

10 Respirační řetězec, reaktivní formy kyslíku, antioxidanty

Respirační řetězec je více méně **sled oxidačně-redukčních dějů lokalizovaných na vnitřní mitochondriální membráně**, který v buňce probíhá za účelem **zisku energie**. V jeho průběhu jsou odebírány různým látkám vodíky, které jsou v průběhu respiračního řetězce rozštěpeny na protony a elektrony. Elektrony jsou nakonec využity k redukci dikyslíku na **vodu**, protony vytvářejí mezi mitochondriální matrix a mezimembránovým prostorem chemický a elektrický gradient, **jehož energie je využita (především) k syntéze ATP**.

Než se začneme zabývat tím, jak vůbec respirační řetězec funguje, zaměříme se na to, jak probíhá transformace energie v našem organismu, jakými způsoby vůbec může vznikat ATP, kde se v buňce berou redukované kofaktory, podíváme se, které enzymové komplexy se respiračního řetězce účastní a pak snad i zvládneme pochopit, jak to všechno spolu souvisí.

10.1 Transformace energie v buňce

Začneme-li hodně zešíroka, dostaneme se k **první větě termodynamické**, která je **vyjádřením zákona zachování energie**.

$$\Delta U = \Delta W + \Delta Q$$

1. věta termodynamická nám říká, že při jakékoliv změně energie (ΔU) můžeme tuto energii rozdělit na dvě složky:

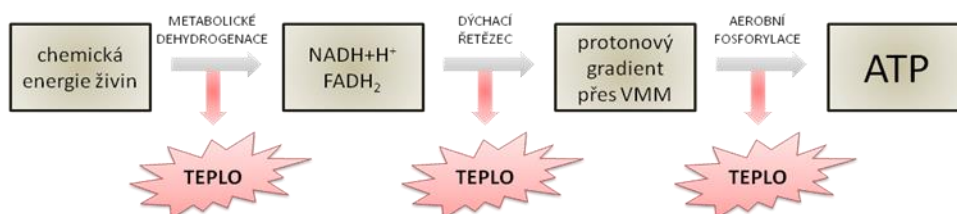
- energii **užitečnou/netepelnou** (ΔW ; práce)
- energii **neužitečnou/tepelnou** (ΔQ ; teplo)

Vztáhneme-li výše popsané na lidský organismus, můžeme říct, že energii přijímáme ve formě **chemické energie živin** (ΔU). Takto získanou energii následně vydáváme **ve formě práce** (ΔW) a **tepla** (ΔQ).

Práce v našem těle zahrnuje:

- **udržování bazálního metabolismu**
- **fyzickou aktivitu** (svalovou práci apod.)
- **tvorbu rezerv** (tuků a glykogenu)

Teplo v našem těle vzniká **při jednotlivých krocích transformace energie** (tj. při předávání energie z jednoho **vysokoenergetického systému** na jiný). Vyjděme ze schématu:



Nejvíce energie mají živiny. Při jejím přenosu mezi jednotlivými systémy (redukované kofaktory, protonový gradient, ATP) se jí vždy **podají část zachytit**, ale **nikdy ne všechnu** – ta část, kterou se zachytit nepodaří, se **uvolní ve formě tepla**.

Uvolněné teplo ale není až tak neužitečné – podílí se na udržování stálé tělesné teploty.

O vzniku některých vysokoenergetických systémů již bylo pojednáno v předchozích kapitolách. Pro přehlednost a úplnost se se vznikem všech z nich setkáme v dalších částech této kapitoly.

10. 2 Vznik ATP v buňce

ATP je **univerzálním zdrojem energie** (v některých starších textech se setkáme s termínem „univerzální energetické platidlo“, který jeho funkci plně vystihuje – buňka jím „platí“ za každou reakci, která by samovolně neproběhla). V buňce může vznikat dvěma hlavními způsoby vzniku:

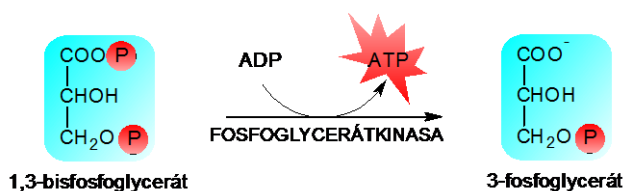
- substrátovou fosforylací** (jen minimální množství ATP)
- oxidativní fosforylací**¹ (asi 95% všeho ATP v buňce)

Substrátová fosforylace

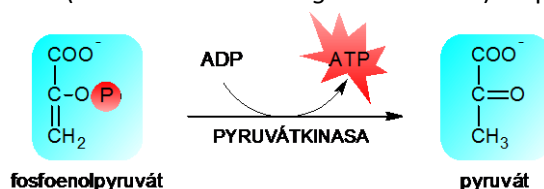
Můžeme se s ní setkat v **glykolýze** (2 reakce) a **citrátovém cyklu** (1 reakce). ATP vzniká tzv. **na úrovni substrátu**, což znamená, že se účastní těchto reakcí jako jeden ze substrátů.

V glykolýze se jedná o:

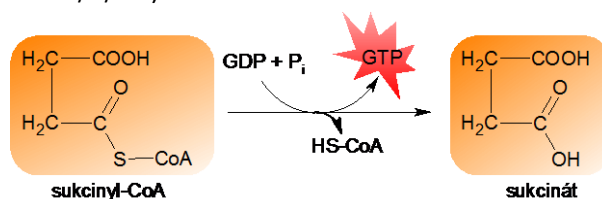
- přeměnu 1,3-bisfosfoglycerátu (*smíšený anhydrid = makroergní sloučenina*) na 3-fosfoglycerát



- přeměnu fosfoenolpyruvátu (*enolester = makroergní sloučenina*) na pyruvát



V citrátovém cyklu se jedná o přeměnu **sukcinyl-CoA** na **sukcinát** (vzniká GTP, které rychle konvertuje na ATP; viz Citrátový cyklus).



Povšimněme si, že v reakcích glykolýzy poskytuje potřebný fosfát a energii pro vznik ATP přímo reagující makroergní látka (1,3-BPG a PEP), zatímco v reakci citrátového cyklu vzniká ATP z ADP a *anorganického fosfátu*, přeměna sukcinyl-CoA na sukcinát poskytuje „pouze“ potřebnou energii.

Oxidativní fosforylace

Probíhá na komplexu ATP-synthasy, o kterém bude pojednáno dále v této kapitole.

10.3 Mitochondrie

Mitochondrie jsou pro respirační řetězec zásadními organelami – **respirační řetězec se odehrává na jejich vnitřní membráně**² – a proto je vhodné o nich něco vědět. Jelikož je tento text určen ke studiu biochemie a ne histologie, zaměříme se na fakty, které jsou důležité pro biochemii.

¹ Kromě substrátové a oxidativní fosforylace existuje ještě samostatně stojící pojem **fosforylace**, který znamená přenos **fosforylové skupiny**; obecně: substrát-OH + ATP → produkt-O-P + ADP

Mitochondrie jsou organely **obalené dvěma membránami – vnější a vnitřní**.

- vnější membrána je hladká a je **velmi propustná**
- vnitřní membrána:
 - je **zbrzděná** (vybíhá v tubuly nebo kristy)
 - **osahuje až 80% proteinů**
 - fosfolipidy obsahuje v menší míře než většina ostatních membrán (nejběžnějším fosfolipidem je, pro mitochondrie typický, **kardiolipin**)
 - pro většinu látek je **nepropustná** (tato nepropustnost je důležitá především v případě **protonů!**)

Mezi oběma membránami se nachází mezimembránový prostor.

Významné je i to, že **mitochondrie mají svou vlastní cirkulární DNA** (říkáme, že se jedná o **semiautonomní organely**), která kóduje část mitochondriálních proteinů, tedy i část proteinů dýchacího řetězce. Zbývající část mitochondriálních proteinů je zakódována v DNA buňky, přičemž „soužití“ mitochondrií a buněk je již tak rozsáhlé, že u některých proteinů, které mají více podjednotek, jsou některé podjednotky kódovány mitochondriální DNA, jiné podjednotky jadernou DNA a až po svém spojení mohou vykonávat danou funkci.

10.4 Vznik redukováných kofaktorů

Redukované kofaktory vznikají při **oxidaci živin** (přesněji při jejich **dehydrogenaci**). V některých případech vznikají v cytosolu, v jiných v mitochondriální matrix... ty, které vznikají v mitochondriální matrix, jsou ihned dostupné pro dýchací řetězec, zatímco ty, které vznikají v cytosolu je potřeba „k dýchacímu řetězci“ (tedy do mitochondrie) dopravit.

A) Vznik NADH+H⁺ v matrix mitochondrie

V matrix mitochondrie probíhá **citrátový cyklus**, **β-oxidace mastných kyselin**, **oxidační dekarboxylace 2-oxokyselin**, **dehydrogenace β-hydroxybutyrátu** (ketolátka) a **dehydrogenační deaminace glutamátu**. Všechny tyto děje poskytují NADH+H⁺, pro větší přehlednost využijeme tabulku.

Tabulka 1 - Vznik NADH+H⁺ v matrix mitochondrie

Proces	Reakce	Enzymy (dehydrogenasy)
CITRÁTOVÝ CYKLUS	isocitrát → 2-oxoglutarát	isocitrátdehydrogenasa
	2-oxoglutarát → sukcinyl-CoA	2-oxoglutarátdehydrogenasa
	malát → oxalacetát	malátdehydrogenasa
OXIDAČNÍ DEKARBOXYLACE 2-OXOKYSELIN	pyruvát → acetyl-CoA	pyruvátdehydrogenasa
	2-oxoglutarát → sukcinyl-CoA	2-oxoglutarátdehydrogenasa
	2-oxokyseliny vzniklé z Val, Leu, Ile	specifické dehydrogenasy
KETOLÁTKY	β-hydroxybutyrát → acetoacetát	hydroxybutyrátdehydrogenasa
DYHYDROGENAČNÍ DEAMINACE	glutamát → 2-oxoglutarát	glutamátdehydrogenasa

B) Vznik NADH+H⁺ v cytosolu

V cytosolu probíhá **glykolýza**, **glukoneogeneze**, případně **dehydrogenace exogenního alkoholu** (etanolu), při které vzniká acetaldehyd (který může být následně opět dehydrogenován enzymem acetaldehyddehydrogenasou za vzniku kyseliny octové).

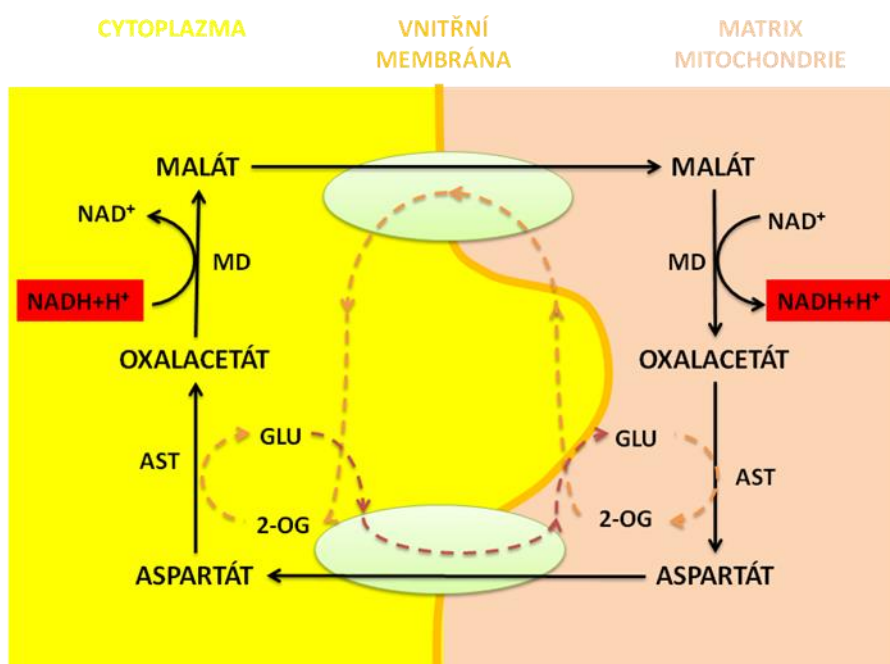
² Buňky, které nemají mitochondrie neprovozují dýchací řetězec (např. erytrocyty získávají energii pouze anaerobní glykolýzou)

Tabulka 2 - Vznik NADH+H⁺ v cytosolu

Proces	Reakce	Enzymy
GLYKOLÝZA	glyceraldehyd-3-P → 1,3-bisP-glycerát	glyceraldehyd-3-P-dehydrogenasa
GLUKONEOGENEZE	laktát → pyruvát	laktátdehydrogenasa
DEHYDROGENACE EtOH	ethanol → acetaldehyd acetaldehyd → kyselina octová	alkoholdehydrogenasa acetaldehyddehydrogenasa

NADH+H⁺ vzniklé v cytoplasmě je potřeba dopravit do mitochondrie. O to se starají **transportní systémy známé jako člunky**. Existují dva hlavní člunkové systémy – **člunek aspartát/malátový** a **glycerolfosfátový**.

Aspartát/malátový člunek – srdce, játra, ledviny (univerzální)



V cytoplasmě³ máme **jeden pool NADH+H⁺/NAD⁺**, v mitochondriální matrix máme **zcela jiný pool NADH+H⁺/NAD⁺** (mezi těmito pooly nedochází k výměně NAD⁺, pouze k výměně vodíků!)

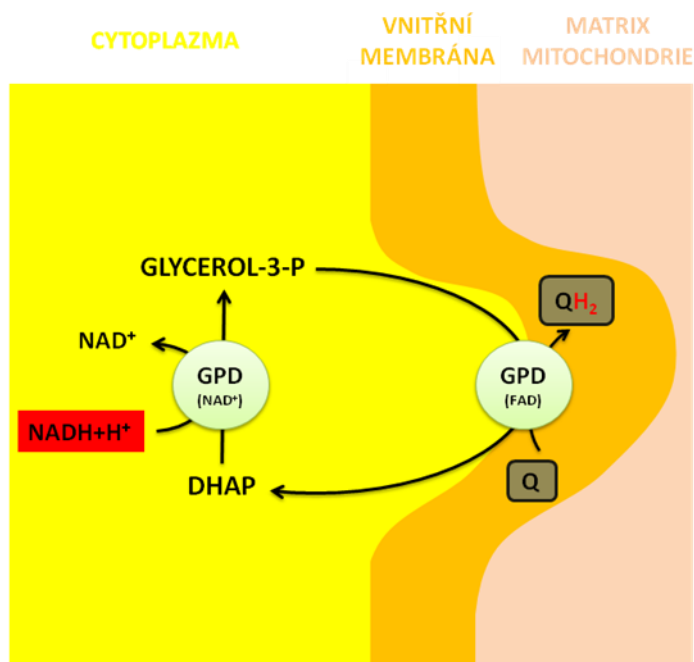
Aspartát/malátový člunek zajišťuje přenos **dvou vodíků** tím, že je „sebere“ NADH+H⁺ v cytosolu a ve formě **malátu** je přenesen do matrix. V matrix nastoupí zcela jiná molekula NAD⁺, která si vodíky „sebere“ z malátu a vytvoří z něj oxalacetát a ze sebe **NADH+H⁺**. Tím byl zajištěn přenos NADH+H⁺ (horní polovina schématu znázorněná černými šipkami).

Nyní je potřeba dostat oxalacetát zpět do cytoplazmy. Proto dochází k **transaminaci** a z oxalacetátu vzniká **aspartát**, který přejde přes membránu a v cytosolu je opět transaminován na oxalacetát. Tím byl zajištěn přenos oxalacetátu (dolní polovina schématu znázorněná černými šipkami).

Činnost celého člunku doplňuje transport **2-oxoglutarátu a glutamátu** (barevné šipky). **Malát** je z cytoplazmy transportován **antiportem s 2-oxoglutarátem** a **aspartát** je zpět do cytoplazmy transportován **antiportem s glutamátem**. Tento systém antiportů zajišťuje kontinuálnost funkce aspartát/malátového člunku.

³ Poznámka: Ve schématu vynecháváme vnější mitochondriální membránu, která je pro dané látky velmi dobře propustná

Glycerolfosfátový člunek – mozek, sval



Glycerolfosfátový člunek je stavěný jednodušeji. Vychází z toho, že **existují dvě formy enzymu GPD (glycerolfosfátdehydrogenasy)** – jedna z nich je spojena s NAD^+ , druhá s FAD , přičemž ta spojená s FAD se nachází na vnitřní mitochondriální membráně.

DHAP (dihydroxyacetonfosfát) si „utrhne“ dva vodíky a z $\text{NADH}+\text{H}^+$ a přemění se na glycerol-3-P. Ten se dostane k mitochondriální membráně, potká se s druhou formou enzymu GPD a ta z něj získané dva vodíky odtrhne a předá je **přímo ubichinonu (Q)**, který se tak přemění na **ubichinol (QH_2)**. Ubichinol je součástí elektron-transportního řetězce, vodíky do něj tedy přímo zapojí.

C) Vznik FADH_2 na vnitřní mitochondriální membráně

Vznik flavinových redukovaných kofaktorů je sice méně významný než vznik $\text{NADH}+\text{H}^+$, ale přesto jej nesmíme opomíjet. Vznik FADH_2 , **kteřé je možné využít v dýchacím řetězci**, je spojen s **vnitřní mitochondriální membránou**.

Flavinové kofaktory jsou na své enzymy napojeny **pevně** (tvoří prostetickou skupinu), což znamená, že je možné využít v dýchacím řetězci jen ty FADH_2 , **kteřé vznikly přímo na vnitřní mitochondriální membráně** (enzymy, na které jsou napojeny, **jsou přímo součástí dýchacího řetězce**). Příklady jsou uvedeny v tabulce:

Tabulka 3 - Vznik FADH_2 na vnitřní mitochondriální membráně

Proces	Reakce	Enzym
β-OXIDACE MK	nasycený acyl-CoA \rightarrow α,β -nenasycený acyl-CoA	acyl-CoA-dehydrogenasa
CITRÁTOVÝ CYKLUS	sukcinát \rightarrow fumarát	sukcinátdehydrogenasa

Rekapitulace kapitol 10.1 – 10.4

Doposud jsme zjistili, jakým způsobem probíhá transformace energie v buňce. Zopakovali jsme, kde a jak vzniká ATP na úrovni substrátu (méně významný způsob vzniku ATP!) a kde se berou redukované kofaktory (případně, jakým způsobem je dostáváme z cytosolu do mitochondriální matrix). Tedy jsme doposud probrali, co se děje **před** vlastním dýchacím řetězcem.

Nyní je čas podívat se na to, které komponenty se účastní dýchacího řetězce a na některé jejich vlastnosti.

10.5 Kofaktory dýchacího řetězce (struktura a funkce)

Jak bylo řečeno na začátku, je dýchací řetězec **soustavou redoxních dějů odehrávajících se na vnitřní mitochondriální membráně**. Začíná oxidací $\text{NADH} + \text{H}^+$ (resp. FADH_2) a končí redukcí kyslíku na vodu.

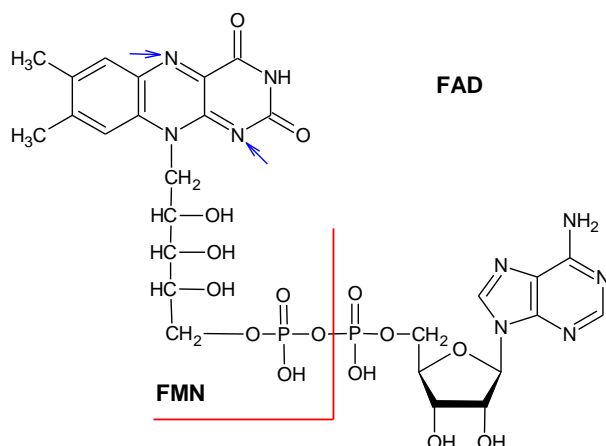
V průběhu respiračního řetězce dochází k **transportu elektronů ve vnitřní mitochondriální membráně**, který je **3x spojen s přenosem protonů přes membránu do mezimembránového prostoru** (čímž se vytváří protonový gradient).

Přenosu elektronů i protonů se účastní 4 enzymové komplexy (*bude probráno dále*), přesněji jejich **kofaktory**. Než se přesně podíváme, jak respirační řetězec probíhá, zaměříme se na jednotlivé kofaktory a pak i enzymové komplexy, načež znalosti o nich spojíme a vytvoříme z nich funkční řetězec.

Kofaktory jsou **čtyř typů**:

- flavinové kofaktory (FMN, FAD)
- nehemové železo a síra (Fe-S)
- ubichinon (koenzym Q)
- hem⁴

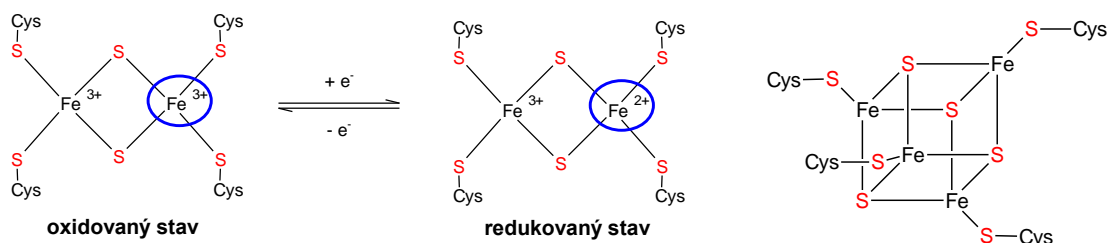
Flavinové kofaktory



Flavinové kofaktory účastníci se dýchacího řetězce jsou dvou typů – **FAD** a **FMN**. Jejich úkolem v dýchacím řetězci je **přenos vodíků** (*vází se na místa označená modrými šipkami*).

Nehemové železo a síra

Nehemové železo a síru najdeme v proteinech v **podobě klastrů Fe_2S_2 nebo Fe_4S_4** .



Struktura klastrů Fe-S:

Železo se v klastrech vyskytuje buď ve stavu **Fe^{3+}** (oxidovaný stav) nebo **Fe^{2+}** (redukovaný stav).

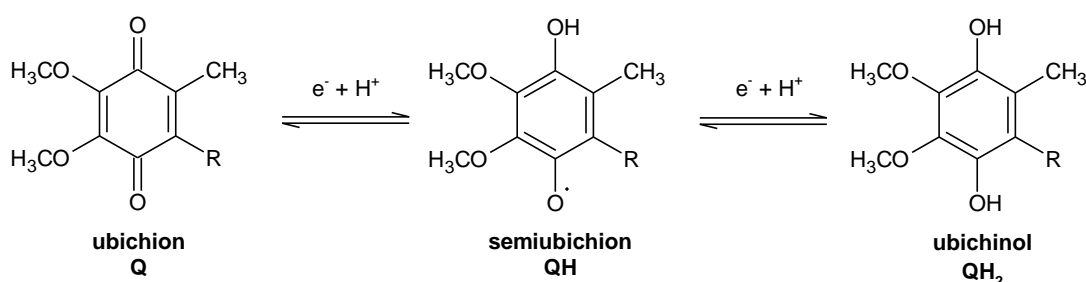
⁴ Pozn. Je nutné rozlišovat hem (cyklický tetrapyrrol; nízkomolekulární látka) a cytochromy (hemové proteiny; vysokomolekulární látky)

Síru rozlišujeme dvou typů: tzv. **anorganickou síru** (též sulfidovou síru) a **organickou síru** (tedy síry –SH skupin cysteinů).

Funkce Fe-S proteinů:

Proteiny se železem a sírou najdeme v dýchacím řetězci v těch místech, kde se **vodíky** (H) štěpí na **protony** (H⁺) a **elektrony** (e⁻), přičemž **železo z těchto proteinů** na sebe **váže vždy jen jeden elektron** (mění se oxidační číslo vždy jen jednoho atomu železa!) a přenáší jej v elektron-transportním řetězci dále.

Koenzym Q (ubichinon)



Koenzym Q je **pohyblivá složka DŘ ve vnitřní mitochondriální membráně** – R ve vzorečku značí **50 uhlíků dlouhý isoprenoidní řetězec**, který zbytku sloučeniny uděluje **lipofilní charakter** a umožňuje mu volně se pohybovat v membráně (tedy mezi jednotlivými komplexy i od jedné strany membrány ke druhé). Díky své volné pohyblivosti **slouží jako přenašeč elektronů** (je schopný přijmout dva e⁻) **mezi komplexy I a III nebo II a III**, a zároveň slouží jako **přenašeč protonů** mezi mitochondriální matrix a mezimembránovým prostorem (podílí se na vzniku protonového gradientu).

Jak přesně probíhá redukce ubichinonu na ubichinol?

Před tím, než přijme jakékoliv protony a elektrony, jedná se o **cyklický diketon** (který není aromatický) označovaný zkratkou **Q** (ubichinon). Následně je mu **předán jeden elektron z některého z enzymových komplexů** (I nebo II). V okamžiku, kdy přijme elektron, chce ale přijmout i proton, pro který si „odpluje od enzymového komplexu k matrix“⁵. Z matrix převezme proton a stane se z něj **semiubichinon (QH)**, což je derivát benzochinonu (má již vytvořený aromatický kruh), který má **charakter radikálu**.

Následně se opět vrátí k některému z enzymových komplexů a převezme od něj **druhý elektron**, načež z matrix si sebere další proton⁶. Tím se plně redukuje na **ubichinol QH₂** (má charakter difenolu) a „odplouvá“ od enzymového komplexu I nebo II, který mu předal elektrony k dalšímu komplexu (III), kterému je má za úkol předat.

Jeho úkolem je ale předat dalšímu komplexu pouze elektrony. Po té, co předá elektron, se ovšem uvolní i proton – ale ne do matrix, ze kterého si ho koenzym Q vzal, ale do mezimembránového prostoru! Tím se koenzym Q podílí na vytváření protonového gradientu.

Poznámka: výše popsaná funkce bude popsána ještě jednou, velmi podobnými slovy, i při popisu průběhu dýchacího řetězce.

⁵ K „odplutí k membráně“ dochází pouze v případě že koenzym Q (QH) „spolupracuje“ s **komplexe I**, v případě že „spolupracuje“ s komplexem II, přejímá protony přímo z něj.

⁶ Viz předchozí poznámka.

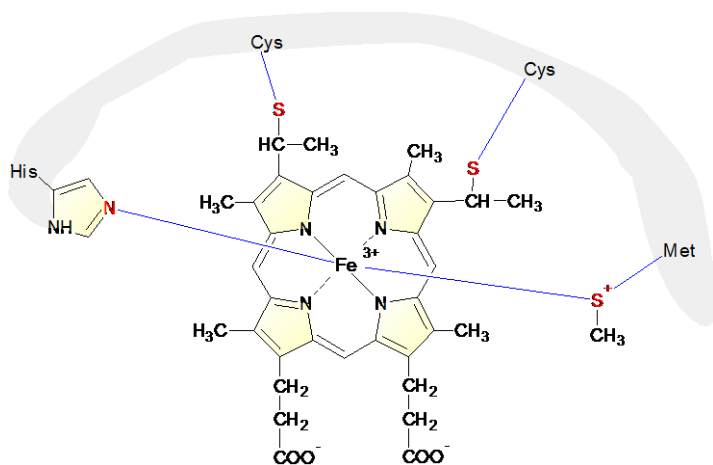
Hemy

Hemy jsou součástí **cytochromů**, vzájemně se od sebe odlišují svými postranními substituenty (jak v počtu substituentů, tak v jejich typu).

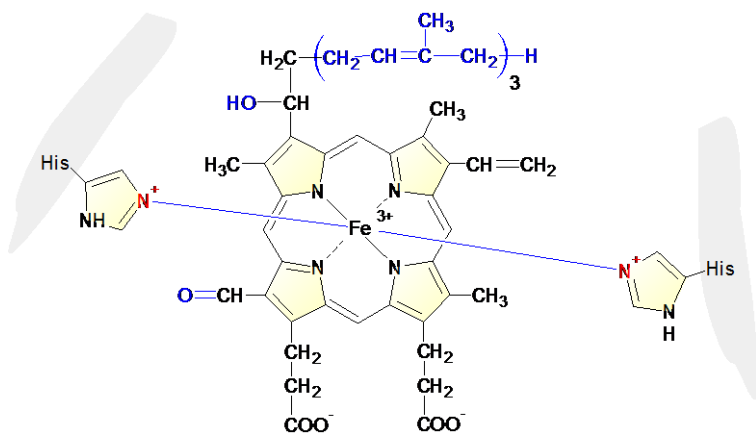
- Hem b (methyl, vinyl, propionát) – jako v hemoglobinu
- Hem c (methyl, ethyl, propionát)
- Hem a (methyl, vinyl, formyl, propionát, polyisopren)

Kromě odlišných substituentů se liší i **bílkovinami**, ve kterých jsou zakotveny. Vliv těchto bílkovin nesmíme opomíjet, protože právě ten **ovlivňuje redoxní potenciál E°** , který je více než důležitý pro zajištění kontinuity přenosu **redukčních ekvivalentů** (tzn. **vodíků**, tzn. **elektronů a protonů**).

Jako příklad si uvedeme uchycení hemu c a hemu a:



Hem c
V bílkovině je uchycen pomocí dvou vazeb na cystein.
Železo je napojeno na histidin (jako u Hb), ale poté i na síru methioninu (zvláštnost).



Hem a
V bílkovině je uchycen pomocí isoprenoidního řetězce a dvou atomů kyslíku.
Železo je napojeno dvakrát na histidin (jako u Hb).

10.6 Redoxní páry dýchacího řetězce

V dýchacím řetězci dochází k postupnému přenosu redukčních ekvivalentů (protonů a elektronů) z $\text{NADH} + \text{H}^+$ až na kyslík. Cestou mezi těmito dvěma strukturami projdou redukční ekvivalenty přes celou řadu jiných struktur, protože kdyby přešly přímo, uvolnilo by se tak velké množství energie, že by buňka zahynula.

To, že je přenos postupný, je zajištěno díky **rozdílným hodnotám redoxního potenciálu E°** . **A proč tomu tak je? Je tím** umožněno využít většinu energie elektronů k vytvoření protonového gradientu (při přenosu elektronů dýchacím řetězcem dochází na některých místech i k přenosu protonů – k tomuto přenosu dodává energii právě přenos elektronů)

Jednotlivé součásti dýchacího řetězce se **liši svou ochotou přijímat elektrony** (a tak se redukovat), jinými slovy – jednotlivé části dýchacího řetězce jsou různě silná **oxidační/redukční činidla**.

Nejsilnějším redukčním činidlem je $\text{NADH} + \text{H}^+$, nejsilnějším oxidačním činidlem je kyslík. $\text{NADH} + \text{H}^+$ tedy nejnáze odevzdá elektrony, kyslík je nejnáze přijme, „ochota“ přijmout elektrony ostatních částí dýchacího řetězce se nachází mezi těmito dvěma komponentami.

Následující tabulka uvádí jednotlivé součásti dýchacího řetězce, seřazené podle hodnoty standardních redoxních potenciálů od nejzápornější hodnoty k hodnotě nejkladnější (tedy ve směru, ve kterém jsou postupně předávány elektrony).

Tabulka 4 - Redoxní páry dýchacího řetězce

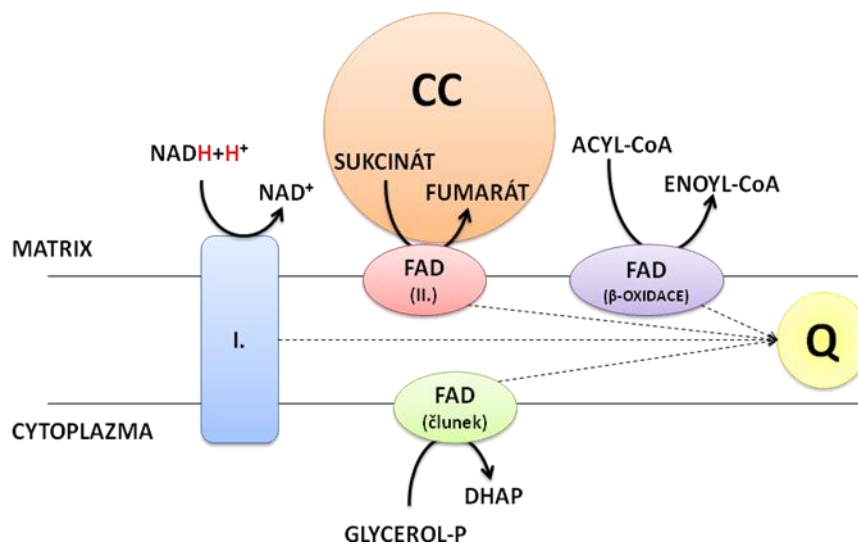
Oxidovaná/redukována forma	E° [V]
$\text{NAD}^+ / \text{NADH} + \text{H}^+$	-0,32
$\text{FAD} / \text{FADH}_2$	0,00
Ubichinon (Q)/ Ubichinol (QH_2)	+0,10
Cytochrom c_1 ($\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$)	+0,22
Cytochrom c ($\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$)	+0,24
Cytochrom a_3 ($\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$)	+0,39
$\text{O}_2 / \text{H}_2\text{O}$	+0,82

10.7 Sběrná místa pro redukční ekvivalenty

Jako redukční ekvivalenty označujeme **vodíky**, které se při průchodu dýchacím řetězcem rozpadají na **elektrony (e^-)** a **protony (H^+)**.

Redukční ekvivalenty jsou do dýchacího řetězce dodávány přes $\text{NADH} + \text{H}^+$, případně FADH_2 , některé protony převezme z cytoplazmy přímo koenzym Q.

Místa, kde redukční ekvivalenty vstupují do DŘ jsou znázorněna na následujícím schématu:



Ke schématu:

- Hlavním vstupem redukční ekvivalentů do DŘ je **komplex I**, na kterém dochází k rozkladu $\text{NADH} + \text{H}^+$ dle rovnice: $\text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NAD}^+ + 2\text{H}^+ + 2e^-$
- Vedlejšími vstupy jsou flavinové kofaktory, tedy **komplex II**, FAD účastníci se citrátového cyklu a FAD účastníci se β -oxidace. Po vzniku FADH_2 , dochází k jeho rozkladu dle rovnice: $\text{FADH}_2 \rightarrow \text{FAD} + 2\text{H}^+ + 2e^-$

10.8 Enzymové komplexy DŘ

Již párkrát v tomto textu padla slova typu komplex I, komplex II apod. Nyní si přesněji vysvětlíme, co znamenala.

V dýchacím řetězci se nacházejí **4 enzymové komplexy** (komplex I – IV). Mezi těmito komplexy dochází k postupnému předávání elektronů (případně protonů):

- z komplexu I na komplex III a odtud na komplex IV
- z komplexu II na komplex III a odtud na komplex IV

Jak vyplývá z výše uvedeného, komplex I a II na sebe nenavazují – jedná se o nezávislé vstupy redukčních ekvivalentů do dýchacího řetězce.

Následující tabulka uvádí **jména jednotlivých komplexů, kofaktory, které se v nich nacházejí a především uvádí i oxidačně-redukční děje, ke kterým na nich dochází!**

Tabulka 5 - Komplexy DŘ

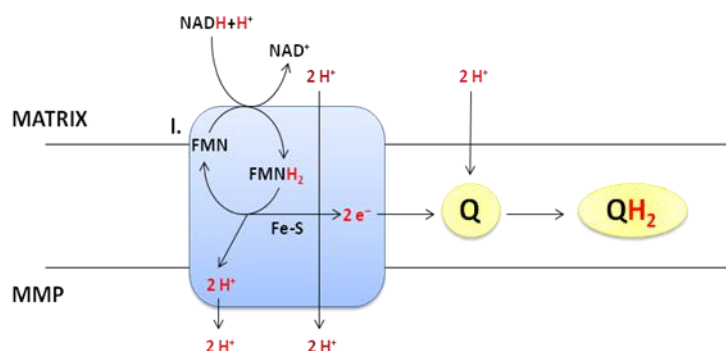
Číslo	Jméno	Kofaktory	Oxidace	Redukce
I	NADH-Q-oxidoreduktasa (NADH-dehydrogenasa)	FMN, Fe-S	$\text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NAD}^+$	$\text{Q} \rightarrow \text{QH}_2$
II	sukcinát-Q-reduktasa	FAD, Fe-S, cyt <i>b</i>	$\text{FADH}_2 \rightarrow \text{FAD}$	$\text{Q} \rightarrow \text{QH}_2$
III	Q-cytochrom-c-reduktasa	Fe-S, cyt <i>b</i> , <i>c</i> ₁	$\text{QH}_2 \rightarrow \text{Q}$	cyt <i>c</i> _{ox} \rightarrow cyt <i>c</i> _{red}
IV	cytochrom-c-oxidasa	cyt <i>a</i> , <i>a</i> ₃ , Cu	cyt <i>c</i> _{red} \rightarrow cyt <i>c</i> _{ox}	$\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$

10.9 Průběh DŘ

V předchozích kapitolách jsme si popisovali jednotlivé součásti DŘ, u některých jsme se zmínili i o jejich funkci. Nyní si všechny komponenty spojíme dohromady a podíváme se na to, jak dýchací řetězce probíhá od začátku do konce.

Komplex I

Na komplexu I dochází k **oxidaci NADH+H⁺** a **redukci ubichinonu** za účasti flavinového kofaktoru (FMN) a Fe-S proteinů. Přitom jsou **translokovány 4 H⁺ z matrix do mezimembránového prostoru** (dále MMP).



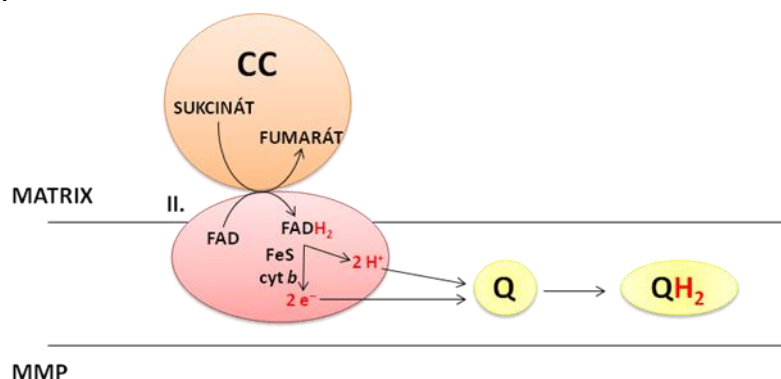
Ke schématu:

NADH+H⁺ předá své **vodíky** na FMN za vzniku FMNH₂. V dalším kroku dojde k rozpadu vodíků na **2H⁺**, které jsou **přeneseny do MMP** a na **2e⁻**, které jsou přes Fe-S protein postupně přeneseny na **koenzym Q**. Energie získaná z přenosu těchto elektronů **navíc poslouží k přenosu dalších 2H⁺ do MMP** (celkem jsou na komplexu I přeneseny **4H⁺**).

Postupný přenos elektronů na **koenzym Q** vypadá následovně: po přijetí prvního elektronu odpluje koenzym Q k matrix, sebere z ní jeden H⁺ za vzniku QH•; QH• převezme druhý elektron, opět odpluje k matrix, sebere z ní druhý H⁺ a vznikne QH₂.

Komplex II

Jak již bylo řečeno, nenavazuje komplex II na komplex I, dochází na něm k oxidaci **flavinového kofaktoru (FAD)** a redukci **ubichinonu**.



Ke schématu:

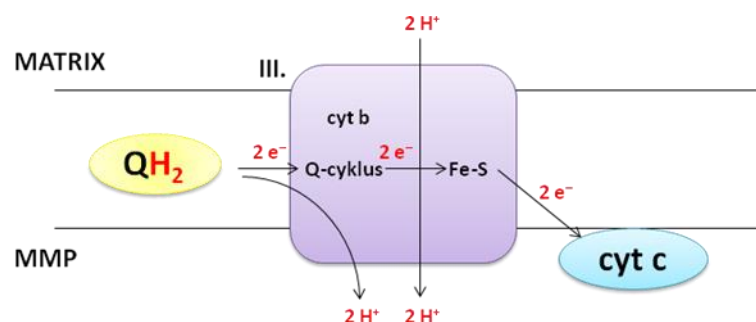
V citrátovém cyklu dojde k dehydrogenaci sukcinátu na fumarát, čímž se na FAD dostanou dva vodíky za vzniku **FADH₂**. V dalším kroku se vodíky rozpadnou na **2H⁺**, které jsou postupně předány na koenzym Q, a na **2e⁻**, které jsou postupně přes Fe-S protein a cytochrom *b*, rovněž předány na koenzym Q.

K redukci koenzymu Q dochází tedy odlišně než u komplexu I – v tomto případě jsou na něj předány jak elektrony, tak protony pocházející z FADH₂.

Z toho vyplývá, že na komplexu II nedochází k přenosu protonů do MMP, což se vy výsledku projeví tím, že **oxidací FADH₂, získáváme méně energie (ATP)**.

Komplex III

Na komplexu III dochází k **oxidaci QH₂** (které jsme získali buď z komplexu I nebo komplexu II) a současné **redukci cytochromu c**. Dochází k přenosu **4H⁺** přes vnitřní mitochondriální membránu do MMP.



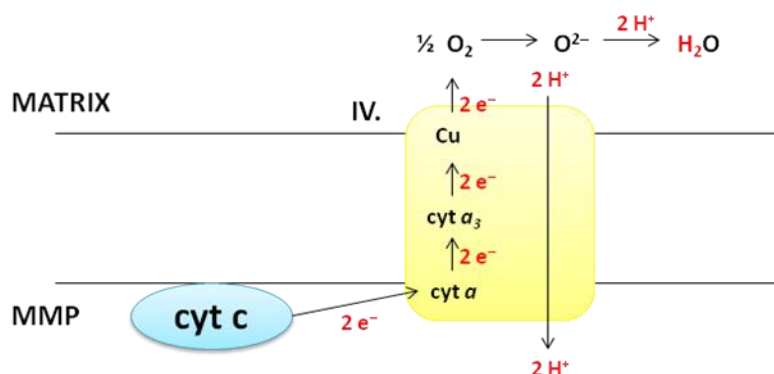
Ke schématu:

QH₂ doplňuje od komplexu I nebo komplexu II ke komplexu III. Zde předá své redukční ekvivalenty (zoxiduje se) k dalším reakcím. **2H⁺** se přenesou do MMP, **2e⁻** projdou přes komplex III až na cytochrom *c*, který zredukují. Při přenosu elektronů dojde ještě k přenosu dalších **2H⁺** přes vnitřní mitochondriální membránu do MMP, celkem se tedy na komplexu III přenášejí **4H⁺**.

Cytochrom *c* obsahuje ve své molekule hem v jehož středu se nachází ion železa Fe³⁺. Po přijetí prvního elektronu dojde k redukci na Fe²⁺. Po té cytochrom *c* odpluje ke komplexu IV (cytochrom *c* je stejně jako ubichinon mobilní element, který není umístěn v membráně, ale na ní), elektron předá (zoxiduje se zpět na Fe³⁺) a vrátí se pro druhý, který přenesou stejným způsobem.

Komplex IV

Na komplexu IV dochází k oxidaci cytochromu c a současně **redukci monokyslíku** pomocí **dvou elektronů** (které jsme na něj doposud přenesli).



Ke schématu:

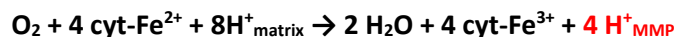
Cytochrom c postupně předal oba elektrony komplexu IV (čímž se sám zoxidoval). Elektrony jsou přes další cytochromy přeneseny až na monokyslík ($\frac{1}{2} O_2$), který reaguje se dvěma protony z matrix za vzniku vody.

Energie přenášených elektronů je využita k transportu $2H^+$ do MMP.

Ve skutečnosti na komplexu IV neprobíhá **dvouelektronová redukce monokyslíku**, ale **čtyřelektronová redukce dikyslíku O_2** . Cytochrom c musí přenést na komplex IV celkem **čtyři elektrony**, které reagují s kyslíkem dle rovnice:



A jelikož při **dvouelektronové** redukci monokyslíku docházelo k přenosu $2H^+$ do MMP, dochází logicky při **čtyřelektronové** redukci dikyslíku k přenosu $4H^+$ do MMP. Kdybychom tento fakt chtěli vyjádřit rovnicí, zapsali bychom ji následovně:



10.10 Protonový gradient (protonmotivní síla)

Ve výše popsaném dýchacím řetězci došlo **tříkrát k přenosu protonů z matrix do MMP**:

- na komplexu I
- na komplexu III
- na komplexu IV

Tímto přenosem protonů se mezi matrix a MMP vytváří **protonový gradient**, též zvaný protonmotivní síla, která má **dvě složky**:

- **složku chemickou** (rozdíl pH; též nazýván složka koncentrační)
- **složku elektrickou** (rozdíl membránových potenciálů)

Postupné vybíjení protonového gradientu je v organismu spojeno s **uvolněním energie**, která je využita na:

- syntézu ATP
- tvorbu tepla (zejména v hnědé tukové tkáni)
- aktivní transport metabolitů přes VMM

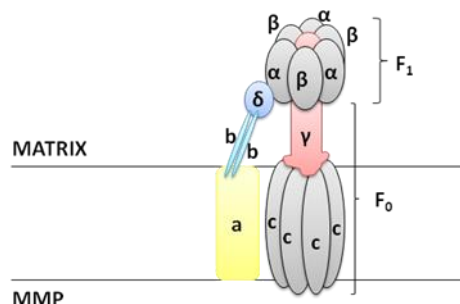
Na jednotlivá využití se nyní podíváme podrobněji.

A) Syntéza ATP

Syntéza ATP probíhá na enzymovém komplexu **zvaném ATP-synthasa**. Jedná se o integrální membránový protein složený z několika částí (*viz dále*), které svým uspořádáním vytvářejí kanál, kterým se **mohou protony vracet z MMP do matrix mitochondrie**. Při tomto návratu „roztácejí“ některé z podjednotek tohoto proteinu, čímž dochází ke vzniku ATP (*podrobněji dále*).

Struktura ATP-synthasy

ATP-synthasa má **tři hlavní části**, všechny složené z několika podjednotek:



Část F₀ je zanořena v membráně a skládá se z **několika jednotek c**, které vytvářejí kanál, na který je napojena **jednotka γ**, tvořící „stopku“. Tyto části jsou **při průchodu protonů roztáčeny!**

Komplex jednotek a, b, b a δ tvoří jakési „kotvící zařízení“ které **brání v rotaci části F₁**.

Část F₁ je tvořena **podjednotkami α a β** (celkem 3x α a 3x β; střídavě). Kvůli „kotvícímu zařízení“ nemůže rotovat, avšak uvnitř ní rotuje „stopka“ tvořená jednotkou γ.

Rotační energie je využita k syntéze ATP.

Jak probíhá syntéza ATP?

V současnosti je zastáván názor, že při **jedné otočce ATP-synthasy vznikají 3 ATP**.

Jedná se o postupný proces, který se odehrává na **podjednotkách α části F₁**. V části F₁ se tyto podjednotky nacházejí celkem tři – **tvoří tedy tři vazebná místa, ne kterých může docházet k syntéze ATP** (*proto vznikají 3 ATP na jednu otočku*).

V průběhu otáčení γ-podjednotky, se **mění konformace těchto vazebných míst**. Vazebná místa mohou zaujmout tři různé konformace:

- první konformace má **vysokou afinitu k ADP a fosfátu** (ADP a fosfát z matrix se do vazebného místa navážou)
- druhá konformace má **vysokou afinitu k ATP**, ale tím, že je ve vazebném místě již napojeno ADP a fosfát, dochází k jejich **spojení dle rovnice: $ADP + P_i \rightarrow ATP^7$**
- třetí konformace nemá afinitu ani k ATP ani k ADP a fosfátu – dochází tedy k **uvolnění vzniklého ATP**

Tím, jak se γ-podjednotka otáčí, mění postupně konformaci jednotlivých vazebných míst, přičemž dále platí, že v jednu chvíli:

- se na jedné α-podjednotce vždy napojuje ADP a fosfát
- se na druhé α-podjednotce vždy tvoří ATP
- se na třetí α-podjednotce vždy uvolňuje ATP

Takto je zajištěna kontinuálnost tvorby ATP.

Platí, že oxidací 1 mol $NADH+H^+$ vznikají 3 mol ATP, z oxidace 1 mol $FADH_2$ pak jen 2 mol ATP^8 .

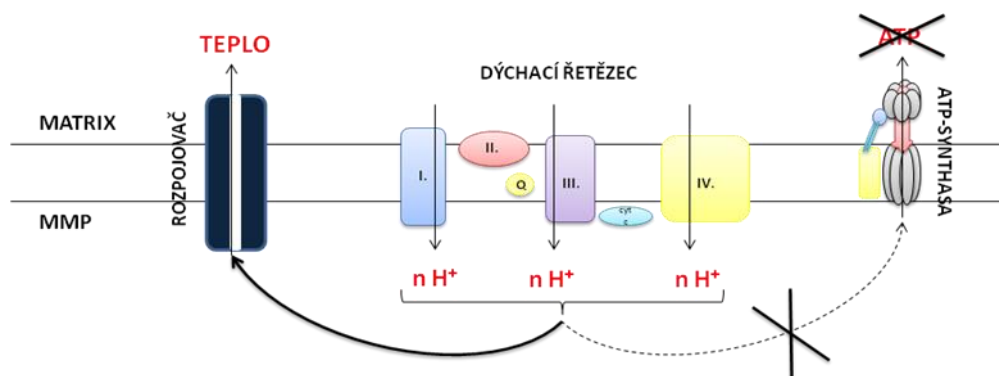
⁷ Dalo by se říci, že ADP a fosfát jsou k sobě „násilně“ přitlačeny a donuceny se spojit

⁸ Nejnovější odhady jsou poněkud skeptičtější a předpokládají, že z 1 mol $NADH+H^+$ vzniká pouze 2,5 mol ATP a z 1 mol $FADH_2$ pak pouze 1,5 mol ATP.

B) Tvorba tepla + rozpojovače

Kromě výše popsaného způsobu tvorby ATP, kdy protony procházejí přes ATP-synthasu a vytvářejí tak energii, existují ve vnitřní mitochondriální membráně i další bílkovinné (i nebílkovinné) struktury, které **umožňují přechod protonů zpět do matrix** a vybíjejí tak protonový gradient, aniž by vznikala energie.

Obecně takovéto látky nazýváme **rozpojovače**, neboť **rozpojují** dva za normálních podmínek úzce související procesy – **dýchací řetězec a aerobní fosforylaci**.



Za normálních podmínek je vnitřní mitochondriální membrána pro protony nepropustná a jedinou cestou, jak vrátit protony zpět do matrix je průchod přes ATP-synthasu. Rozpojovače⁹ vytvářejí ve vnitřní mitochondriální membráně „tunely“, kterými **mohou protony procházet**, přičemž jejich energii se uvolňuje **ve formě tepla**.

Tímto rozpojením **je narušena aerobní fosforylace** (probíhá méně nebo vůbec), avšak **dýchací řetězec** (při kterém vzniká protonový gradient) **není nikterak narušen** a probíhá nadále.

Fyziologickým rozpojovačem je bílkovina **thermogenin**. Jedná se o bílkovinu, která obsahuje kanál pro protony a vyskytuje se ve zvýšené míře v **hnědé tukové tkáni**¹⁰, jejímž úkolem je **tvorba tepla**. V mitochondriích této tkáně probíhá normální DŘ, vytváří se protonový gradient a pomocí thermogeninu je vybíjen za tvorby tepla.

Význam hnědé tukové tkáně je především u **novorozenců** a u **zimních spáčů** (tj. hibernujících zvířat).

Rozpojovače obecně můžeme rozdělit na **pravé a nepravé**.

Pravé rozpojovače jsou takové, které **zároveň vybíjejí obě složky protonmotivní síly** – tedy odčerpávají H^+ (tím vybíjí elektrickou i chemickou složku).

Příkladem pravého rozpojovače je **2,4-dinitrofenol**. Jedná se o velice nebezpečnou látku (smrtelná dávka se pohybuje okolo 1g), po jejímž pozření dochází ke zvýšení tělesné teploty, horečce, pocení a zrychlenému dechu (tělo potřebuje více kyslíku, aby ukojilo rychleji probíhající DŘ, avšak nedostává se mu, i přes veškerou snahu energie, protože protony jsou „bez užitku“ přenášeny přes VMM za vzniku dalšího tepla).

V letech 1920-1930 se užíval v dávce 2,5 mg/kg jako **záračný prostředek na hubnutí** – záračný opravdu byl, lidé po něm hubnuli, ale po té, co jistá část pacientů zemřela, se přestal užívat.

⁹ Obecně lze tedy říci, že rozpojovače jsou látky, které **mají schopnost vázat protony a přecházet přes VMM v protonizovaném i neprotonizovaném stavu**

¹⁰ Hnědá tuková tkáň je hnědá mj. proto, že buňky v ní obsahují mnoho mitochondrií, které obsahují hodně cytochromů, které obsahují hodně hemu (ten je červený, avšak z různých fyzikálních důvodů nám připadá výsledná barva buněk jako hnědá).

Nepravé rozpojovače jsou takové, které **vybíjejí pouze jednu ze složek protonmotivní síly** (přenášejí např. pouze kationty, čímž vybíjejí elektrickou složku).

C) Aktivní přenos látek přes VMM

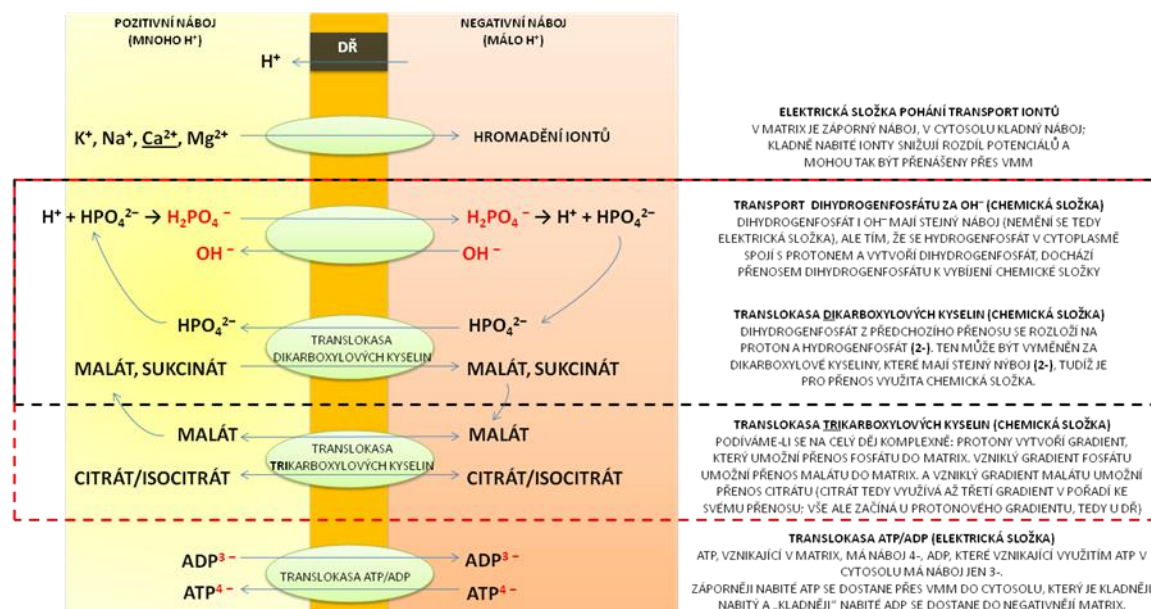
Základní vlastností VMM je, že je **nepropustná pro celou řadu substrátů**.

Jako přes většinu buněčných membrán přes ni projdou **malé nenabitě molekuly** (jako kyslík, oxid uhličitý...). Díky **karnitinu** je možné přes ni transportovat **masné kyseliny** s delším řetězcem (MK s kratším řetězcem procházejí samostatně).

Pro přenos dalších látek se využívá vzniklého **vodíkového gradientu** – substráty jsou přes VMM transportovány systémem **antiportů** (tedy vždy „jde něco dovnitř a něco ven“), případně **symportů** („něco jde spolu s H^+ do matrix), který funguje právě díky protonovému gradientu.

Pro vysvětlení: některé látky jsou transportovány antiportem přímo za H^+ (tedy H^+ se vrátí do matrix a jiná látka se z matrix dostane ven). Tato látka se tudíž hromadí v cytosolu, čímž vzniká její gradient. Tento nově vzniklý gradient může sloužit k přenosu dalších látek (které opět mohou vytvářet gradient, který může být opět použit k vytvoření nového gradientu a tak stále dokola).

Následující schéma uvádí několik příkladů přenosu látek přes VMM:



Jako další příklady bychom mohli uvést:

- **symport** H^+ a pyruvátu
- **antiport** OH^- a pyruvátu
- **aspartát malátový člunek** (do něhož patří i výměna 2-oxoglutarátu za glutamát)

10.11 Inhibitory dýchacího řetězce

V předchozích deseti částech této kapitoly jsme řešili, jak je možné, že dýchací řetězec vůbec funguje a jak je využíván. Je zřejmé, že **je dýchací řetězec pro buňku** (a celý organismus) **velice důležitý** a jakékoliv narušení jeho funkce, může mít fatální následky.

Následující tabulka uvádí přehled vybraných inhibitorů jednotlivých komplexů:

Tabulka 6 - Inhibitory DŘ

Komplex dýchacího řetězce	Inhibitor
KOMPLEX I	BARBITURÁTY
KOMPLEX II	MALONÁT
KOMPLEX III	ANTIMYCIN A, DIMERKAPROL
KOMPLEX IV	H ₂ S, CO, CN ⁻
TRANSPORT ATP/ADP ATP-SYNTHASA ¹¹	ATRAKTYLOSID, KYSELINA BONGKREKOVÁ OLIGOMYCIN

Uvědomme si, že existuje jistý rozdíl mezi působením inhibitorů a rozpojovačů.

Rozpojovače od sebe oddělí dýchací řetězec a syntézu ATP. Tedy působením rozpojovače se sníží tvorba ATP, ale intenzita dýchacího řetězce se nemění (nebo se zvyšuje).

Inhibitory působí na jednotlivé komplexy dýchacího řetězce, respektive na komplexy sloužící pro tvorbu ATP. Inhibujeme-li některý z komplexů DŘ, sníží se jeho intenzita a sníží se tím i intenzita tvorby ATP (děje jsou stále spřaženy!). Inhibujeme-li tvorbu ATP, sníží se produkce ATP, což může zvýšit intenzitu DŘ („buňka si myslí, že má málo ATP, tak urychlí DŘ).

Podrobněji se můžeme zaměřit na případ **otravy kyanidy**

Kyanidové ionty (CN⁻) jsou malé molekuly, které inhibují **cytochrom-c-oxidasu** (komplex III). Do těla se mohou dostat v podobě kyanidu sodného (NaCN) nebo kyanidu draselného (KCN) označovaného též jako **cyankáli** (velmi účinný jed). Tyto látky se vyskytují v běžných laboratorních činidlech, užívají se při galvanizaci, či těžbě zlata, **přírodním zdrojem** je látka **amygdalin** (vyskytující se v hořkých mandlích a peckách meruněk). Letální dávka se pohybuje okolo **250 mg**.

Při otravě začne postižený pociťovat závratě, křeče, začne rychleji dýchat (tělo se snaží zintenzivnit zpomalený dýchací řetězec)... velmi rychle přichází smrt.

Účinek kyanidů se odvíjí od mnoha faktorů – od velikosti dávky, rychlosti podání protijedu, od pH žaludeční šťávy postiženého a též od stáří kyanidu¹².

Při otravě je možné postupovat následovně:

- podáním **hydroxykobalaminu** (naváže na sebe CN⁻ ionty, čímž vznikne **kyanokobalamin** – tedy vitamin B₁₂)
- podáním **dušitanu sodného (natrii nitris, NaNO₂)** vyvoláme **terapeutickou methemoglobinemii** (dušitan sodný zoxiduje železo v hemoglobinu na Fe³⁺; hem, který ve svém středu obsahuje Fe³⁺ **pevně naváže kyanid**, čímž se zabrání inhibici cytochrom-c-oxidasy)
- podáním **thiosíranu sodného (natrii thiosulfas; Na₂S₂O₃)** vyvoláme konjugaci této látky s kyanidovými ionty za vzniku **thiokyanátu**: CN⁻ + S₂O₃²⁻ → SCN⁻ + SO₃²⁻

¹¹ Bavili jsme se o tom, že ATP-synthasa má tři hlavní části. Jedna z částí se jmenovala F₀, přičemž index u písemka f neznamená „nula“, nýbrž „O“, které znamená „oligomycinsenzitivní“.

¹² Stojí-li KCN „na vzduchu“ nebo dlouhou dobu na světle, dochází k reakci KCN + ½ O₂ → KOCN, **čímž vzniká kyanát draselný**. Ten je působením vzdušné vlhkosti přeměněn na **uhličitan amonno-draselný** (dle rovnice KOCN + 2 H₂O → NH₄KCO₃), což je látka s podobnými účinky jako má prášek do pečiva...

10.12 Respirační kontrola

Rychlost respirace je ovlivňována především:

- koncentrací ADP (tedy spotřebou ATP)
- koncentrací kyslíku
- dostatkem živin (redukovaných kofaktorů)
- přítomností inhibitorů

S koncentrací ADP a koncentrací kyslíku souvisí tzv. **P/O kvocient**.

$$\text{P/O kvocient} = \frac{\text{spotřeba } P_i \text{ (nebo ADP)}}{\text{spotřeba } O_2 \text{ (} 2 e^- \text{)}}$$

10.13 Reaktivní formy kyslíku v organismu

Kyslík hraje v našem organismu nezastupitelnou roli především jako **akceptor elektronů v dýchacím řetězci**. Plní ale i další funkce – např. se účastní **hydroxylačních reakcí**. V jiných reakcích mohou vznikat **tzv. reaktivní formy kyslíku**, které mohou být v organismu využity, nebo mu mohou škodit.

Tabulka 7 - Reaktivní formy kyslíku

Radikály	Neutrální molekuly, anionty, kationty
SUPEROXID $\cdot O_2^-$	PEROXID VODÍKU HOOH
HYDROXYLOVÝ RADIKÁL $\cdot OH$	PEROXIDY LIPIDŮ ROOH
PEROXYLOVÝ RADIKÁL $ROO\cdot$	KYSELINA CHLORNÁ HClO
ALKOXYLOVÝ RADIKÁL $RO\cdot$	SINGLETOVÝ KYSLÍK 1O_2
HYDROXYPEROXYLOVÝ RADIKÁL $HOO\cdot$	PEROXYNITRIT $ONOO^-$
OXID DUSNATÝ $NO\cdot$	NITRONIUM NO_2^+

A) SUPEROXIDOVÝ ANION-RADIKÁL $\cdot O_2^-$

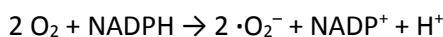
Vzniká při **jednoelektronové**¹³ redukci dikyslíku: $O_2 + e^- \rightarrow \cdot O_2^-$

Název by mohl klamat – **jedná se o poměrně málo reaktivní formu kyslíku**.

V těle vzniká:

➤ při respiračním vzplanutí leukocytů

Respirační vzplanutí je jedna ze strategií, kterými se organismus brání před bakteriemi. Dochází při něm k reakci:

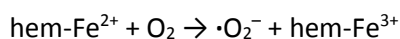


Reakce se účastní enzym **NADPH-OXIDASA**.

➤ při spontánní oxidaci hemoproteinů

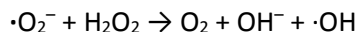
Při této spontánní oxidaci se železo v hemu oxiduje z Fe^{2+} na Fe^{3+} . K této reakci dochází nejčastěji na Hb (vzniká tak metHb, jehož hladina v těle se pohybuje ve fyziologickém rozmezí 0,5-1,5% Hb).

¹³ Při čtyřelektronové redukci dikyslíku v DŘ vzniká voda a při dvouelektronové redukci dikyslíku vzniká peroxid vodíku ($O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$)



B) HYDROXYLOVÝ RADIKÁL¹⁴ ·OH

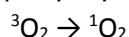
Hydroxylový radikál vzniká ze superoxidového radikálu a jedná se o nejreaktivnější z reaktivních forem kyslíku.



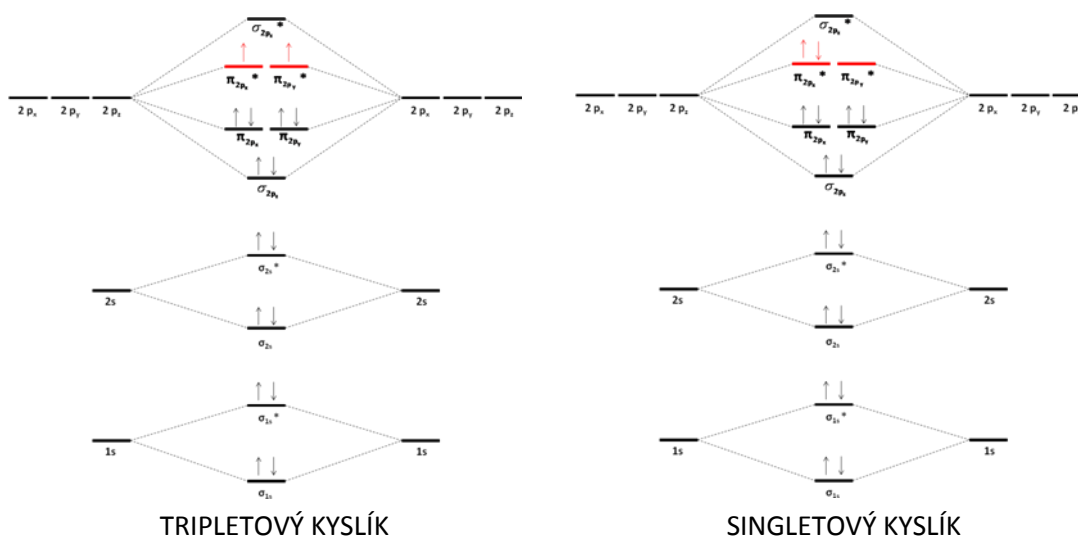
Výše uvedenou reakci katalyzují redukované ionty kovů ($\text{Fe}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$) – nazýváme ji reakcí Fentonovou.

C) SINGLETOVÝ KYSLÍK ¹O₂

Singletový kyslík představuje excitovaný stav tripletového kyslíku (³O₂), ze kterého vzniká po absorpci světla některými pigmenty, např. porfyriny.

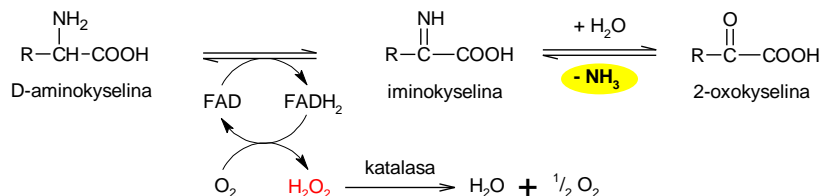


Tripletový a singletový kyslík se od sebe liší svou elektronovou konfigurací:



D) PEROXID VODÍKU

Peroxid vodíku je poměrně nestálá sloučenina, která se velmi snadno rozkládá na vodu a kyslík. V organismu vzniká mj. při deaminaci aminokyselin, které se jí účastní FADH₂, které se regeneruje v přímé reakci s kyslíkem:

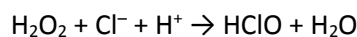


Může vstupovat do Fentonovy reakce, v níž produkuje hydroxylový radikál ·OH, případně může oxidovat –SH skupiny enzymů.

¹⁴ Poznámka ohledně čtení: anion OH⁻ = **hydroxid**; radikál ·OH nebo skupina –OH = **hydroxyl**; v názvech organických sloučenin se používá předpona **hydroxy** (např. 2-hydroxypropan); v názvosloví komplexních sloučenin se používá předpona ligandu OH⁻ **hydroxo**.

E) Kyselina chlorná HClO

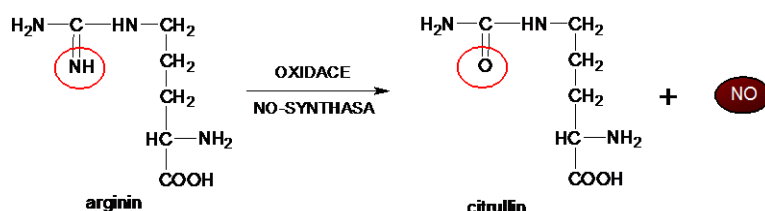
Kyselina chlorná vzniká v **neutrofilních granulocytech** reakcí peroxidu vodíku a **chloridovým aniontem**:



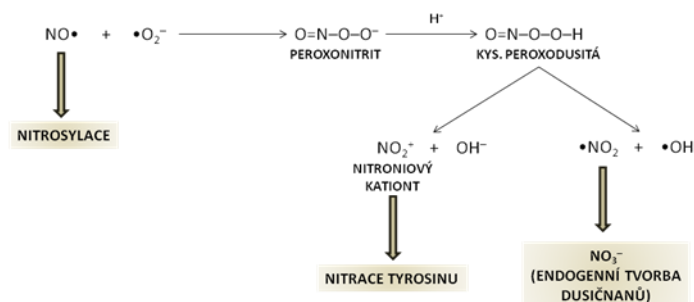
Reakci katalyzuje enzym **myeloperoxidasa**. Vznikající kyselina chlorná má **silné oxidační a baktericidní účinky**.

F) Oxid dusnatý

Oxid dusnatý má **volný elektron** a má proto **charakter radikálu**. Do těla se může dostávat z **vnějších zdrojů**, kterými jsou především léčiva (**vazodilatancia¹⁵**), **fyzilogicky** vzniká z **argininu**:



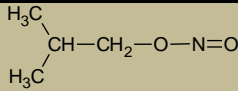
V organismu poskytuje oxid dusnatý další **reaktivní metabolity**:



Oxid dusnatý (NO) může být dále uvolňován z následujících sloučenin:

Vzorec	Název	Poznámky
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{NO}_2 \\ \\ \text{HC}-\text{O}-\text{NO}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{NO}_2 \end{array}$	glycerol-trinitrát (<i>glyceroli trinitras</i>)	Nažloutlá olejovitá kapalina, která se užívá jako vasodilatans (klasické léčivo, působí rychle, užívá se ve formě sublinguálních tablet, spreje, či náplastí)
$\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$	nitroprusid sodný (<i>natrii nitroprussias</i> pentakyanonitrosylželezitanisodný)	Rubínově červené krystaly, extrémně účinný, podává se intravenózně Mj. slouží jako analytické činidlo pro důkaz ketolátek
	isosorbid dinitrát (<i>isosorbidi dinitras</i>)	Působí jako obě předchozí, ale má výhodnější farmaceutické vlastnosti.
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}=\text{O} \\ \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	amyl-nitrit (<i>amylis nitris</i>)	Těkává kapalina → inhalační aplikace

¹⁵ Oxid dusnatý se naváže na **guanylátcyklus**, která iniciuje vznik cyklického camp, který zajistí **relaxaci hladké svaloviny** především cév, ale má i další účinky.



isobutyl-nitrit

Těkavá kapalina, nová droga

ÚČINKY KYSLÍKOVÝCH RADIKÁLŮ

Kyslíkové radikály mají řadu pozitivních účinků:

- jedná se o meziprodukty **oxidasových a oxygenasových reakcí** (cyt-P450), bez nich by tyto reakce nemohly probíhat (navíc jsou během nich vázány na enzymy a tudíž nepoškozují ostatní struktury)
- mají **baktericidní účinek** (respirační vzplanutí fagocytů)
- slouží jako **signální molekuly (první poslové;** jednoznačně je tento fakt prokázán pouze u NO, ale předpokládá se podobné působení ostatních radikálů)

Každé pozitivum má i svá negativa, stejně tak i kyslíkové radikály mají své negativní účinky:

- **poškozují PUFA** (ničí dvojné vazby, vznikají aldehydy a ROO•, což se projeví jako změna propustnosti membrán a může dojít i k poškození membránových enzymů)
- **poškozují proteiny** (způsobují agregaci, síťování, fragmentaci, štěpení; modifikují –SH skupiny a fenylové skupiny...to se projeví ve změně aktivity enzymů, v případě membránových proteinů dochází ke vstupu Ca²⁺ do buněk)
- **poškozují DNA** (štěpí deoxyribosu, modifikují báze a lámou řetězce...to se projeví jako mutace, translační chyby a inhibici proteosyntézy)

Jelikož, jak bylo uvedeno, jsou kyslíkové radikály velice škodlivé, je potřeba, aby se v organismu vyskytovaly určité **obrané systémy**, které se pokusí jejich vzniku předcházet, případně omezovat negativní následky jejich působení. Takovéto systémy existují a zajišťují je některé **enzymy** a **antioxidanty**, o kterých pojedná poslední část této kapitoly.

10.14 Antioxidační systémy organismu

Obecně můžeme antioxidační systémy rozdělit:

A) Enzymy (endogenní původ)

- superoxiddismutasa
- katalasa
- glutathionperoxidasa

B) Vysokomolekulární antioxidanty (endogenní původ)

- transferrin
 - ferritin
 - ceruloplazmin
- } vážou volné ionty kovů

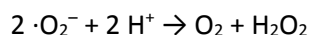
C) Nízkomolekulární antioxidanty (endogenní i exogenní původ)

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

Na vybrané skupiny (a příklady) antioxidačních systémů se nyní podíváme podrobněji.

SUPEROXIDDISMUTASA

Enzym obsažený v každé buňce, je vývojově (fylogeneticky) velice starý. Katalyzuje **disputaci superoxidu**:



Vidíme, že v reakci dochází k **disputaci** – superoxidový anion s **oxidačním číslem $-\frac{1}{2}$** se oxiduje na **kyslík** s **oxidačním číslem nula** a zároveň **se redukuje** na **peroxid** s **oxidačním číslem minus jedna**.

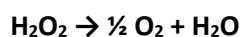
Známe dvě izoformy enzymu superoxidodisutasy (SOD):

- SOD1 (obsahuje Cu a Zn; nachází se v cytosolu)
- SOD2 (obsahuje Mn, nachází se v mitochondriích)

KATALASA A GLUTATHIONPEROXIDASA

Oba uvedené enzymy mají společné to, že **rozkládají peroxid vodíku**, glutathionperoxidasa je ale univerzálnější a likviduje nejen peroxid vodíku (H-O-O-H), ale i hydroperoxydy lipidy (R-O-O-H), což katalasa neumí.

Katalasa se vyskytuje v **erythrocytech** a **provádí disproportionaci H_2O_2 na vodu a kyslík**:



Glutathionperoxidasa je enzym obsahující ve své molekule **selenocystein**. Do reakce odstranění peroxidů zapojuje **glutathion** (G-SH) následujícími způsoby:

- redukce peroxidu vodíku: $2 \text{G-SH} + \text{H-O-O-H} \rightarrow \text{G-S-S-G} + 2 \text{H}_2\text{O}$
- redukce hydroperoxidů: $2 \text{G-SH} + \text{R-O-O-H} \rightarrow \text{G-S-S-G} + \text{R-OH} + \text{H}_2\text{O}$

VYSOKOMOLEKULÁRNÍ ANTIOXIDANTY

V přehledu na začátku kapitoly byly uvedeny enzymy jako transferrin, ferritin a ceruloplazmin. Jejich hlavní úlohou je **vazba a přenos** (případně **skladování**) volných **iontů kovů**.

Antioxidační působení spočívá v **prevenci**: vychytáním volných iontů omezují průběh např. Fentonovy reakce a tím brání vzniku radikálů.

NÍZKOMOLEKULÁRNÍ ANTIOXIDANTY

Nízkomolekulární antioxidanty můžeme rozdělit podle rozpustnosti na **lipofilní** a **hydrofilní**.

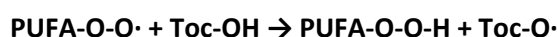
Mezi **lipofilní** antioxidanty řadíme **tokoferol, karoteny** (lykopen, lutein...) a **ubichinol***.

Mezi **hydrofilní** antioxidanty řadíme **L-askorbát, flavonoidy, dihydrolipoát*, glutathion*, kyselinu močovou***¹⁶.

Tokoferol

Díky své lipofilnosti je tokoferol důležitým antioxidantem **buněčných membrán a lipoproteinů**. Redukuje peroxylové radikály fosfolipidů na hydroperoxydy, které jsou dále redukovány pomocí GSH.

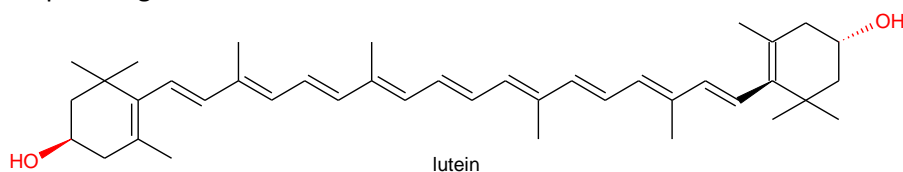
Ve své molekule obsahuje fenolový hydroxyl, jehož vodík je využit ke stabilizaci (např.) peroxylového radikálu, přičemž tokoferol samotný se přeměňuje na radikál, který je ale velmi stabilní a tudíž neškodný:



¹⁶ Všechny látky označení „*“ vznikají v těle a jsou tedy **endogenního původu**.

Xanthofily

Xanthofily jsou **kyslíkaté deriváty karotenoidů**, které se vyskytují především v **zelené listové zelenině**. Hlavním zástupcem je **lutein**, který se mj. nachází ve **žluté skvrně (macula lutea)**, kterou chrání před degenerací.



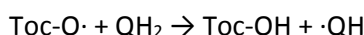
Ubichinol (QH₂)

Ubichinol se vyskytuje ve všech membránách (ve zvýšené míře ve vnitřní mitochondriální membráně, kde plní funkci přenašeče elektronů).

Naše tělo si jej umí samo syntetizovat s pomocí střevní mikroflóry z **tyrosinu** a **farnesyldifosfátu** (ten vzniká **při biosyntéze cholesterolu**).

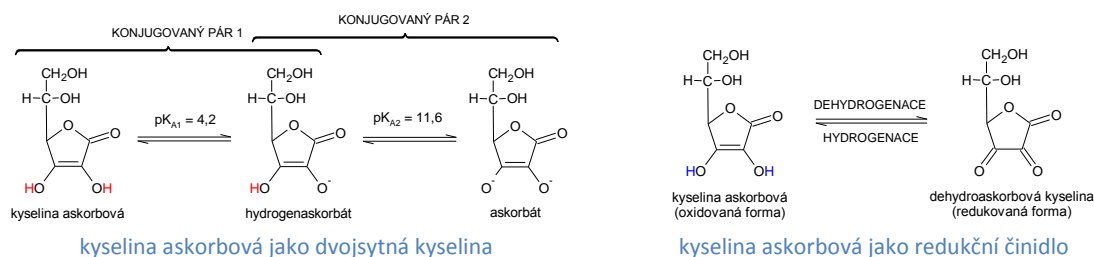
Zdroji v potravě jsou **klíčkový olej, játra a maso**.

QH₂ se podobně jako askorbát účastní **regenerace tokoferolu**:



L-askorbát (vitamin C)

Kyselina askorbová obsahuje ve své molekule enolové hydroxyly. Do reakcí v těle může vstupovat buď jako **dvojsytná kyselina** (může disociovat do dvou stupňů), nebo jako **redukční činidlo**.



Kyselina askorbová se v těle účastní několika důležitých reakcí:

- **hydroxylace prolinu při syntéze kolagenu** (působí jako kofaktor)
- **hydroxylace dopaminu na noradrenalin** (působí jako kofaktor-reduktant)
- působí jako **silné redukční činidlo**, redukuje např. železitě (Fe³⁺ → Fe²⁺) a měďnaté ionty (Cu²⁺ → Cu⁺)
- **redukuje radikály** ·OH, ·O₂⁻, HO₂·, ROO· a další
- **regeneruje** radikál tokoferolu

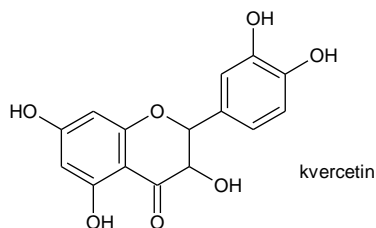
Další roli hraje při **vstřebávání železa** z potravy.

Kromě výše uvedených výhod má askorbová kyselina i svou nevýhodu – **odbourává se na oxalát**, což může vést ke vzniku kamenů a **v nadbytku má prooxidační účinky**.

Flavonoidy a další polyfenoly

Ubikvitárně rozšířeny v rostlinách, v naší stravě se jedná o **nejzastoupenější redukční sloučeniny**. Během dne přijmeme cca 1g, především ze **zeleniny (cibule)**, **ovoce (jablka, citrusy, hrozny)**, **čaje (zeleného a černého)**, **kakaa, čokolády, olivového oleje a červeného vína**.

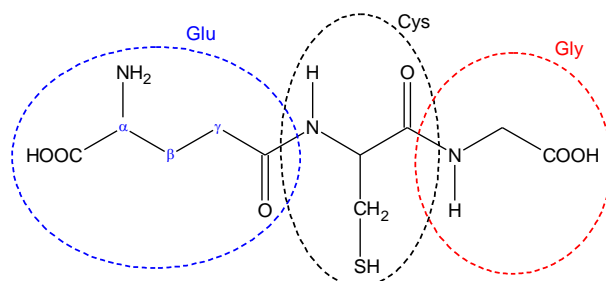
Jedná se o **deriváty chromanu (benzopyranu)**, které obsahují **mnoho fenolových hydroxylů**. Hlavní představitelem této skupiny je **kvercetin**.



Jejich úkolem je **redukovat volné radikály**, přičemž v reakcích se přeměňují na málo škodlivé **fenoxylové radikály**. Kromě toho mohou **nelatovat ionty kovů** (Fe^{2+} a Cu^+), čímž zabraňují jejich účasti ve Fentonově reakci.

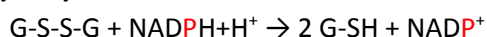
Glutathion (GSH)

Glutathion je **tripeptid**, systematickým názvem **γ -glutamylcysteinylglycin**.



Tvoří se ve všech buňkách, kde pak působí jako **redukční činidlo** (obsahuje $-\text{SH}$ skupinu). Je schopný redukovat H-O-O-H i R-O-O-H (s pomocí **glutathionperoxidasy**). Kromě toho je schopen redukovat různé kyslíkové radikály a **regeneruje $-\text{SH}$ skupiny jiných látek** (především **proteinů a koenzymu A**), **tokoferol** a **askorbát**.

Sám je regenerován reakcí s glutathionreduktasou, které jako kofaktor slouží **$\text{NADPH}+\text{H}^+$** . Velký význam má tato reakce v **erytrocytech**:

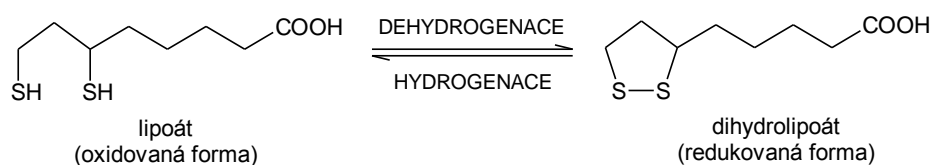


Zdrojem $\text{NADPH}+\text{H}^+$ pro regeneraci glutathionu je **pentosový cyklus** (případně reakce jablečného enzymu).

Dihydrolipoát

Dihydrolipoát je **málo prozkoumanou látkou**. Víme, že působí jako kofaktor v **oxidační dekarboxylaci pyruvátu a 2-oxoglutarátu** a víme, že redukuje mnoho radikálů. U odbourávání radikálů však neznáme přesný mechanismus reakce. Podílí se též na regeneraci tokoferolu.

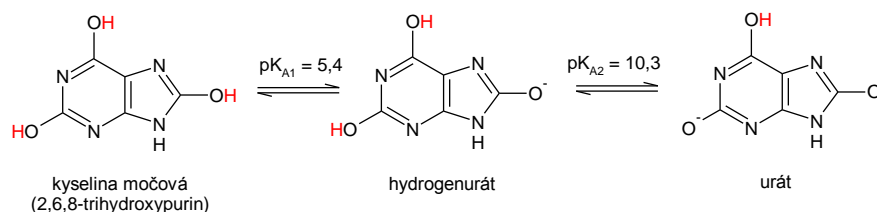
Využívá se v medicíně jako **acidum thiocticum** (diabetické neuropatie).



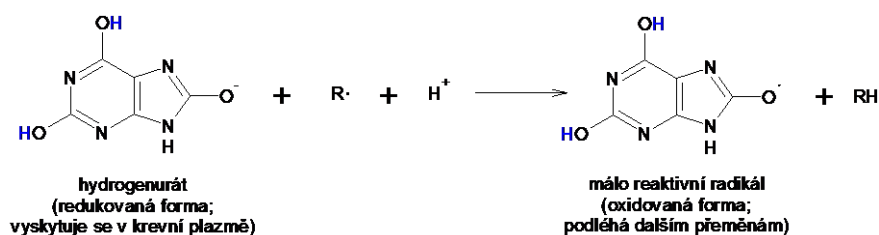
Kyselina močová

Jedná se o dvojsytnou kyselinu, která má výrazné redukční účinky (redukuje např. radikály RO·), váže na sebe kationty železa a mědi.

Stejně jako na askorbát musíme i na močovou kyselinu nahlížet jako na kyselinu a jako na redukční činidlo:



kyselina močová jako kyselina



redukční účinky kyseliny močové¹⁸

Kyselina močová vzniká jako **konečný katabolit purinových bází** (z 90% se v ledvinných tubulech resorbuje) a tvoří **hlavní antioxidant krevní plazmy (150-400 μmol/l)**.

¹⁸ Kyselina močová odštěpí jeden elektron, který reaguje s protonem (H⁺) a radikálem (R·) a vzniká RH. Jako radikál si můžeme představit ·OH, superoxid a jiné.