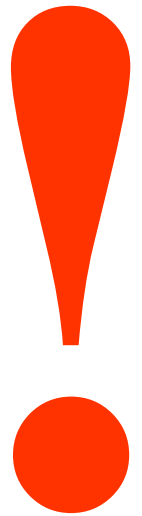
Obsah lykopenu v potravinách (mg/100 g)

Rajský protlak	10-150
Kečup	10-14
Rajská šťáva/omáčka	5-12
Meloun	2-7
Papaja čerstvá	2-5
Rajčata čerstvá	1-4
Meruňky kompot	~ 0,06
Meruňky čerstvé	~ 0,01

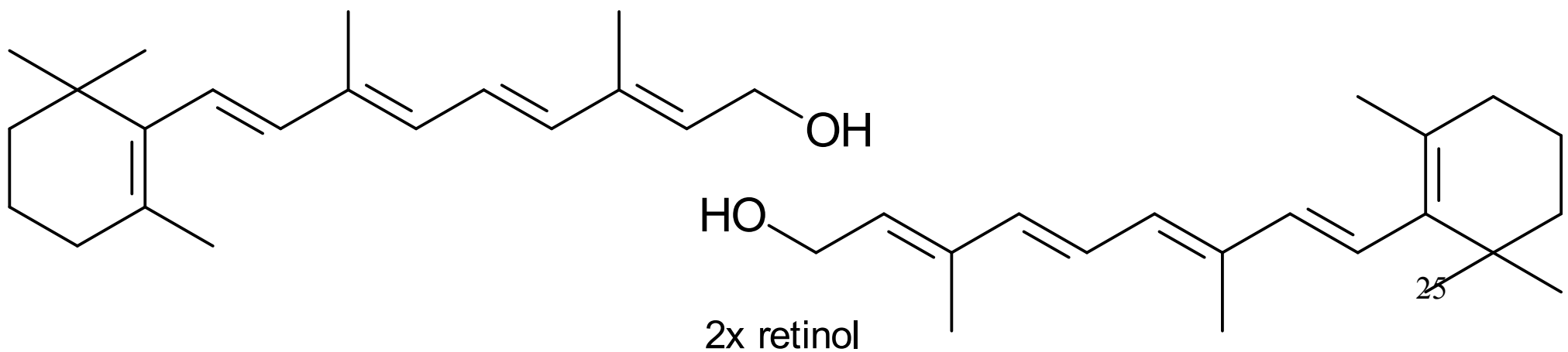
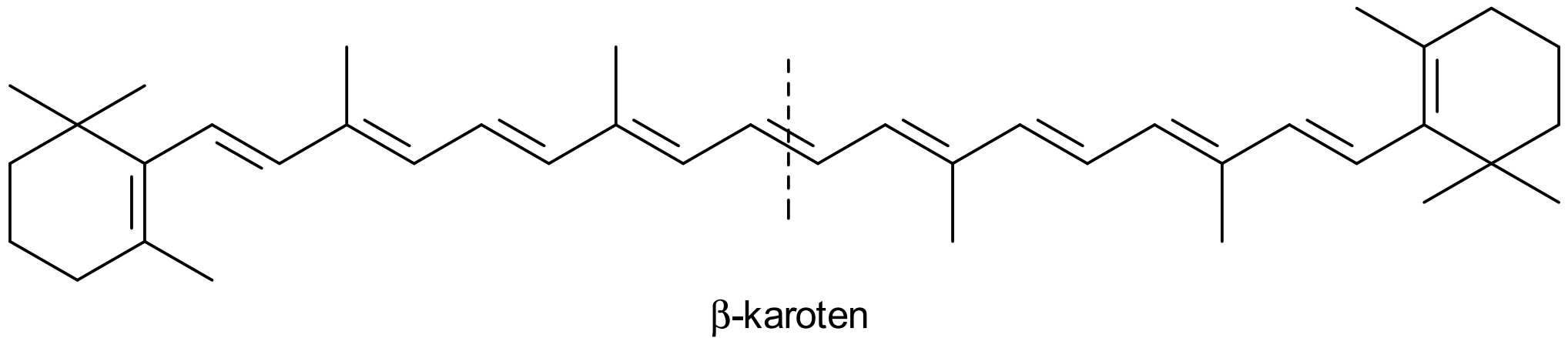
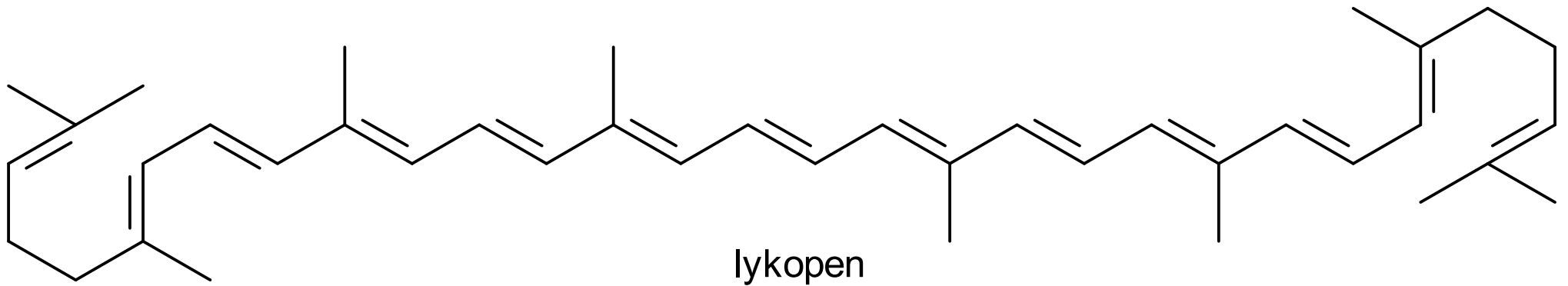
Pro efektivní uvolnění
a vstřebání lykopenu

je třeba rajčata:

- mechanicky rozmělnit
- rozvařit
- přidat olej



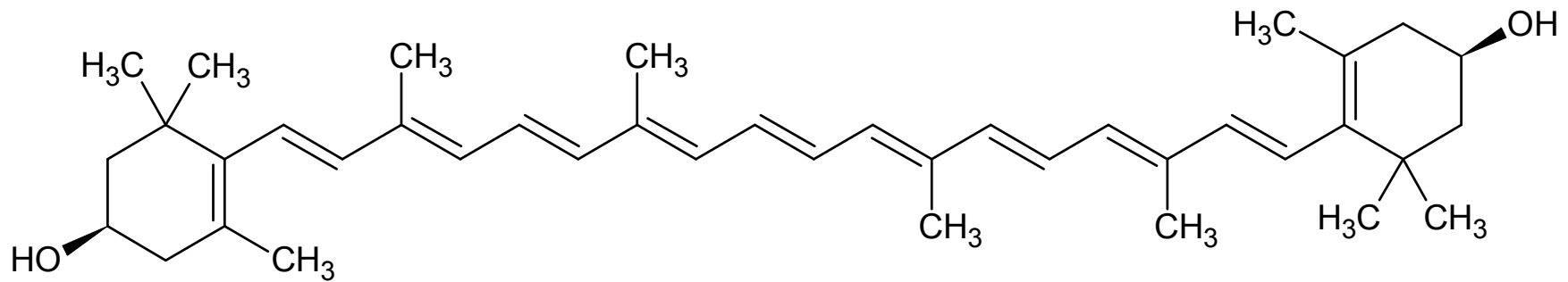
Lykopen není prekurzor retinolu, nemá β -jononový kruh



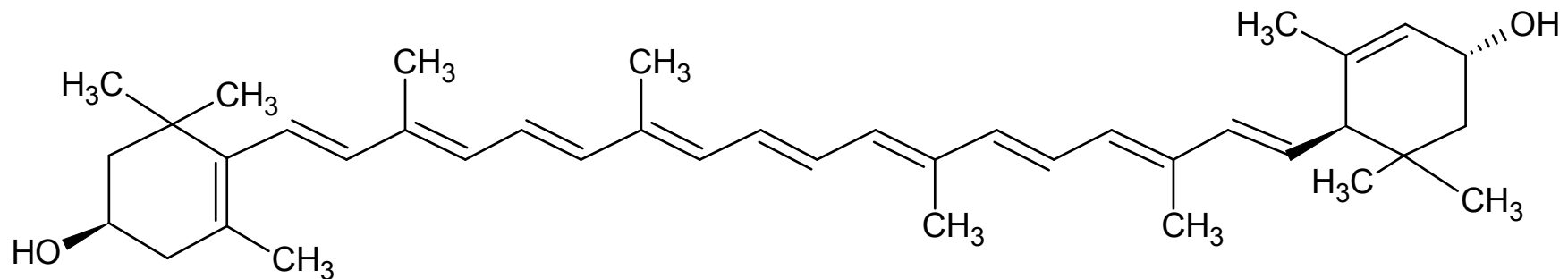
Lutein a zeaxanthin

- patří mezi xanthofyly – kyslíkaté deriváty karotenoidů
- vyskytují se zejména v zelené listové zelenině
- obsažené ve žluté skvrně (macula lutea) a chrání ji před degenerací
- četné preparáty na trhu

Zeaxanthin and lutein se liší v poloze dvojné vazby a počtu chirálních center



zeaxanthin (dvě chirální centra)



lutein (tři chirální centra)

Ubichinol (QH₂)

- Vyskytuje se ve všech membránách
- Endogenní syntéza střevní mikroflórou z tyrosinu a farnesyldifosfátu (odbočka při biosyntéze cholesterolu)
- Exogenní zdroje: klíčkový olej, játra, maso
- Redukovaná forma QH₂ pomáhá při regeneraci tokoferolu
- $\text{Toc-O}\cdot + \text{QH}_2 \rightarrow \text{Toc-OH} + \cdot\text{QH}$

L-Askorbát (vitamin C)

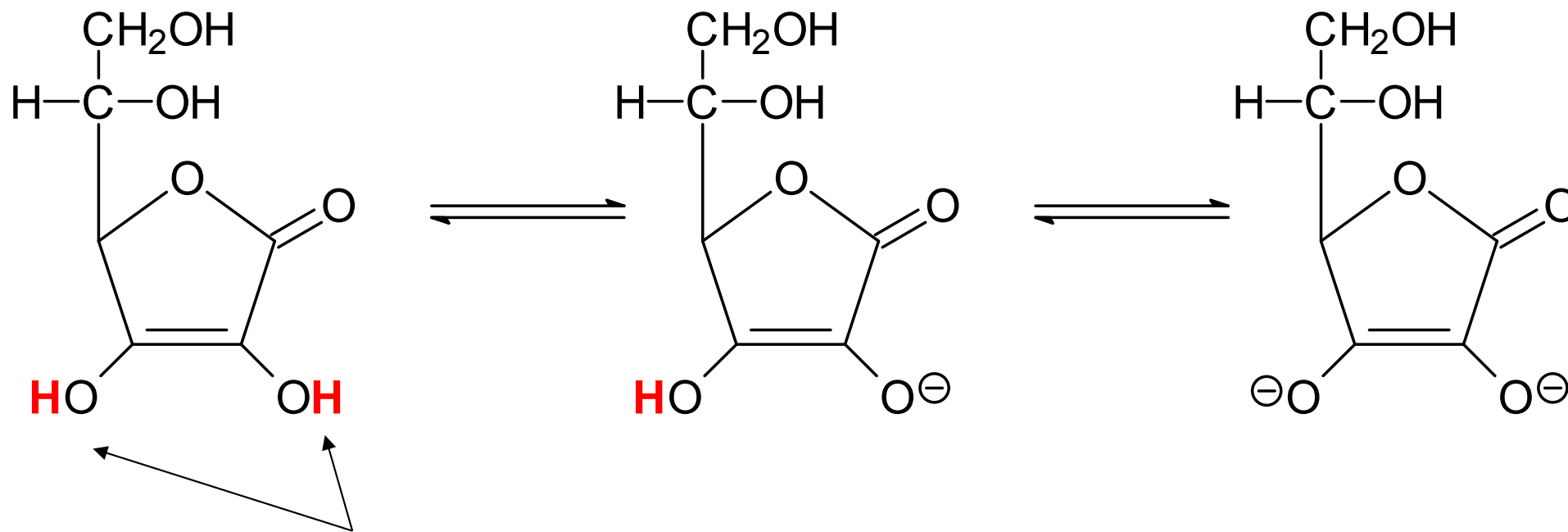
- Kofaktor hydroxylace prolinu (syntéza kolagenu)
- Kofaktor (reduktant) hydroxylace dopaminu na noradrenalin
- Silné redukční činidlo ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$, $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{+}$)
- Umožňuje vstřebávání železa z potravy
- Redukuje radikály $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$, $\text{HO}_2\cdot$, $\text{ROO}\cdot$ aj.
- Regeneruje radikál tokoferolu
- Odbourává se na oxalát !!
- Nadbytek askorbátu má prooxidační účinky !!

**neužívat
velké dávky**

L-Askorbová je dvojsytná kyselina

$$pK_{A1} = 4,2$$

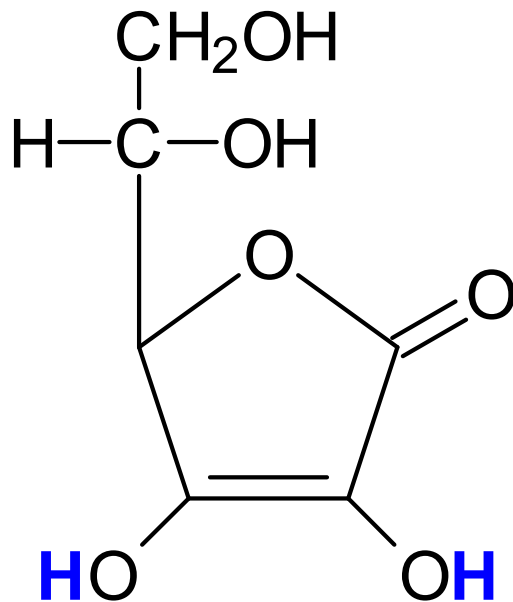
$$pK_{A2} = 11,6$$



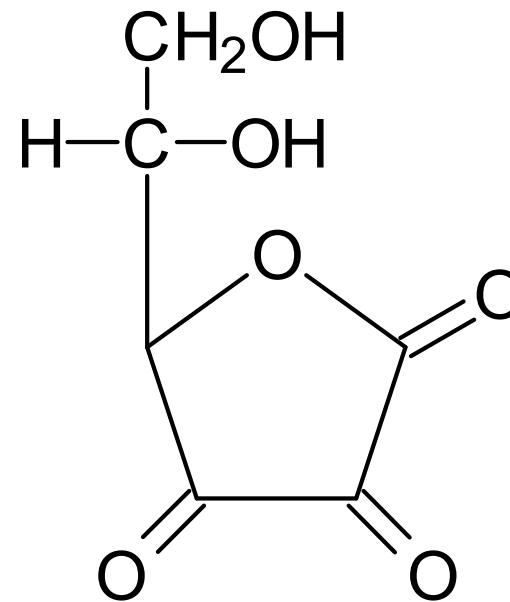
dva enolové hydroxyly

Dva konjugované páry:
askorbová kys. / hydrogenaskorbát
hydrogenaskorbát / askorbát

L-Askorbová kyselina má redukční účinky



askorbová kys.
(redukována forma)



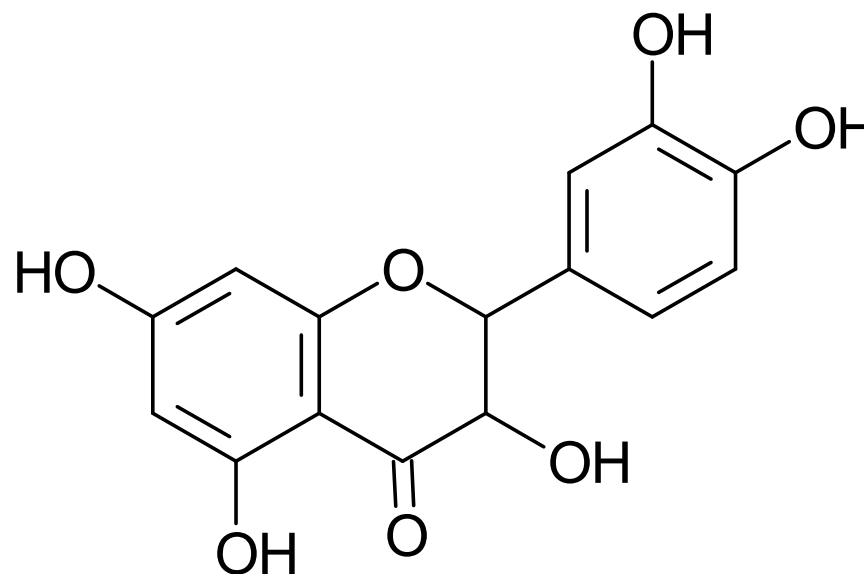
dehydroaskorbová kys.
(oxidovaná forma)

Flavonoidy a ostatní polyfenoly

- Ubikvitárně rozšířené v rostlinách, nejhojnější redukční sloučeniny v naší stravě
- Celkový příjem je cca 1 g (mnohem vyšší než u vitaminů)
- Deriváty chromanu (benzopyranu), obsahují mnoho fenolových hydroxylů
- Hlavní představitel **kvercetin**
- Redukují volné radikály a samy jsou přeměněny na málo reaktivní fenoxylové radikály
- Chelatují ionty kovů (Fe^{2+} , Cu^+) a zabraňují tak jejich účasti ve Fentonově reakci

Hlavní zdroje flavonoidů a jiných polyfenolů

- zelenina (nejvíc cibule)
- ovoce (jablka, citrusy, hrozny)
- zelený čaj, černý čaj
- kakao, čokoláda
- olivový olej (Extra Virgin)
- červené víno

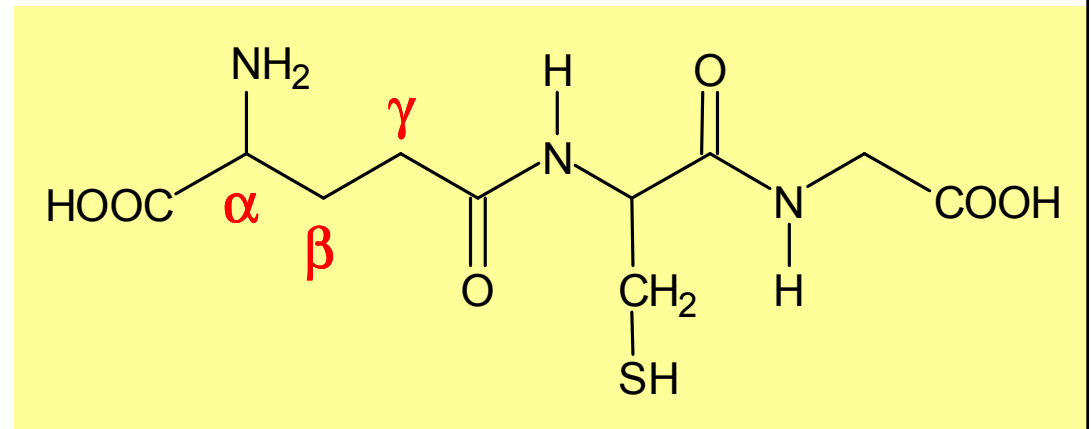


kvercetin



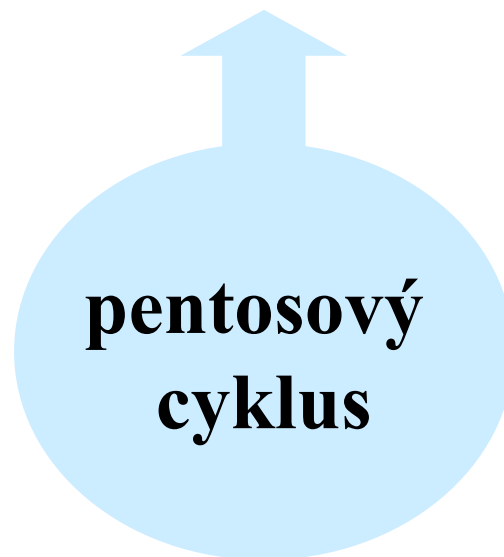
Glutathion (GSH)

- tripeptid
- γ -glutamylcysteinylglycin
- tvoří se ve všech buňkách
- redukční činidlo (-SH)
- redukuje H_2O_2 a ROOH (glutathionperoxidasa)
- redukuje různé kyslíkové radikály
- regeneruje -SH skupiny proteinů a koenzymu A
- podílí se na regeneraci tokoferolu a askorbátu



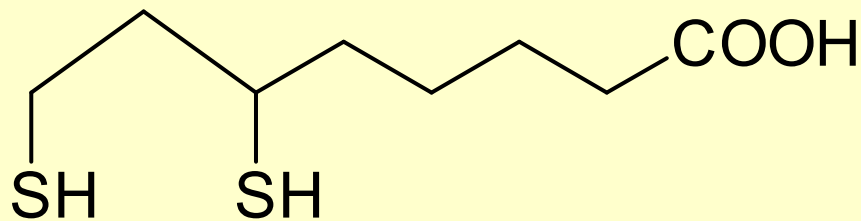
Regenerace redukované formy GSH

- musí být zajištěna plynulá regenerace redukované formy glutathionu (GSH)
- glutathionreduktasa, významná v erytrocytech
- $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{GSH} + \text{NADP}^+$

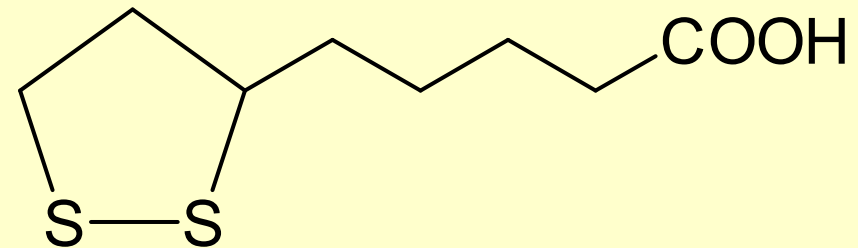


Dihydrolipoát

- kofaktor oxidační dekarboxylace pyruvátu a 2-oxoglutarátu
- redukuje mnoho radikálů (mechanismus není znám)
- podílí se na regeneraci tokoferolu
- terapeutické použití (acidum thiocticum) – diabetické neuropatie



dihydrolipoát
(redukována forma)



lipoát
(oxidovaná forma)

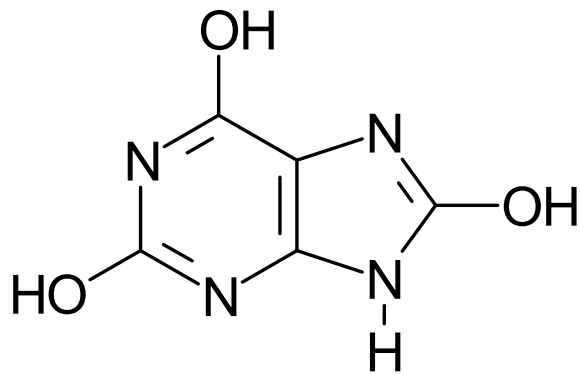
Kyselina močová

- Konečný katabolit purinových bází, dvojsytná kyselina
- V tubulech se z 90 % resorbuje
- **Nejhojnější antioxidant krevní plazmy (150-400 $\mu\text{mol/l}$)**
- Má výrazné redukční účinky, redukuje radikály $\text{RO}\cdot$,
- Váže kationty železa a mědi

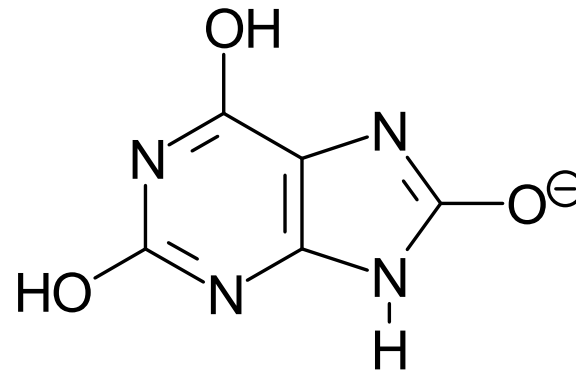
Laktimová forma kys. močové je dvojsytná kyselina

$$pK_{A1} = 5,4$$

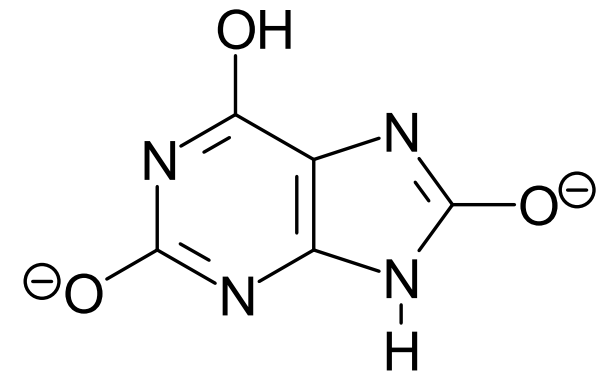
$$pK_{A2} = 10,3$$



kys. močová



hydrogenurát



urát

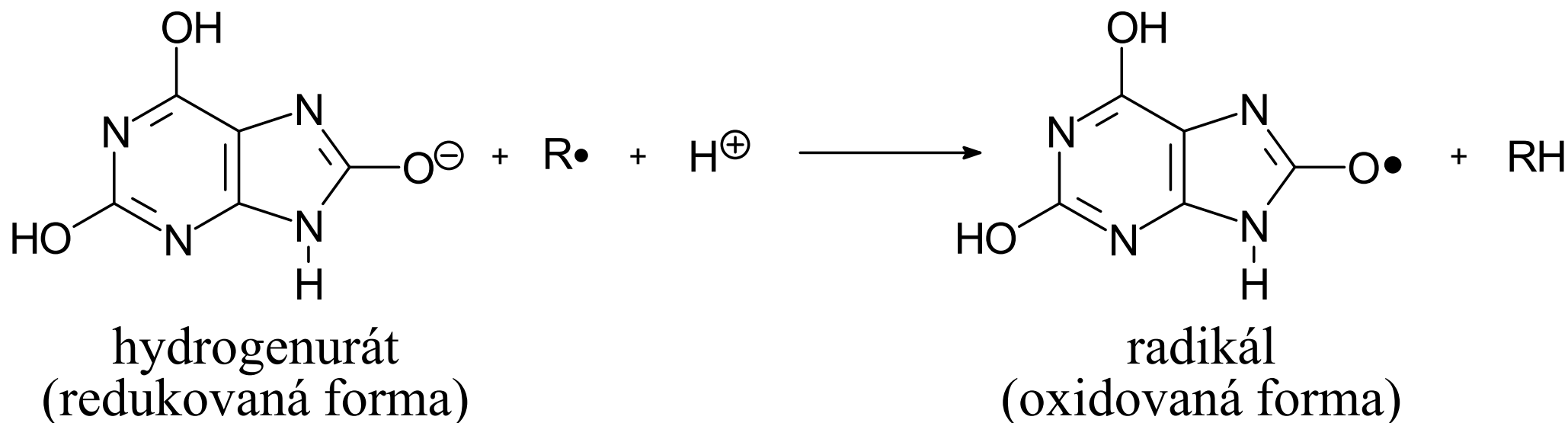
2,6,8-trihydroxypurin

Redukční účinky kyseliny močové

Srovnajte koncentrace v krevní plazmě:

Askorbát: 10 - 100 $\mu\text{mol/l}$

Urát: 200 - 420 $\mu\text{mol/l}$



hydrogenurát odštěpí jeden elektron

$R\cdot$ je např. $\cdot\text{OH}$, superoxid aj.

Různé přeměny