

1. Biologické oxidace.
Účinky volných radikálů na organismy.
Lipoperoxidace, antioxidanty.

2. Xenobiotika a jejich účinky na
organismus. Detoxikace,
mechanismus.

Oxidační stres

- Oxidační stres vzniká při velkém nahromadění vznikajících reaktivních forem **kyslíku/dusíku**, kdy organizmus není schopen je likvidovat.
- Oxidační stres **poškozuje buňky** (zejména buněčné membrány, proteiny), enzymy, genetický materiál a přispívá ke vzniku infekčních i degenerativních onemocnění.
- Přisuzuje se mu role při vzniku např. **aterosklerózy, cukrovky, nádorových onemocnění, degenerativních nervových onemocnění, stárnutí** aj.
- Nemají jen nepříznivý účinek - pod dozorem bílých krvinek slouží k **zabíjení bakterií, parazitů, virů, nádorových buněk...**

Volné radikály

Jakákoliv molekula/atom schopná samostatné existence, který obsahuje 1/více nespárovaných elektronů

Atom: proton, neutron, elektronový obal (orbital)

Radikál: obsahuje volný **nepárový** elektron v zevním orbitalu (může to být atom i molekula, neutrál či ion)

-homolytické štěpení kovalentní vazby (energeticky náročné, není časté v biolog. systémech)

- redukci, oxidace

- většina biomolekul **nejsou** radikály

Radikálová reakce

Radikál: snaha o spárování elektronů,
většinou značná reaktivita

Obecně tři stadia

- iniciace
- propagace
- terminace

Reaktivní formy kyslíku a dusíku

- Souhrnné označení pro volné radikály a některé neradikálové sloučeniny (RONS)
- významné fyziologické funkce v organismu
- Za určitých podmínek toxické
- Přeměny katalyzovány ionty přechodných kovů
 - Fentonova reakce: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \dots \text{HO}\cdot + \text{HO}^- + \text{Fe}^{3+}$
 - Regenerace Fe^{2+} : $\text{O}_2^- \dots$
 - Haber-weissova reakce
 - Přechodné kovy: první řada d-prvků má nepárové elektrony a lze je tedy považovat za volné radikály, kromě Zn
- Nejvýznamnější **Fe, Cu, Mn a Zn**
- v organismu vázány v depončních formách, inaktivní, **Transferrin, ferritin, ceruloplasmin**

ROS (reactive oxygen species)

volné radikály

superoxid, $O_2^{\cdot -}$
hydroxylový radikál,
 OH^{\cdot}
peroxyl, ROO^{\cdot}
alkoxyl, RO^{\cdot}
hydroperoxyl, HO_2^{\cdot}

nejsou volnými radikály

peroxid vodíku, H_2O_2
(Fentonova reakce)
kyselina chlorná, $HClO$
ozon, O_3
singletový kyslík, 1O_2

RNS (reactive nitrogen species)

volné radikály

oxid dusnatý, $\text{NO} \cdot$

oxid dusičitý, $\text{NO}_2 \cdot$

nejsou volnými radikály

nitrosyl, NO^+

kyselina dusitá, HONO

oxid dusitý, N_2O_3

oxid dusičitý, N_2O_4

peroxynitrit, ONOO^-

alkylperoxinitrit, ROONO

kyselina chlorná, HOCl

Chloran ClO^-

Vznik volných radikálů

UV záření

Ionizační
záření

Kouření

Metabolismus

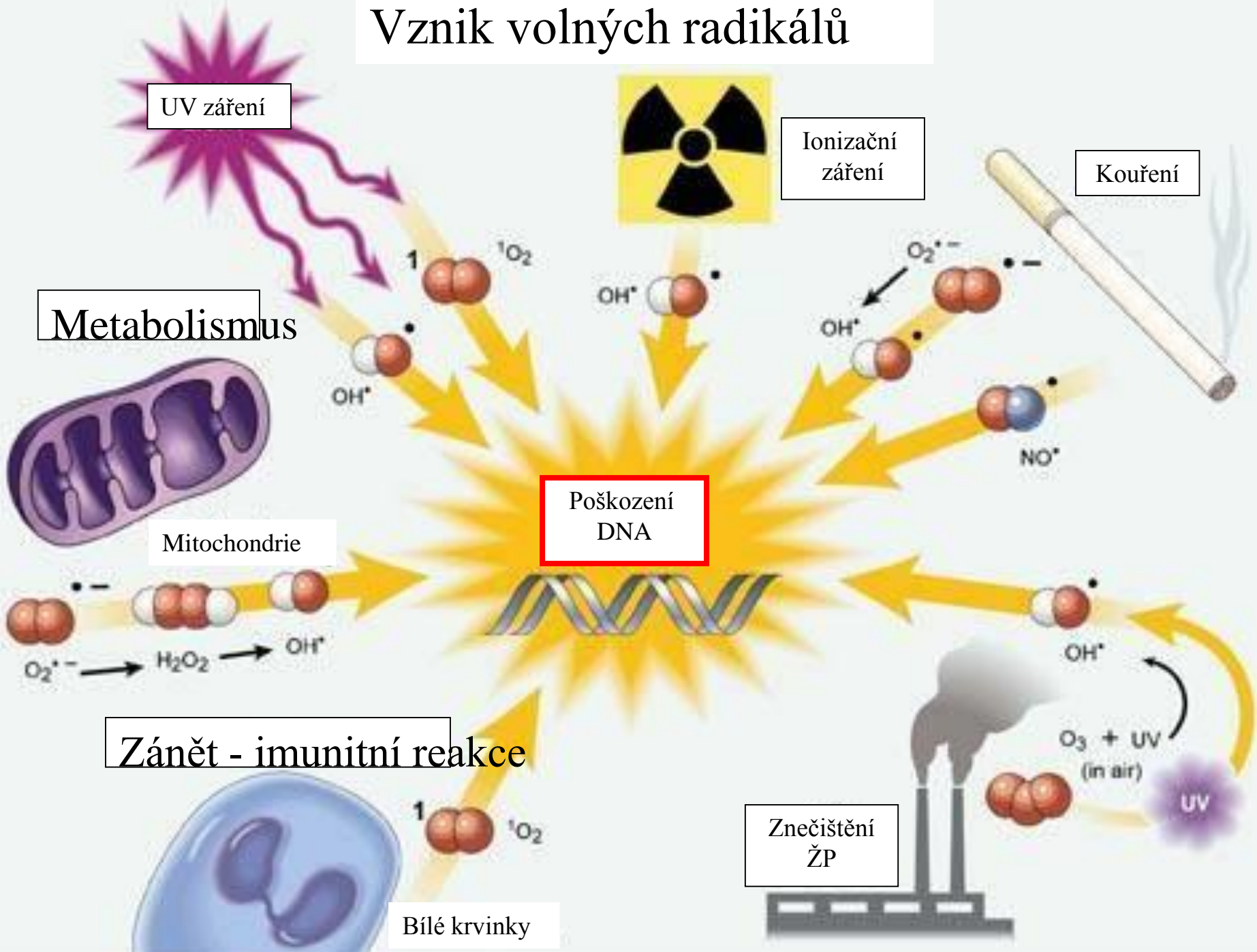
Poškození
DNA

Mitochondrie

Zánět - imunitní reakce

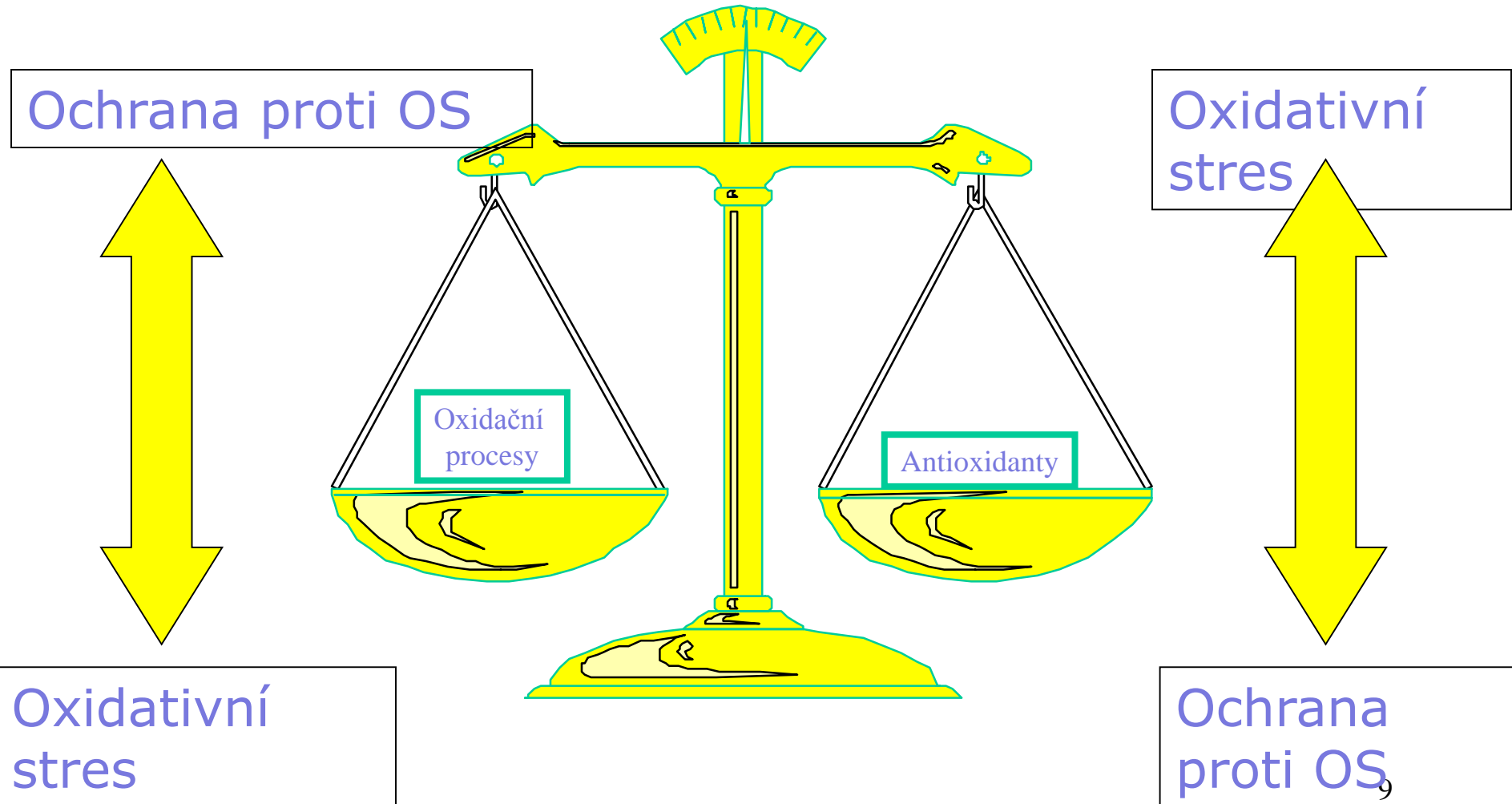
Znečištění
ŽP

Bílé krvinky



Oxidativní stres

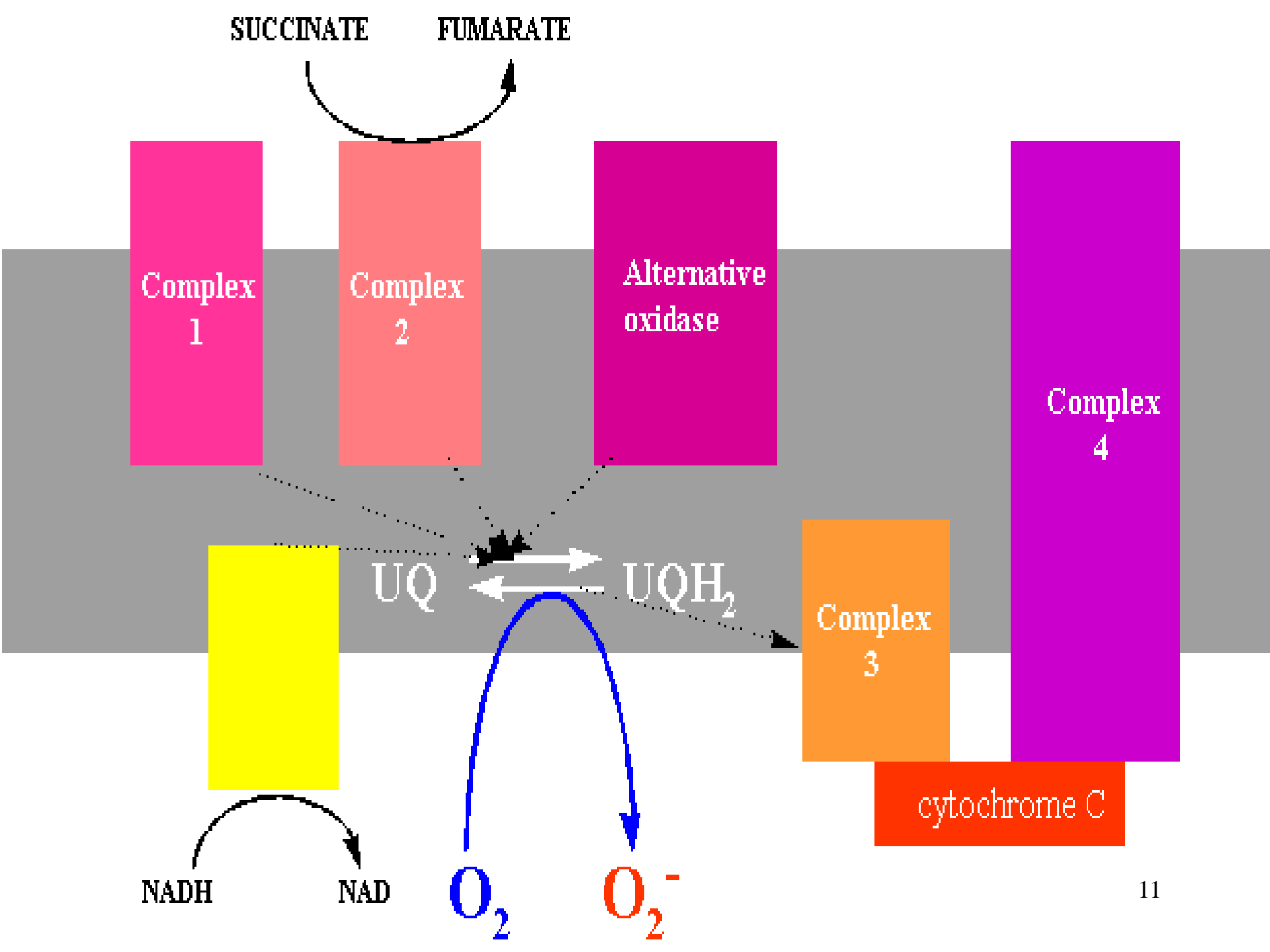
- antioxidační procesy nestačí eliminovat nadbytek volných radikálů



Odkud se volné radikály berou?

hlavní producenti ROS : membránově vázané enzymy popř. koenzymy flavinové struktury, hemové koenzymy, enzymy s Cu v aktivním centru

1. *respirační řetězec mitochondrií* : především superoxid a následně H_2O_2
- cca 1- 4% O_2 vstupujícího do resp. řetězce (**hlavně komplexy I a III**)



Odkud se volné radikály berou?

2. *endoplazmatické retikulum*

vznik superoxidu (cytochrom P- 450)

3. *specializované buňky* (leukocyty, makrofágy)

produkce superoxidu NADP-oxidase

4. *oxidace hemoglobinu na methemoglobin*

(erytrocyt je „nabit“ antioxidanty)

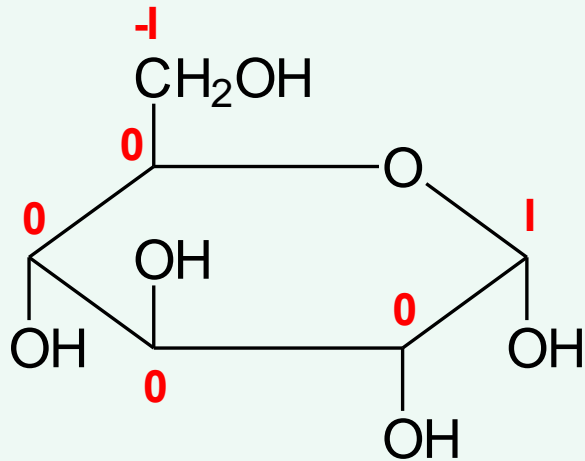
Dýchací řetězec

~

Reaktivní formy kyslíku

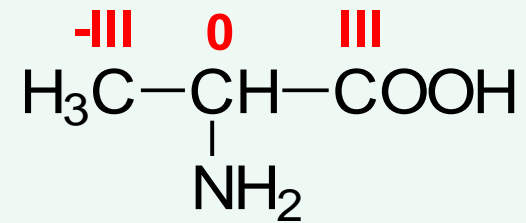
Živiny jsou redukované formy uhlíku

protože v nich převažují nízká oxidační čísla uhlíku



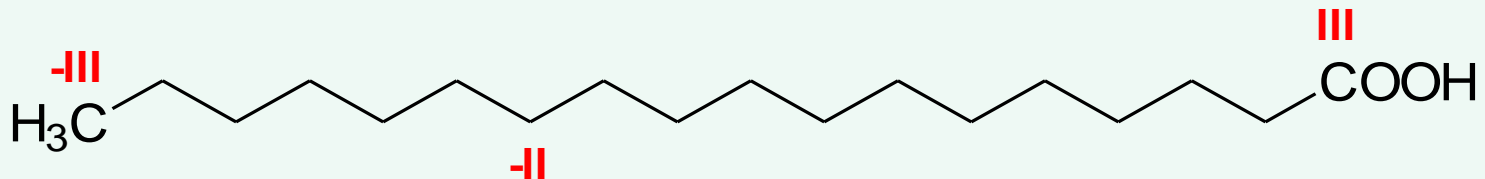
glukosa: 6,7 % H

Průměrné ox.č. C = 0,0



alanin: 7,9 % H

Průměrné ox. č. C = 0,0



stearová kyselina: 12,8 % H

Průměrné ox. č. C = -1,8 \Rightarrow uhlík je nejvíce redukovaný

Dva způsoby vzniku ATP v buňce

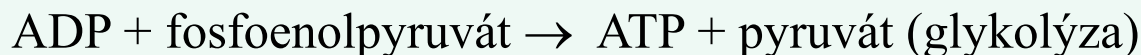
95 % ATP vzniká **aerobní fosforylací (za přítomnosti O₂):**



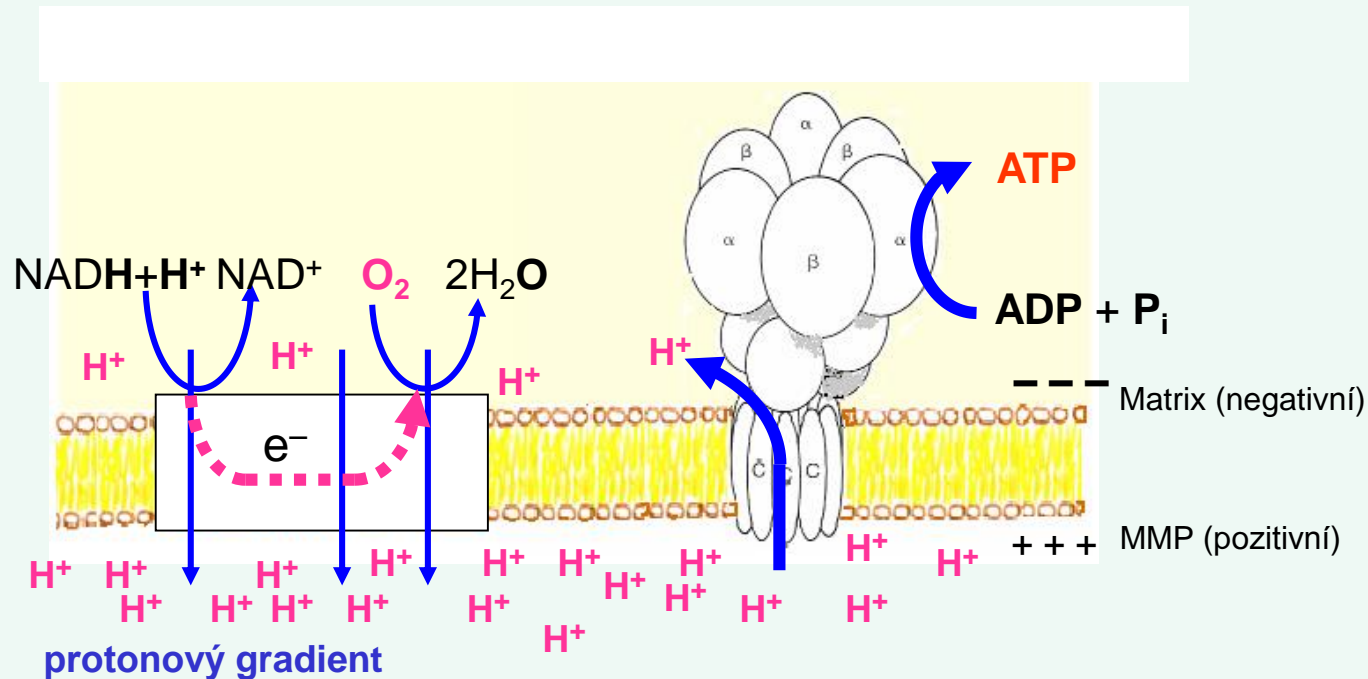
5 % vzniká **substrátovou fosforylací:**



vyšší / srovnatelný energetický obsah jako ATP



DŘ je soustava redoxních dějů ve vnitřní mitochondriální membráně, která začíná oxidací NADH a končí redukcí O_2 na vodu.



Transfer elektronů ve vnitřní mitochondriální membráně je spojen s transferem protonů přes membránu do mezimembránového prostoru. Protonový gradient je využit na syntézu ATP.

Komponenty dýchacího řetězce

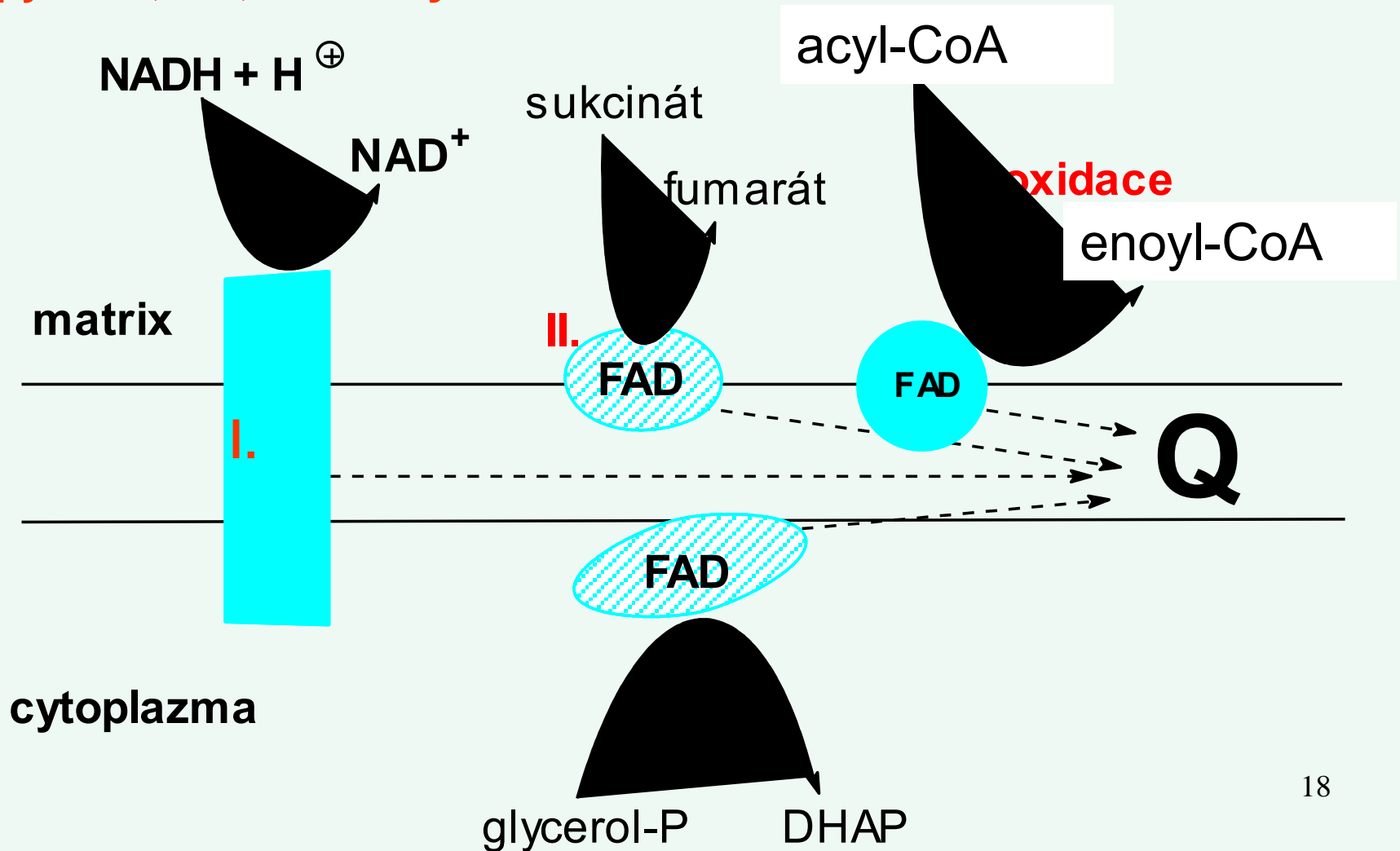
- substráty (NADH+H⁺, FADH₂)
- enzymové komplexy (I – IV)
- kofaktory vázané na enzymy komplexů (FMN, FAD, Fe-S, hem)
- samostatné složky mezi komplexy (ubichinon, cytochrom *c*)

Rozlišujte:

hem (cyklický tetrapyrrol chelatující iont Fe) × cytochrom (hemový protein)

Sběrná místa pro redukční ekvivalenty

pyruvát, CC, ketolátky



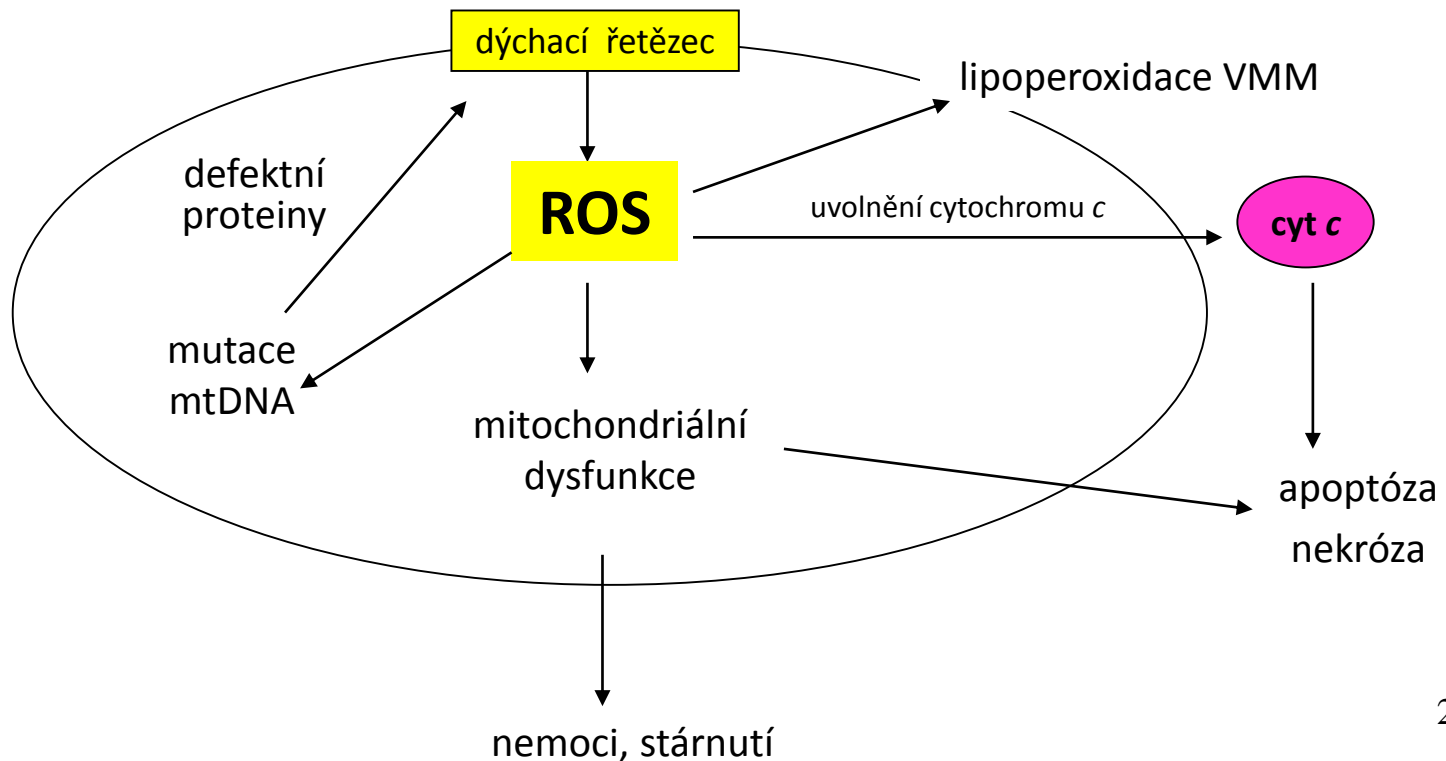
Enzymové komplexy v DŘ

	Název	Kofaktory	Oxidace	Redukce
I.	NADH-Q oxidoreduktasa*	FMN, Fe-S	$\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}^+$	$\text{Q} \rightarrow \text{QH}_2$
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- <i>c</i> -reduktasa	Fe-S, cyt <i>b</i> , <i>c</i> ₁	$\text{QH}_2 \rightarrow \text{Q}$	$\text{cyt } c_{\text{ox}} \rightarrow \text{cyt } c_{\text{red}}$
IV.	cytochrom- <i>c</i> -oxidasa	cyt <i>a</i> , <i>a</i> ₃ , Cu	$\text{cyt } c_{\text{red}} \rightarrow \text{cyt } c_{\text{ox}}$	$\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$

* také zvaný NADH dehydrogenasa

Mitochondrie a oxidační stres

- cca 98 % O₂ je spotřebováno v DŘ (cytochrom-c-oxidasa)
- kromě vody vznikají také reaktivní formy kyslíku (ROS, reactive oxygen species)
- hlavním zdrojem ROS jsou komplexy I a III (vzniká superoxid)
- produkce superoxidu se zvýší pokud se tok elektronů v DŘ zpomalí n. otočí
- mitochondrie obsahují řadu antioxidantů (GSH, QH₂, superoxididismutasa)



Mitochondrie a apoptosa

- apoptóza je kontrolovaný proces zániku buňky s minimální odezvou na okolní tkáň,
- apoptóza je významná pro přirozenou obnovu tkání
- regulační proteiny apoptózy tvoří rodinu Bcl-2 (B-cell lymphoma 2),
- některé jsou anti-apoptotické (Bcl-xl), jiné pro-apoptotické (Bax, Bak)
- Bax a Bak proteiny oligomerují a vytvoří pór v zevní mitochondriální membráně,
- cytochrom c se uvolní do cytosolu, naváže se na neaktivní kaspásy a další proapoptotické faktory – vytvoří se **apoptosom** – a tím se spustí exekuční fáze apoptosy (kaspasová kaskáda)

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 $\text{HOO}\cdot$	Peroxynitrit ONOO^-
Oxid dusnatý $\text{NO}\cdot$	Nitronium NO_2^+

* Deriváty fosfolipidů během lipoperoxidace: PUFA-OO \cdot , PUFA-OOH

Hydroxylový radikál HO·

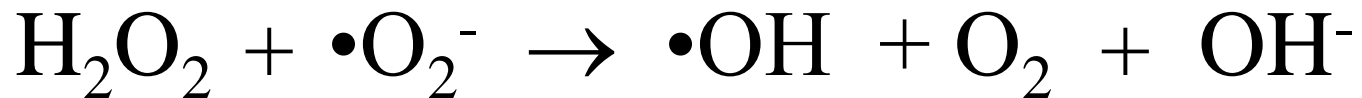
- Nejreaktivnější volný radikál, reaguje okamžitě s molekulami v místě vzniku
- Reaguje se všemi molekulami přítomnými v živých organizmech
- Extrémně silné oxidační činidlo
- Vznik: Fentonova reakce, homolytické štěpení vazby O-O v H₂O₂, ionizačním zářením, reakci HOCl s O₂^{-.}, ultrazvukem, při lithotripsii a lyofilizaci

Vysoce reaktivní hydroxylový radikál

•OH vzniká Fentonovou reakcí

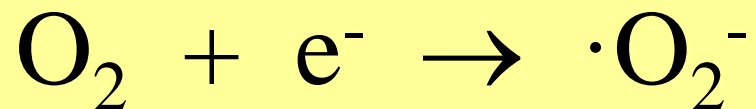


nebo z peroxidu vodíku a superoxidu, za katalýzy Fe^{2+} ionty:



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

- vzniká jednoelektronovou redukcí dikyslíku
- relativně málo reaktivní
- působí jako oxidační a redukční činidlo (redukce cytoch. C x oxidace askorbátu)
- Přímé poškození biomolekul vysoce selektivní
- Nepřímé usnadňuje vznik HO.
- Tvorba peroxynitrili po reakci s NO.



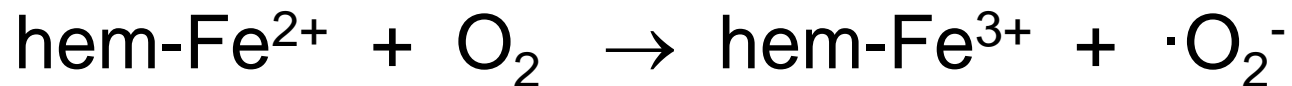
[toto není reakce, pouze jeden redoxní pár]

Vznik superoxidu v organismu

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



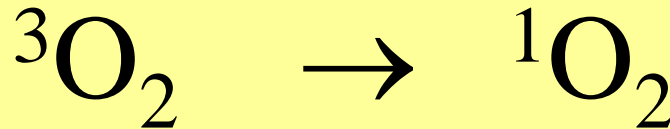
- **spontánní oxidace hemoproteinů**



[toto jsou reakce, tedy kombinace dvou redoxních párů]

Singletový kyslík $^1\text{O}_2$

- excitovaný stav tripletového dikyslíku, molekulový O_2 s spárovanými spiny, reaktivnější než běžný O_2 ,
- vzniká při fotochemických reakcích, mj. po absorpci světla některými pigmenty (porfyriny)
- Způsobuje biologické poškození (poškození sítnice, porfyrie)
- Léčba novorozenecké žloutenky, psoriázy

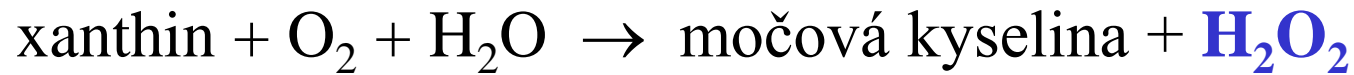
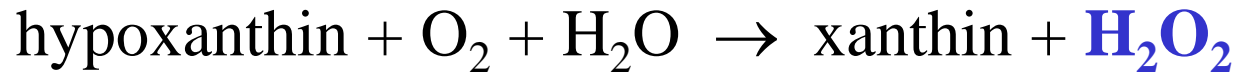


- Interakce s jinými molekulami
- Chemické reakce (vznik hydroperoxidů, endoperoxidů z látek s jednou či více dvojných vazeb/konjugovaných systémů)
- Vznik karbonylových sloučenin z tryptofanu
- Přenos excitační energie (quenching, zhášení)

Peroxid vodíku H_2O_2

- *in vitro* poměrně nestálá sloučenina, snadno se rozkládá se na vodu a kyslík
- v organismu vzniká při deaminaci AK/aminů
- také při xathinoxidasové reakci
- dvouelektronová redukce O_2
- může oxidovat -SH skupiny enzymů, produkovat hydroxylový radikál aj.
- Málo reaktivní, ve vysokých koncentracích toxický

Xanthinoxidasa produkuje peroxid vodíku



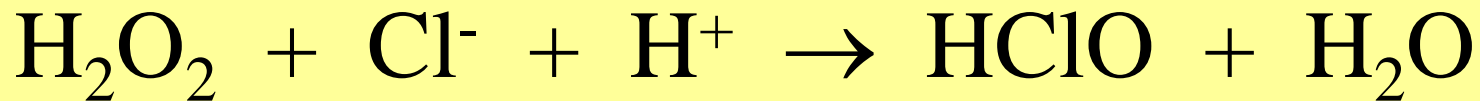
většina tkání, hlavně játra

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

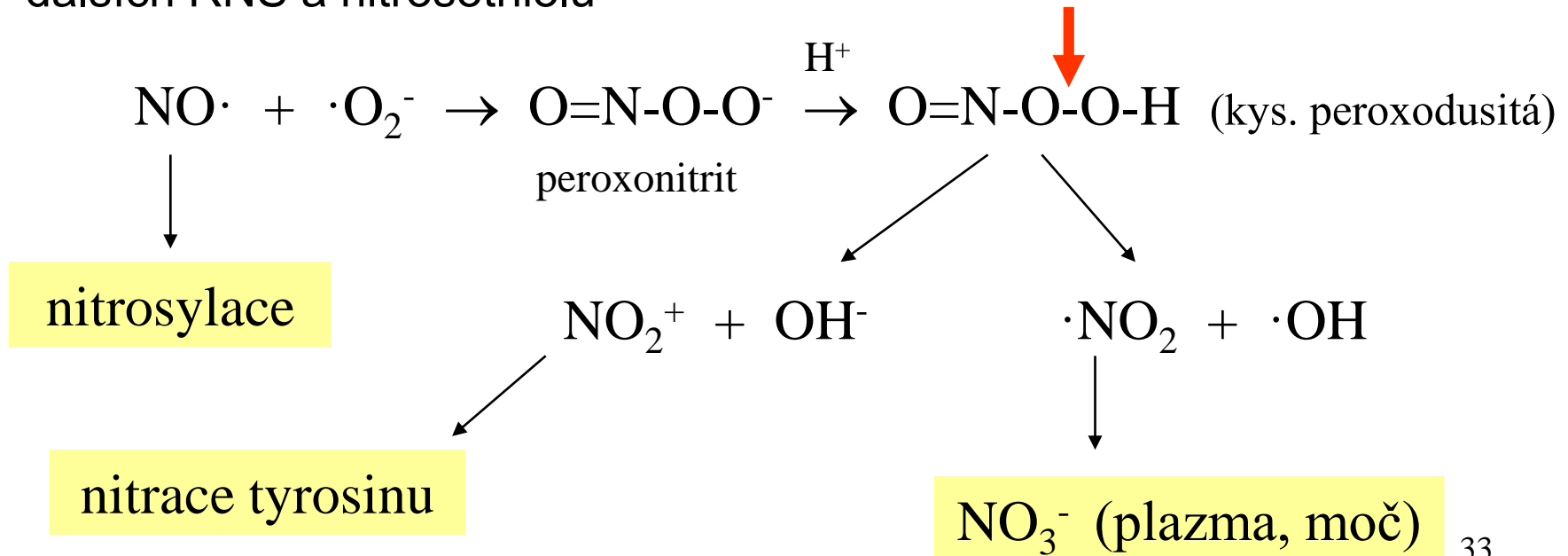


- Poškození biomolekul:
- Poškození proteinů (převádí Met na Met sulfoxid, Chlorace Tyr za vzniku 3-chlortyrosinu, poškození -SH skupin membrán. Proteinů
- Chlorace bazí DNA (hlavně pyrimidinů)
- Oxidace thiolů, askorbátu a NADPH

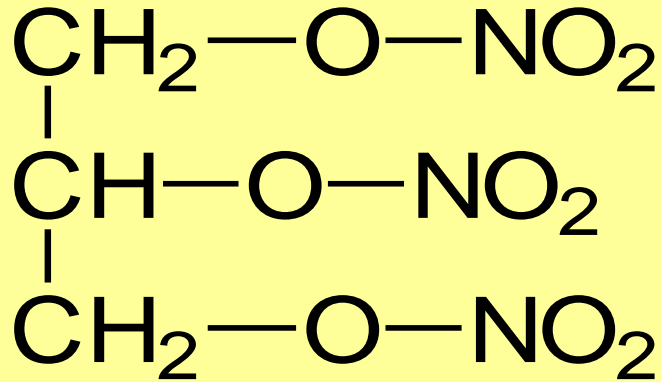
Oxid dusnatý NO· vzniká z argininu

má 1volný elektron, volný radikál

- Volná difúze mezi bunkami 1-10s, v krvi vychytán erytrocyty, produkován NO syntasy: nNOS, eNOS, iNOS
- exogenní zdroje: léčiva, vazodilatancia
- Fyz. funkce (vasodilatace, neurotransmitter, makrofágy-baktericidní účinek
- NO· se váže na guanylátcyklasu \Rightarrow cGMP \Rightarrow relaxace hladké svaloviny (hlavně cév) a další účinky ...
- NO· je radikál a poskytuje další reaktivní metabolity: tvorba peroxynitritu a dalších RNS a nitrosothiolů



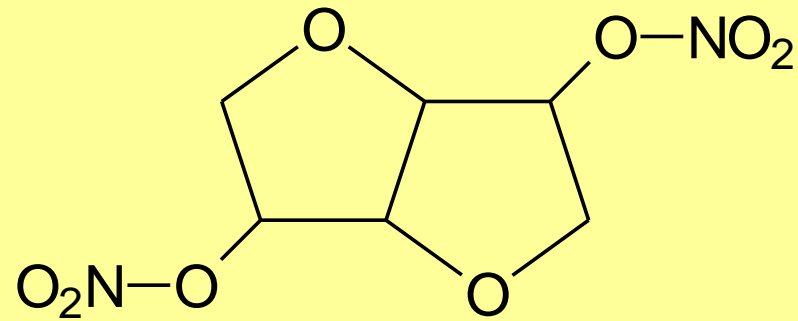
Sloučeniny uvolňující NO



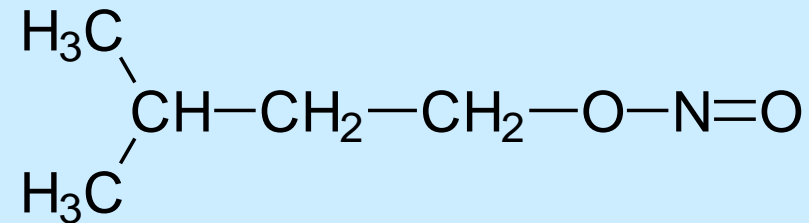
glycerol trinitrát (glyceroli trinitras)
nažloutlá olejovitá kapalina
klasické léčivo, působí rychle
sublinguální tablety, sprej, náplast



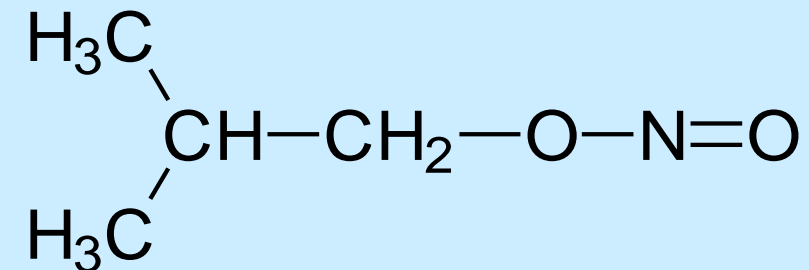
nitroprusid sodný (natrii nitroprussias)
pentakyanonitrosylželezitan disodný
rubínově červené krystaly
extrémně účinný, i.v. infuze



isosorbid dinitrát (isosorbidi dinitras)
výhodnější farmakokinetické vlastnosti



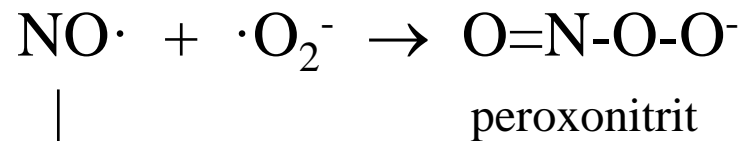
amyl-nitrit (amylis nitris)
těkavá kapalina, inhalační aplikace



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

Peroxynitrit ONOO-

- Silné cytotoxické oxidační činidlo
- Toxické účinky:
- Deplexe –SH skupin a dalších antioxidantů
- Oxidace lipidů
- Zlomy DNA , nitrace a deaminace DNA bazí (G)
- Nitrace aromatických AK (Tyr, Phe, Trp) 3-nitrotyrosin (inaktivace enzymů, interference se signální transdukcí)
- Oxidace Met na sulfoxid



nitrosylace

Sirné radikály

- In vivo –SH –antioxidanty, ale thioly mohou být zdrojem volných radikálů
- Tvorba thiolových radikálů GS.
- Vznik potenciálních cytotoxických radikálů

Exogenní příčiny vzniku volných radikálů

- Ultrafialové nebo ionizační záření (UV světlo, γ záření, X- záření)
- Kouření
- Znečištění ovzduší
- Intoxikace (PCB, CL4, chloroform, alkohol)
- Potrava (tepelná úprava, drcení, vliv světla)

Endogenní příčiny vzniku volných radikálů

- Reakce katalyzované XOD (úrazy, nekrózy)
- Rozpad fagocytů a makrofágů (záněty, sepse, popáleniny)
- Syntéza prostaglandinů
- Hyperglykemie
- Reperfúze po předchozí ischemii (kyslíkový druh)

Funkce volných radikálů ve zdravém organismu

I Nástroj oxidas a oxygenas

- *cytochromoxidasa* (toxické meziprodukty, H_2O_2 a superoxid, vázány na enzymu)
(mitochondriální dýchací řetěze)
- *monooxygenasy* (oxygenasy se smíšenou funkcí) - aktivují O_2 v ER jater nebo v mitochondriích nadleivin; hydroxylace
(cytochrom P450, oxidace širokého spektra substrátů zaspotřeby O_2 , jaterní P450- metabolismus xenobiotik)

I Nástroj oxidas a oxygenas

- **Xanthinoxidáza (XOD)** –oxidace xanthinu na kys. močovou
- **Prolin a lysinhydroxylasy** (hydroxylují Pro a Lys při syntéze kolagenu)
- **Tyrosinhydroxylasa** (hydroxyluje Tyr, zahájení syntézy dopaminu, adrenalinu, noradrenalinu)

Syntéza hormonů štítné žlázy

-Thyreoperoxidasa

Oxidace I⁻ na I₂ peroxidem vodíku---mono a diiodotyrosin, thyroxin T₄, trijodthyronin T₃

Oplodnění vajíčka

Spermie

narušení membrány vajíčka při průniku –
produkce O_2^- .

Vajíčko

Zabránění průniku dalších spermií –
produkce H_2O_2 ..tvorba příčných vazeb v
membraně

Funkce volných radikálů ve zdravém organismu II

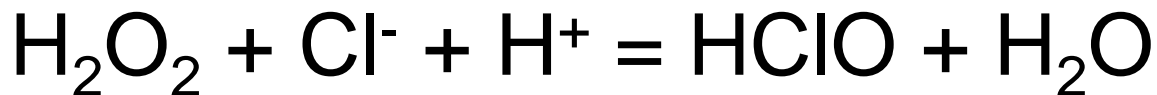
ROS a RNS proti bakteriím, fagocytoza

Forma obrany proti cizorodým částicím a mikroorganismům

Makrofágy, neutrofily, NK buňky

Enzymy podílející se na zneškodnění pohlcených mikroorganismů ve fagocytu

- enzymový komplex *NADPH-oxidasa* leukocytů a makrofágů (respirační vzplanutí)
- *myeloperoxidasa* - katalýza reakce



- *iNOS: závislá na NADPH (Arg-Citrulin..NO)*

Funkce volných radikálů ve zdravém organismu III

- **signální molekuly**

primární posel \Rightarrow sekundární posel \Rightarrow info síť

- **redoxní stav buňky ovlivňuje funkci této sítě**

- **redoxní stav:** kapacita antioxidačního systému, dostupnost redukčních ekvivalentů, intenzita oxidační zátěže (RONS)

\Rightarrow ROS: **sekundární** poslové

\Rightarrow NO (neurotransmitter, cévní endotel-relaxace cévní stěny, NO u fagocytující buňky)

Imunitní ochrana vs.regulace

masivní produkce ROS jako nástroj
imunitní *ochrany*

X

indukce změn nízkých koncentrací ROS,
jež jsou pravděpodobně *regulačním*
mechanismem

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

Oxidační stres

Při porušení rovnováhy mezi *vznikem* a *odstraňováním* RONS nastává tzv.

oxidační stres

Rovnováha může být porušena na **obou** stranách!!

Příčiny vzniku oxidačního stresu:

- nadměrná tvorba RONS,
- nedostatečná činnost antioxidačního obraného systému,
- kombinace

Poškození lipidů - atak na nenasycené MK

peroxidace lipidů

- řetězová reakce
- **enzymové peroxidace lipidů** (syntéza prostanoidů, leukotrienů, aktivní centra hydro- a endoperoxidas (COX a lipoxygenasy)
- **neenzymová peroxidace lipidů** – patologický proces, meziprodukty lipoperoxidace, vazba na proteiny, ovlivnění fluidity

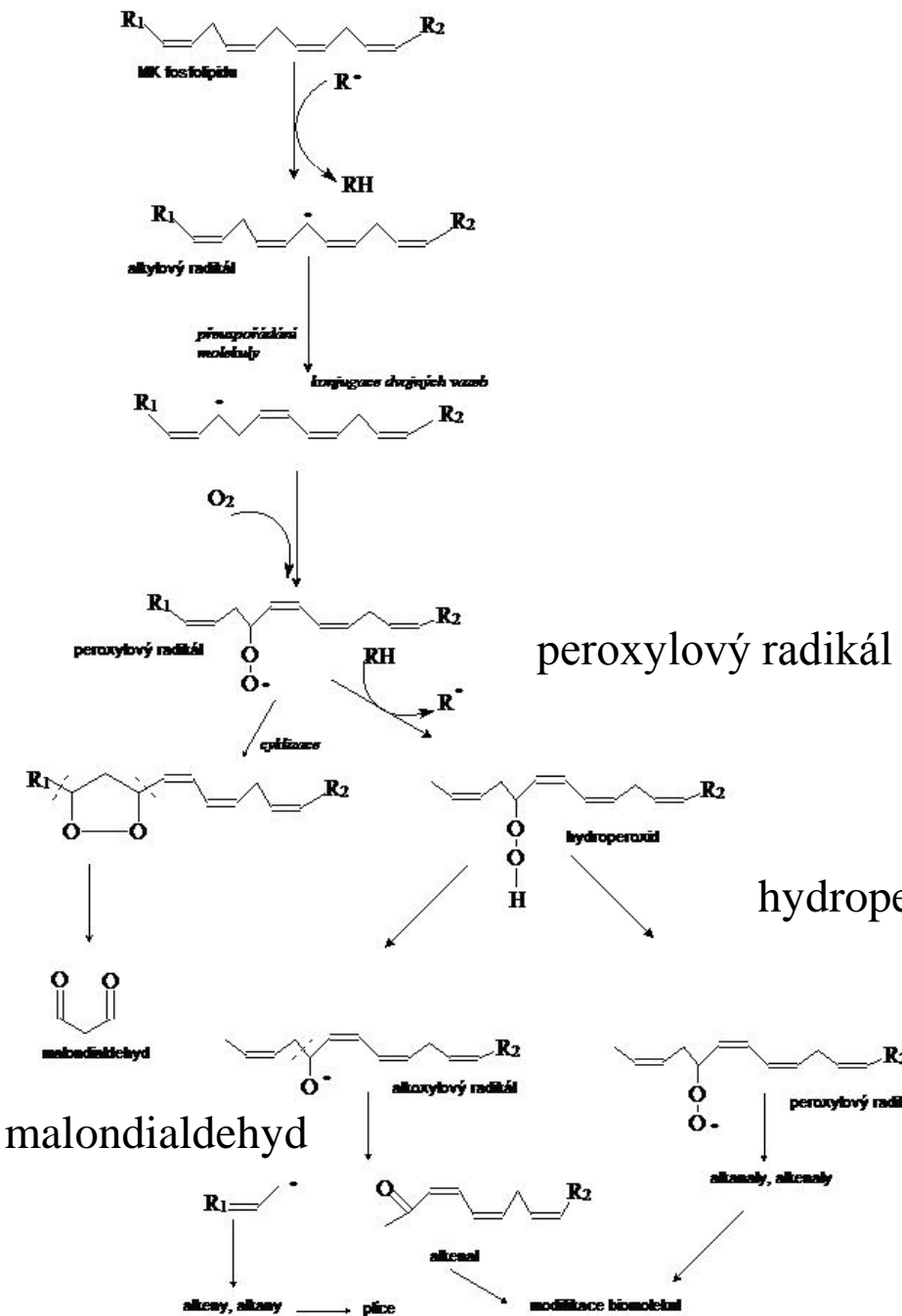
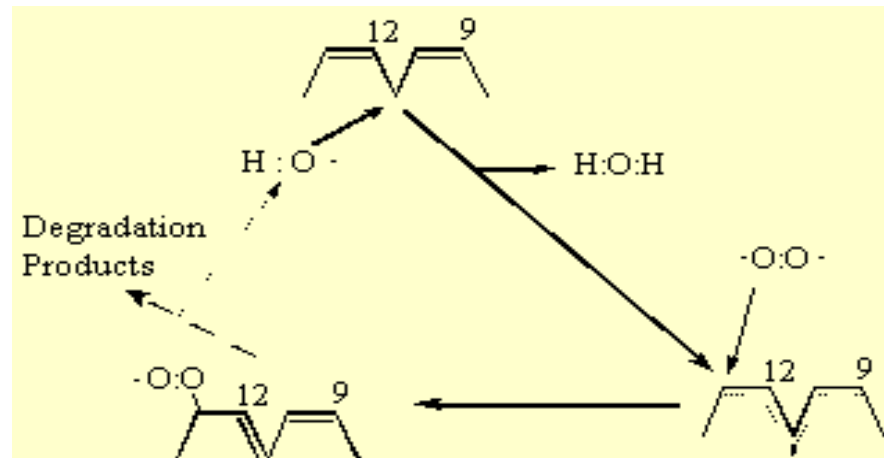
Poškození

- ztráta násobných vazeb
- vznik reaktivních metabolitů (aldehydy)

Důsledek

- změna fluidity propustnosti membrán
- vliv na membránově vázané enzymy

Peroxidace kyseliny linolenové



Peroxidový radikál– alkanaly, alkeny....modifikace, plíce

Poškození proteinů

Přímé poškození bílkovin působením RONS

-oxidace, hydroxylace, nitrace, chlorace AK, neprobíhá řetězová reakce

Nepřímé poškození bílkovin produkty peroxidace lipidů

-alkoxylové a peroxylové radikály

Malondialdehyd a 4-hydroxynonenal, vznik příčných vazeb mezi sousedními řetězci, vznik karmobynových sloučenin

Poškození

- agregace a síťování,
- fragmentace a štěpení
- reakce s hemovým železem
- modifikace funkčních skupin

Důsledek

- změny transportu iontů
- změny aktivity enzymů
- Proteolýza, aktivace proteáz a fosfolipas důsledkem hromadění Ca^{2+} v cytosolu
- Vznik nových antigenních determinant s následnými autoimunitními reakcemi

Poškození DNA

- **Hydroxylace purinových bází**
 - 8-hydroxyadenin, 8-hydroxyG, 8-oxoG, FapyG, FapyA
- **Hydroxylace pyrimidinových bází**
 - thyminglykol, uracilglykol,...
- **Hydroxylace cukerných zbytků**
 - oxidace a fragmentace – uvolnění bází, přerušení řetězce DNA a tvorba malondialdehydu

Poškození

- štěpení cukerného kruhu
- modifikace bází
- zlomy řetězce

Důsledek

- mutace
- translační chyby
- inhibice proteosyntézy
- chybné párování

Poškození biomolekul

Sloučenina	Poškození	Následky
lipidy	<ul style="list-style-type: none"> - oxidace PUFA (ztráta dvojných vazeb) - tvorba reaktivních sloučenin (aldehydů a ROO·) - oxidace cholesterolu 	<ul style="list-style-type: none"> - změna propustnosti membrán - poškození membr. enzymů, proteinů - Změna fluidity membrán
Proteiny	<ul style="list-style-type: none"> - modifikace -SH a fenylu (arom.) AK - vznik příčných vazeb mezi řetězci-sítování a agregace - fragmentace + štěpení 	<p>změny v transportu iontů vstup Ca²⁺ do cytosolu změny v aktivitě enzymů vznik nových antigeních determinant aktivace proteáz a fosfolipáz</p>
DNA	<p>Modifikace a štěpení deoxyribosy modifikace bází zlomy řetězce Vznik příčných vazeb mezi řetězci DNA a proteinů</p>	<p>Vznik mutací Chyby v párování bází translační chyby inhibice proteosyntézy</p>

Jak umíme oxidační stres kvantifikovat ?

Detekce volných radikálů

- poměrně náročné vzhledem vzhledem k fyz. chem. vlastnostem

Měření produktů oxidačního stresu

- jednodušší, široká paleta markerů oxidačního stresu

Markery oxidačního stresu

Posouzení lipoperoxidace:

malondialdehyd (MDA), konjugované dieny,
izoprostany

Posouzení poškození proteinů :

proteinové hydroperoxydy

Posouzení poškození DNA :

stanovení modifikovaných nukleosidů (8-oxoG)

Stanovení antioxidantů

askorbát

tokoferol

SOD

GSHPx

glutathion

Onemocnění spojená s oxidačním stresem

Neurologická

Alzheimerova choroba

Parkinsonova choroba

Endokrinní

Diabetes

Gastrointestinální

Akutní pankreatitida

Vaskulární

Ateroskleróza

Ostatní

Obezita

Transplantace orgánů, Rakovina

Antioxidační ochranný systém

Tři typy ochrany

zábrana tvorby nadměrného množství RONS

- *záchyt* a odstranění radikálů (lapače, vychytávače, zhášedče)
- *reparační* mechanismy poškozených biomolekul

Přehled antioxidantů a vychytávačů VR

1. Endogenní antioxidanty

- *enzymová* (cytochrom c, SOD, GSHPx, katalasa)
- *neenzymová*
 - membránová (α -tokoferol, β -karoten, koenzym Q₁₀)
 - nemembránová (askorbát, uráty, transferin, bilirubin)

2. Exogenní antioxidanty

- *inhibitory vzniku VR* (regulace aktivit enzymů)
- *scavengery vzniklých VR* (enzymy, neenzymy)
- *stopové prvky* (Se, Zn)

Antioxidační systémy organismu

1. Enzymy (endogenní)

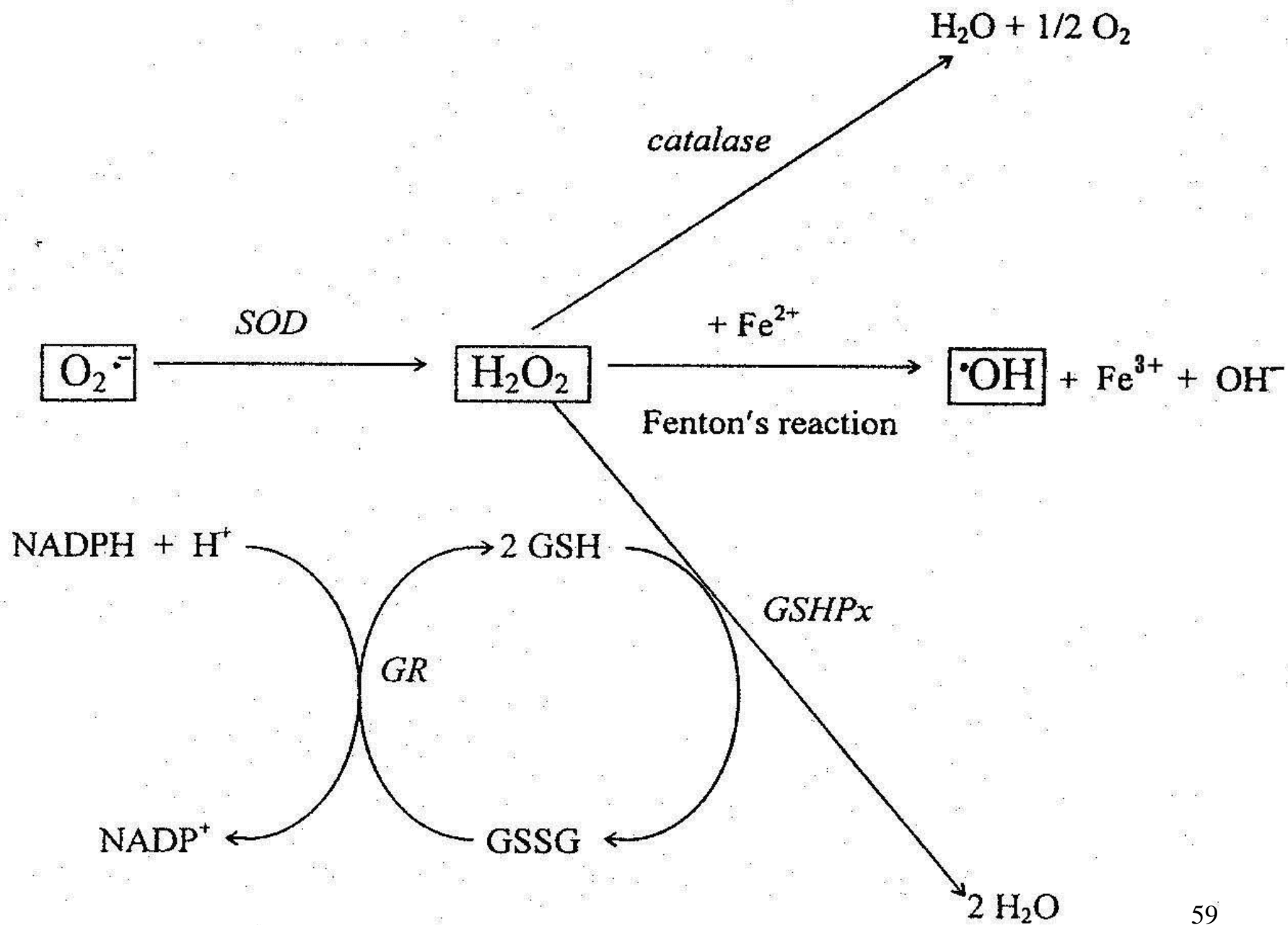
superoxiddismutasa, katalasa, glutathionperoxidasa

2. Vysokomolekulární antioxidanty (endogenní)

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

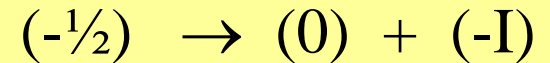
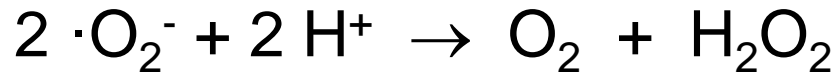
3. Nízkomolekulární antioxidanty (exogenní, endogenní)

- 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:

dvě isoformy: SOD1 (Cu, Zn, cytosol), *dimer*, Cu = *redoxní centrum* cytosol, intermitochondriální prostor, hepatocyt, mozek, erytrocyt, vysoká stabilita, katalýza při pH 4,5-9,5

- SOD2 (Mn, mitochondrie), tetramer, matrix mitochondrie, menší stabilita než Cu, Zn – SOD, fylogeneticky mladší,

Eliminace H_2O_2 v organismu

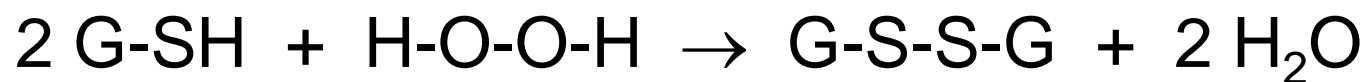
- **katalasa** obsažena v erytrocytech

disproporcionace H_2O_2 , $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \frac{1}{2} \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$, při vysokých koncentracích H_2O_2

Detoxikace alkylperoxidů : $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{ROOH} \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{ROH}$

- **glutathionperoxidasa** (odstranování interacelulárních hydroperoxidů)
- obsahuje selenocystein, druhý substrát - glutathion (G-SH) redukuje H_2O_2 a hydroperoxy fosfolipidů (ROOH)

detoxikace peroxidu vodíku, GSSG se redukuje na GSH pomocí glutathionreduktázy



neškodný derivát



Glutathionperoxidasy

odstraňují intracelulární hydroperoxydy a H_2O_2



- *cytosolová GSH - glutathionperoxidasa* (EC 1.11.1.9, cGPx)
- *extracelulární GSH - glutathionperoxidasa* (eGSHPx)
- *fosfolipidhydroperoxid GSH - peroxidasa* (EC 1.11.1.12, PHGPx)

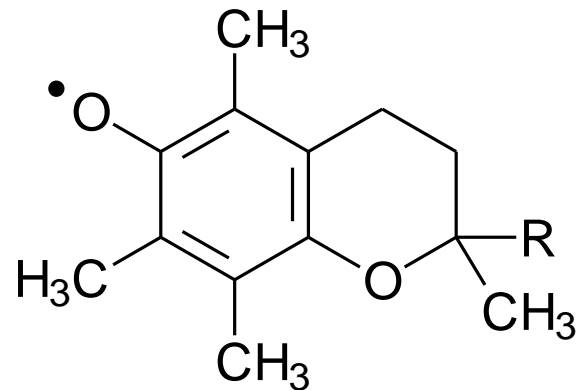
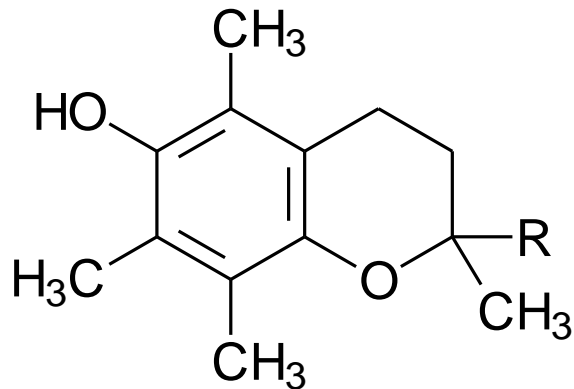
Nízkomolekulární antioxidanty

Lipofilní	Hydrofilní
Tokoferol	L-askorbát
Karoteny	Flavonoidy
- Lykopen	Dihydrolipoát ^a
- Lutein	Glutathion ^a
Ubichinol ^a	Močová kyselina ^a

^a Endogenní sloučeniny.

Tokoferol

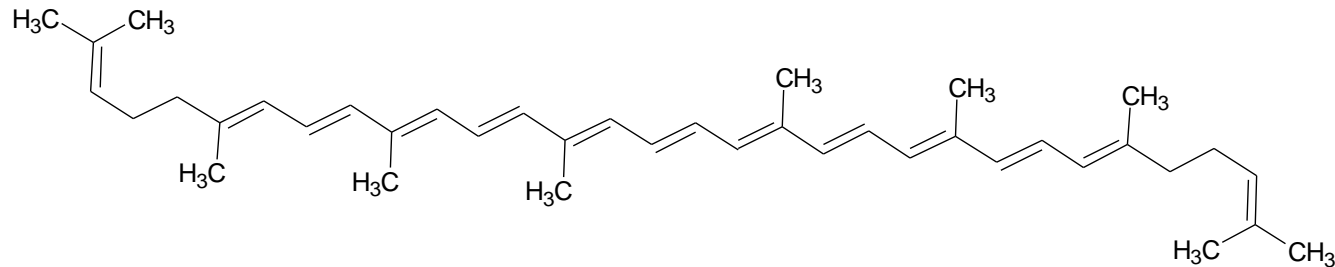
- Lipofilní antioxidant buněčných membrán a lipoproteinů
- Redukuje peroxylové radikály fosfolipidů na hydroperoxydy, které jsou dále redukovány GSH, tokoferol se oxidauje na stabilní radikál
- $\text{PUFA-O-O}\cdot + \text{Toc-OH} \rightarrow \text{PUFA-O-O-H} + \text{Toc-O}\cdot$
- $\text{Toc-O}\cdot$ 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 zhášet (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)

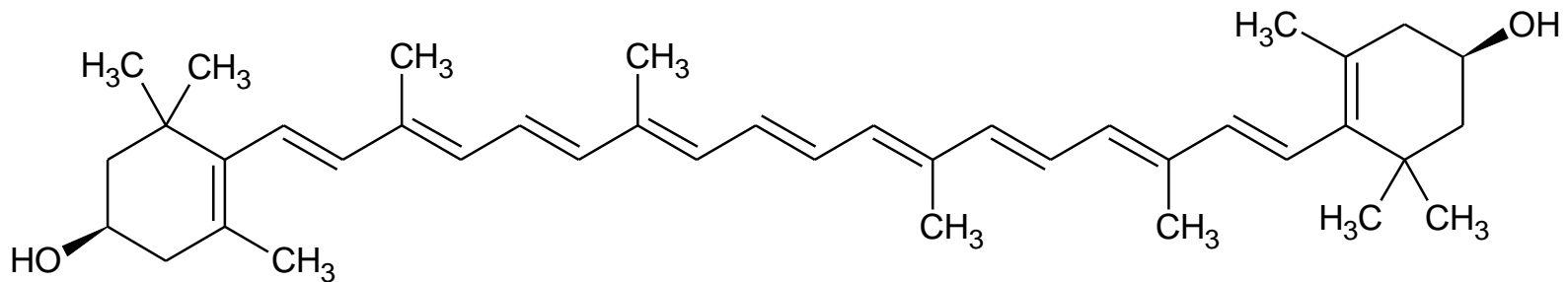


Rajský protlak	10-150
Kečup	10-14
Rajská šťáva/omáčka	5-12
Meloun	2-7
Papaja čerstvá	2-5
Rajčata čerstvá	1-4
Meruňky kompot	~ 0,06
Meruňky čerstvé	~ 0,01

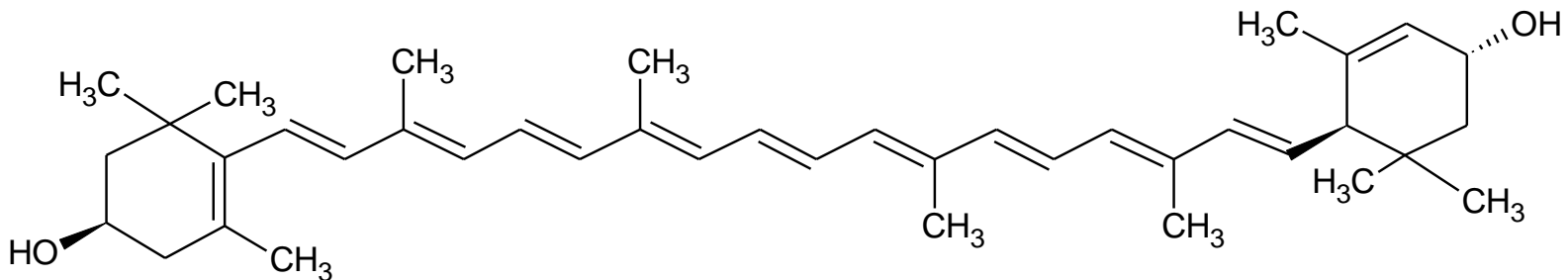
Pro efektivní uvolnění a vstřebání lykopenu je vhodné rajčata rozvařit a konzumovat s tukem

Zeaxanthin a lutein

- patří mezi xanthofyly, kyslíkaté deriváty karotenoidů
- liší se polohou dvojné vazby a počtem chirálních center
- vyskytují se zejména v zelené listové zelenině
- obsažené ve žluté skvrně (macula lutea) a chrání ji před degenerací



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:

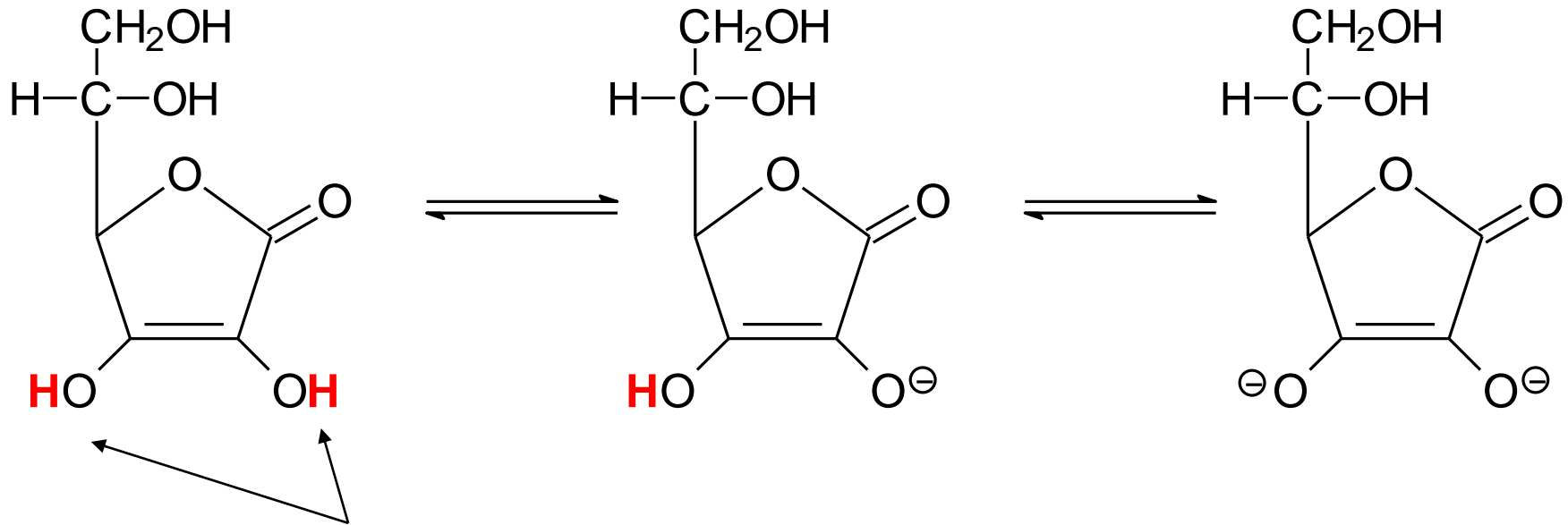
Fe^{2+} a Cu^{+} katalyzují vznik hydroxylového radikálu



L-Askorbová je dvojsytná kyselina

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

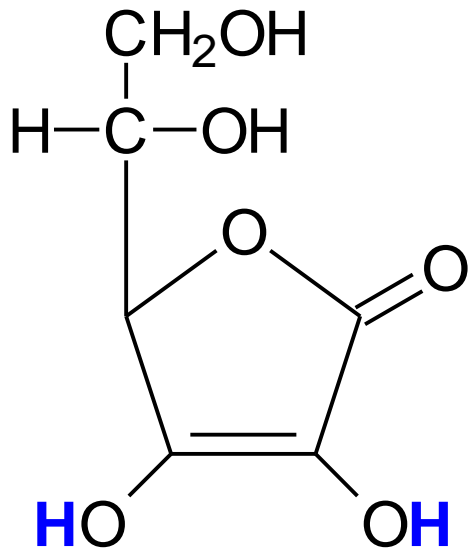
$$pK_{A2} = 11,6$$



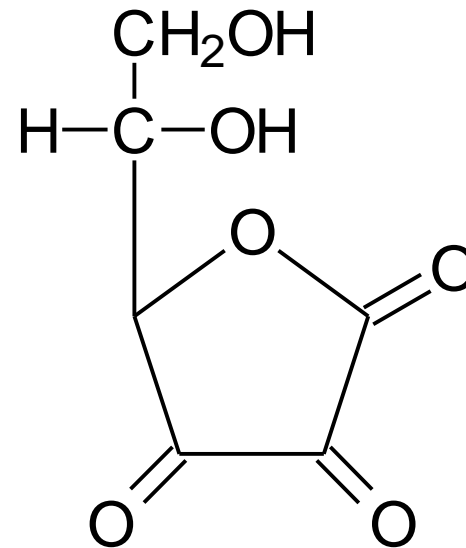
dva enolové hydroxyly

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

L-Askorbová kyselina má redukční účinky



askorbová kys.
(redukovaná forma)



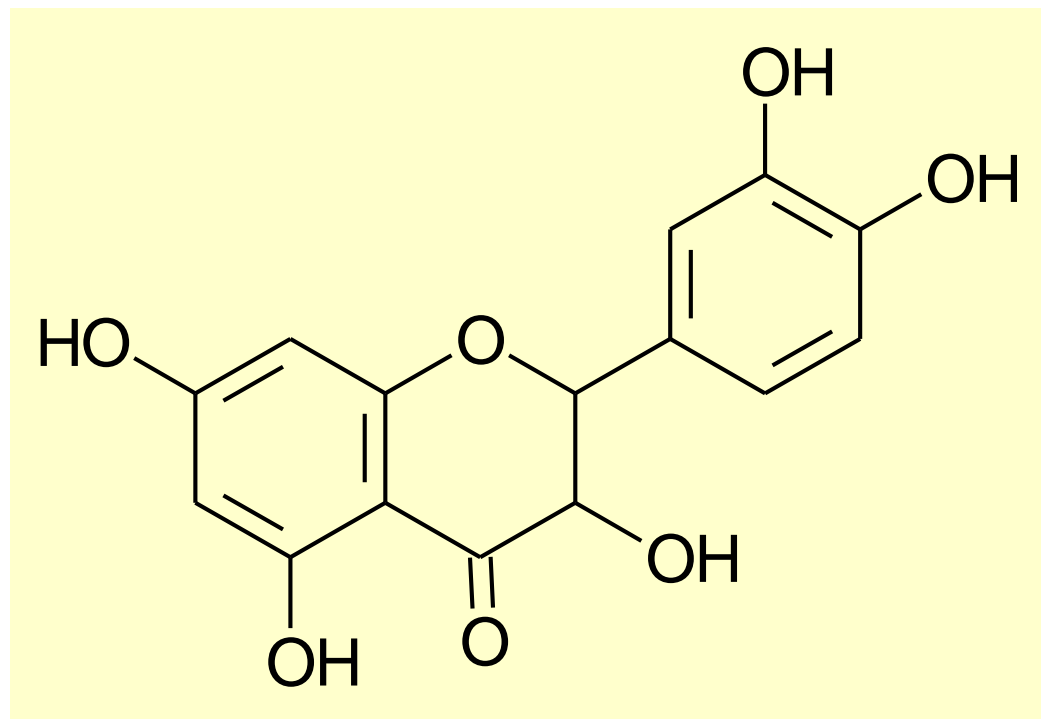
dehydroaskorbová kys.
(oxidovaná forma)

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

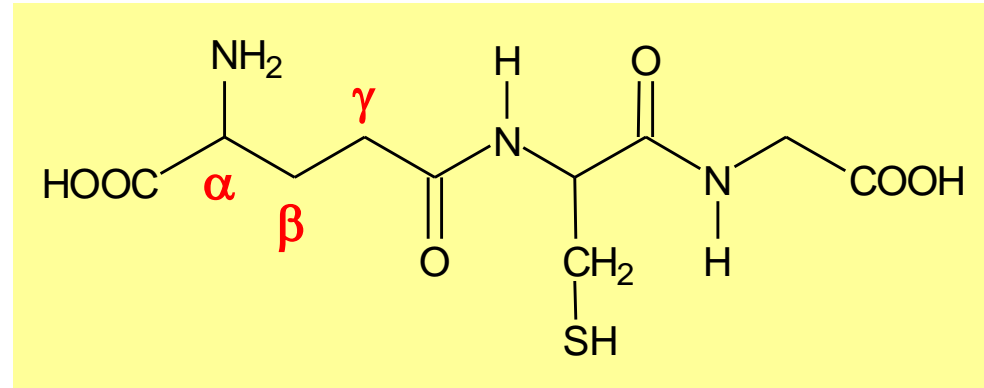
- zelenina (nejvíc cibule)
- ovoce (jablka, citrusy, hrozny)
- zelený čaj, černý čaj
- kakao, čokoláda
- olivový olej (Extra Virgin)
- červené víno



kvercetin

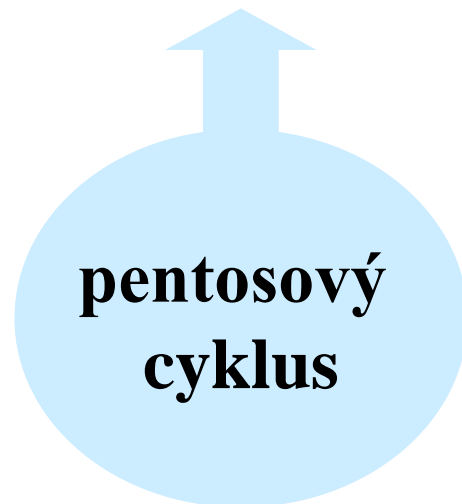
Glutathion (GSH)

- 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



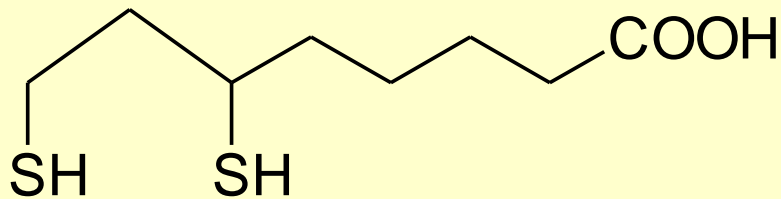
Regenerace redukované formy GSH

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

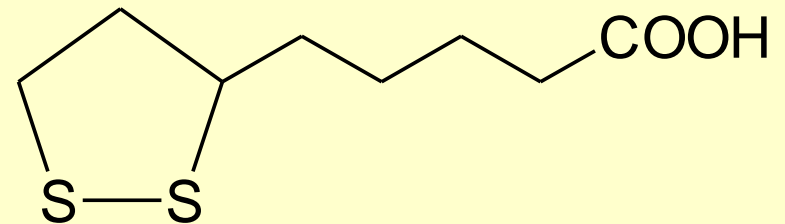


Dihydrolipoát

- 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)

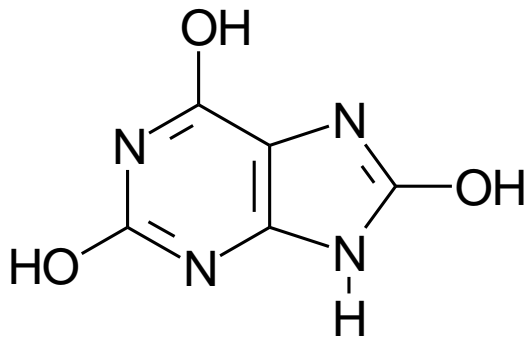
Kyselina močová

- 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

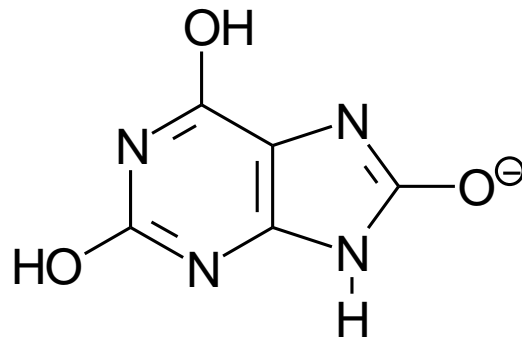
Laktimová forma kys. močové je dvojsytná kyselina

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

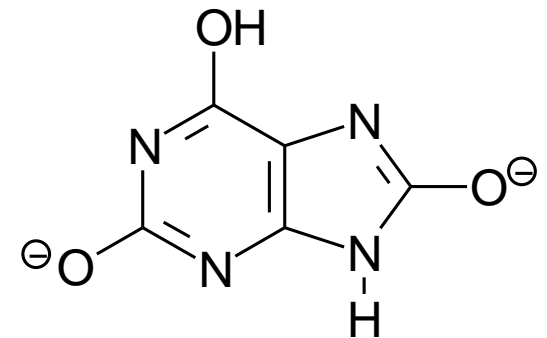
$$pK_{A2} = 10,3$$



kys. močová



hydrogenurát



urát

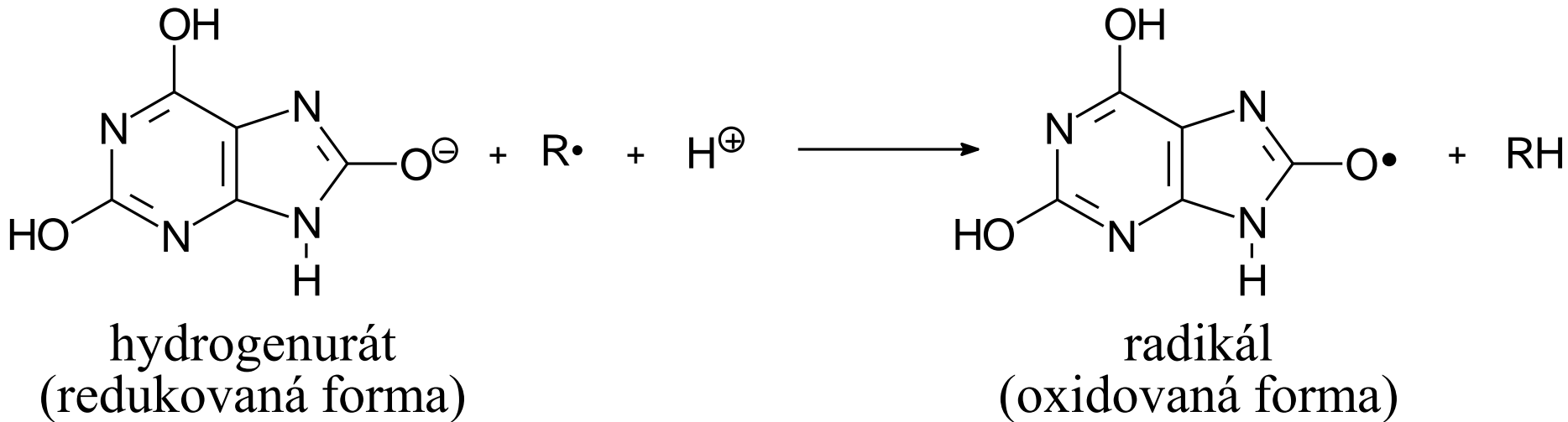
2,6,8-trihydroxypurin

Redukční účinky kyseliny močové

Srovnejte 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

Vysokomolekulární antioxidanty

- Vazba iontů přechodných kovů, změna jejich oxidačního stavu a zabránění jejich účasti v radikálových reakcích
- Ferooxidasová aktivita- mobilizace intracelulárních zásob Fe
- **Transportní proteiny** (transferin, laktoferin, ceruloplasmin)
- **Zásobní bílkoviny** (ferritin, hemosiderin, neuromelanin), haptoglobin, hemopexin
- **Proteiny obsahující velké množství thiolových skupin** (metalothioneinů, albumin)

Stopové prvky ovlivňující VR

Selen

ovlivňuje resorpci vit. E, součást selenoproteinů

↓ Se = nedostat. imunitní odp., hemolýza erytrocytů, syntéza methemoglobinu

Zinek

stabilizace buněčných membrán

zvýšení imunitní odpovědi, antagonist Fe

