

Volné radikály a oxidačný stres

Katarína Šišková



E-BOOK

Název: **Volné radikály a oxidačný stres**

Autor: **Katarína Šišková**

Recenzenti: **Adriana Adameová, Jaroslav Racek**

Vydavatel: **Lékařská fakulta v Plzni Univerzity Karlovy**

Pořadí a rok vydání: **1. vydání, 2015**

ISBN: **978-80-88120-07-0**



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Podpořeno z projektu „Podpora vytváření, rozvoje a mobility kvalitních
výzkumně vývojových týmů na Univerzitě Karlově“ registrační číslo CZ.1.07/2.3.00/30.0022

OBSAH

Úvod 6

1 VOLNÉ RADIKÁLY A OXIDAČNÝ STRES 7

1.1 Volné radikály 7

1.1.1 Kyslíkové radikály a reaktívne formy kyslíka 7

1.1.2 Dusíkové radikály a reaktívne formy dusíka 13

1.1.3 Prechodné kovy – železo, meď, mangán 17

1.1.4 Radikály síry 18

1.2 Oxidačný stres a oxidačné poškodenie biologických štruktúr 19

1.2.1 Peroxidácia lipidov 20

1.2.2 Oxidačné poškodenie proteínov 23

1.2.3 Oxidačné poškodenie nukleových kyselín 24

1.3 Literatúra 26

2 NEENZÝMOVÉ ANTIOXIDANTY 28

2.1 Minerály 28

2.1.1 Zinok 28

2.1.2 Selén 29

2.2 Vitamíny 29

2.2.1 Vitamín C (kyselina askorbová) 29

2.2.2 Vitamín E 31

2.2.3 Vitamín K 32

2.2.4 Vitamín A a karotenoidy 33

2.3 Koenzýmy 35

2.3.1 Koenzým Q 35

2.4 Nízkomolekulárne endogénne antioxidanty 36

2.4.1 Glutatión 36

2.4.2 Tioredoxíny 37

2.4.3 Kyselina močová 38

2.5 Organické zlúčeniny síry 38

2.5.1 Organické zlúčeniny síry v cesnakovej silici 38

2.5.2 N-acetylcysteín 39

2.5.3 Kyselina lipoová 39

2.5.4 Metalotioneíny 40

2.6 Polyfenoly 41

2.7 Literatúra 43

3 ENZÝMOVÉ ANTIOXIDANTY 45

3.1 Superoxid dismutázy 45

3.1.1 CuZn-Superoxid dismutáza 45

3.1.2	<i>Mn-Superoxid dismutáza</i>	46
3.1.3	<i>Superoxid dismutáza</i>	47
3.2	Superoxid reduktázy (SOR)	47
3.3	Katalázy (CAT)	48
3.4	Peroxidázy	49
3.4.1	<i>Glutatión peroxidázy (GPx)</i>	49
3.4.2	<i>Tioredoxínové enzýmy</i>	52
3.4.3	<i>Peroxiredoxíny</i>	52
3.5	Indolamín-2,3-dioxygenáza (IDO)	53
3.6	Paraoxonázy	53
3.7	Hém oxygenáza	54
3.7.1	<i>Biliverdín, bilirubín a oxidu uhoľnatého v úlohe antioxidantov</i>	55
3.8	Literatúra	56
4	MARKERY OXIDAČNÉHO STRESU V BIOLOGICKÝCH SYSTÉMOCH A METÓDY ICH STANOVENIA	59
4.1	Celková antioxidačná aktivita	60
4.2	Stanovenie aktivity antioxidačných enzýmov	63
4.3	Markery oxidačného poškodenia biomakromolekúl	64
4.3.1	<i>Markery peroxidácie lipidov</i>	64
4.3.2	<i>Markery oxidačného poškodenia proteínov</i>	66
4.3.3	<i>Markery oxidačného poškodenia deoxynukleovej kyseliny</i>	67
4.4	Stanovenie voľných radikálov	69
4.4.1	<i>Stanovenie kyslíkových voľných radikálov</i>	70
4.4.2	<i>Stanovenie voľných radikálov dusíka</i>	70
4.4.3	<i>Stanovenie halogénových voľných radikálov</i>	71
4.5	Literatúra	71
5	OXIDAČNÝ STRES A ŽIVOTNÝ ŠTÝL	73
5.1	Vplyv pohybovej aktivity na oxidačný stres	73
5.1.1	<i>Aeróbná fyzická aktivita a oxidačný stres</i>	74
5.1.2	<i>Aneróbná fyzická aktivita a oxidačný stres</i>	75
5.2	Vplyv stravy na oxidačný stres	76
5.3	Vplyv návykových látok na oxidačný stres	77
5.3.1	<i>Kofeín a jeho vplyv na oxidačný stres</i>	77
5.3.2	<i>Čokoláda a oxidačný stres</i>	78
5.3.3	<i>Nikotín a cigaretový dym vo vzťahu k oxidačnému stresu</i>	79
5.4	Znečistené ovzdušie a oxidačný stres	81
5.5	Literatúra	82
6	ÚLOHA OXIDAČNÉHO STRESU PRI VZNIKU A ROZVOJI VYBRANÝCH OCHORENÍ	85
6.1	Oxidačný stres ako rizikový faktor metabolického syndrómu	86
6.1.1	<i>Oxidačný stres a diabetes mellitus</i>	87
6.1.2	<i>Oxidačný stres a obezita</i>	87
6.1.3	<i>Oxidačný stres a dyslipidémie</i>	88
6.1.4	<i>Oxidačný stres a hypertenzia</i>	88

6.2	Autoimunitné ochorenia a OS	88
6.2.1	<i>Reumatoidná artritída</i>	89
6.2.2	<i>Systémový lupus erythematosus</i>	90
6.2.3	<i>Crohnova choroba</i>	90
6.2.4	<i>Celiakia</i>	91
6.2.5	<i>Vitiligo</i>	91
6.3	Neurodegeneratívne ochorenia a oxidačný stres	92
6.3.1	<i>Alzheimerova choroba</i>	92
6.3.2	<i>Parkinsonova choroba</i>	93
6.3.3	<i>Amyotrofická laterálna skleróza</i>	94
6.3.4	<i>Skleróza multiplex</i>	96
6.4	Nádorové ochorenia a oxidačný stres	98
6.4.1	<i>Oxidačný stres v procesoch karcinogenézy</i>	98
6.4.2	<i>Oxidačný stres, onkogény, tumor-supresorové a stabilizačné gény</i>	99
6.4.3	<i>Voľné radikály v nádorových ochoreniach</i>	100
6.5	Literatúra	100
7	ZOZNAM SKRATIEK	102

Úvod

Slovné spojenie „oxidačný stres“ je často vnímané negatívne, pretože pojem „stres“ evokuje, že ide o nebezpečnú situáciu s potenciálne nežiaducimi následkami. Najjednoduchšie je možné oxidačný stres charakterizovať ako stav, v ktorom je redoxná rovnováha posunutá v prospech oxidácie. Prechodný oxidačný stres je preto bežnou a nevyhnutnou súčasťou fyziologického metabolizmu buniek. Cielená tvorba voľných radikálov, vedúcich najmä k miestnemu oxidačnému stresu je dokonca základom mnohých mechanizmov, ktoré udržiavajú v organizme stav homeostázy. Nie je však možné poprieť, že súčasný životný štýl je pôvodcom neúmerneho zaťaženia buniek voľnými radikálmi, ktoré sa dostávajú do organizmu z vonkajšieho prostredia (znečistené ovzdušie, potrava, kozmetika,...). Takýto patologický oxidačný stres, najmä ak má chronický charakter, predstavuje pre organizmus záťaž, ktorá by mohla byť potenciálne zdrojom niektorých ochorení. Napriek veľkému počtu štúdií základného aj klinického výskumu sa teórie o oxidačnom strese v úlohe patofyziologického činiteľa ochorení zatiaľ neopierajú o jednoznačné vedecké dôkazy a ostávajú iba súčasťou diskusií v kruhoch odbornej verejnosti.

Táto vedecká publikácia je učebnicou pre všetky formy výuky základnej a klinickej biochémie na lekárskejších a farmaceutických fakultách, ako aj ďalších biologických odborov so zameraním na zdravotnú starostlivosť. Úvodné kapitoly podávajú čitateľovi prehľad o rôznych typoch voľných radikálov, oxidačnom strese a spôsoboch, ktorými sa voči nemu organizmus bráni - na úrovni neenzýmových a enzýmových antioxidačných systémov. Samostatná kapitola sa zameriava na problematiku stanovenia markerov oxidačného stresu v experimentálnej aj klinickej praxi. Záverečné kapitoly prinášajú prehľad najnovších poznatkov v oblasti štúdií, ktoré hodnotia vplyv životného štýlu na oxidačný stres a účasť voľných radikálov v procesoch vzniku a rozvoja vybraných ochorení.

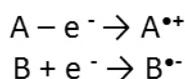
1

VOĽNÉ RADIKÁLY A OXIDAČNÝ STRES

V súčasnosti sa často diskutuje o voľných radikáloch v súvislosti s patofyziológiou mnohých ochorení, je však nutné poznamenať, že **voľné radikály (VR)** sú v prvom rade obranným mechanizmom, ktorým sa organizmus bráni proti patogénnym mikroorganizmom, malígnej transformácii buniek, xenobiotikám, starnutiu ako aj ionizujúcemu žiareniu.

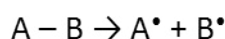
1.1 VOĽNÉ RADIKÁLY

Za voľné radikály sa považujú všetky atómy a molekuly, ktoré vo svojom vonkajšom orbitále obsahujú aspoň jeden nespárený elektrón a zároveň sú schopné samostatnej existencie. V bunkách dochádza k vzniku voľných radikálov po odobraní alebo prijatí elektrónu z/do orbitálu atómu/molekuly:

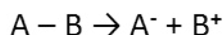


Radikál potom môže niesť pozitívny, negatívny, či neutrálny náboj a označuje sa bodkou v superskripte za chemickým označením atómu/molekuly.

V laboratórnych podmienkach možno pripraviť voľné radikály cieleným štiepením kovalentnej väzby, za použitia vysokých dávok energií (napr. UV žiarenie, radiácia). Tento proces sa nazýva **homolytické štiepenie**, pretože elektrónový pár z pôvodnej molekuly je rovnomerne rozdelený medzi dva vznikajúce atómy:



Pri nerovnomernom rozdelení elektrónového páru ide o **heterolytické štiepenie**, nakoľko celý elektrónový pár z pôvodnej molekuly prijme len jeden zo vznikajúcich atómov:

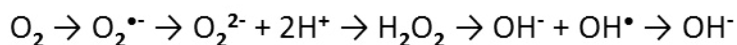


V tomto prípade však nevznikajú atómy s nespáreným elektrónom - voľné radikály, ale ióny (anión a kation).

1.1.1 KYSLÍKOVÉ RADIKÁLY A REAKTÍVNE FORMY KYSLÍKA

Molekula dvojatómového kyslíka (dioxygén) je voľným radikálom, pretože každý z jej atómov kyslíka nesie jeden voľný elektrón v π -protiväzbovom orbitále, pričom tieto elektróny majú paralelný spin. Správny zápis molekuly kyslíka je teda $O_2^{\bullet\bullet}$ ($O^{\bullet-} O^{\bullet}$), v literatúre sa však voľné elektróny nezapisujú, a teda kyslík poznáme ako molekulu O_2 . Podľa **Pauliho princípu vylúčnosti** (v jednom atómovom or-

bitále sa nesmú vyskytovať dva elektróny s rovnakými hodnotami všetkých kvantových čísel, teda dva elektróny s paralelným spinom) nemôže byť O_2 redukovaný prijatím elektrónového (antiparalelného) páru od iného atómu alebo molekuly, pretože v jednom z kyslíkových orbitálov by sa vyskytovali dva elektróny s paralelným spinom. Z energetického hľadiska je preto pre O_2 oveľa jednoduchšie prijať len jeden elektrón do jedného z protiväzbových orbitálov, čím vzniká aniónový radikál superoxidu (označovaný kedysi ako hyperoxid; $O_2^{\bullet-}$, v literatúre sa však v superskripte radikál vynecháva a superoxid sa označuje iba ako O_2^-) s nižšou stabilitou väzby (sila väzby v O_2 je vyššia ako v superoxide, preto je tento reaktívnejší ako kyslík). Následnou jedoelektrónovou redukciou kyslíka (elektrón je prijatý do druhého protiväzbového orbitálu) vzniká peroxidový ión O_2^{2-} (peroxid vodíka, H_2O_2), ktorý už nemá charakter radikálu. Z H_2O_2 pri postupnom prijatí elektrónov vzniká najskôr hydroxylový radikál (OH^\bullet) a nakoniec hydroxylový anión (OH^-):



V aeróbných bunkách sú najväčšími producentmi superoxidového radikálu mitochondrie. V dýchanom reťazci mitochondrií je za štandardných podmienok O_2 redukovaný postupným prenosom elektrónov až za vzniku aniónu O^{2-} (H_2O). Únikom elektrónov z komplexov dýchacieho reťazca sú však asi 3 % z O_2 redukované na radikál $O_2^{\bullet-}$. Ďalšími zdrojmi superoxidového radikálu v organizme sú autooxidácie niektorých nízkomolekulárnych látok (glyceraldehyd, $FMNH_2$, $FADH_2$, adrenalín, noradrenalín, L-DOPA, dopamín, tetrahydrobiopterín, cysteín), predovšetkým v prítomnosti iónov železa, medi a mangánu, ktoré pôsobia ako katalyzátory týchto reakcií. Malé množstvo radikálu $O_2^{\bullet-}$ je uvoľňované aj po delokalizácii elektrónov hémovými proteínmi (hemoglobín, myoglobín) v komplexe s O_2 . Na produkcii superoxidového radikálu sa podieľajú aj niektoré enzýmy, a to cytochróm P450, niektoré oxidázy (xantínoxidáza, aldehydoxidáza), cyklooxygenázy a lipoxygenázy.

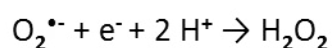
Hoci vo vodných roztokoch má superoxidový radikál aj slabé oxidačné vlastnosti, správa sa prevažne ako redukčné činidlo. Za fyziologických podmienok nie je tento radikál vysoko aktívny, v zmysle priameho atakovania iných biologických štruktúr. Miera oxidácie lipidov, proteínov a nukleových kyselín superoxidovým radikálom je preto v porovnaní s inými radikálmi zanedbateľná. Nebezpečenstvo jeho tvorby spočíva skôr v reakciách s inými radikálmi (kyslíkovými, dusíkovými), alebo iónmi železa, ktoré sú súčasťou proteínov (cytochróm C, feritín).

Kým u vyššie popísaných biologických dejov je produkcia superoxidového radikálu nežiaducim vedľajším produktom, niektoré bunky imunitného systému (neutrofilny, eozinofily, monocyty, makrofágy) produkujú $O_2^{\bullet-}$ zámerne, s cieľom usmrtiť patogény. V týchto fagocytoch je produkovaný superoxid vo väzikulách, ktoré fúzujú s fagozómami obsahujúcimi „pohltené“ patogény. Po rozpoznaní patogénu dochádza vo fagocytoch k tzv. respiračnému vzplanutiu, počas ktorého sa zvyšuje asi 50 násobne príjem kyslíka do fagocytu a nastáva oxidácia NADPH na $NADP^+$ za uvoľnenia dvoch elektrónov, ktoré redukujú O_2 za vzniku $O_2^{\bullet-}$:

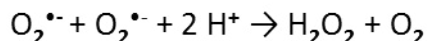


Vo fagozóme vzniká následne redukciou superoxidu peroxid vodíka, ktorý ľahko preniká cez bunkovú stenu baktérií a usmrcuje ich.

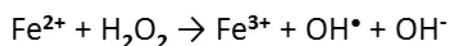
Jedoelektrónová redukcia superoxidového radikálu, ktorá prebieha spontánne, alebo môže byť katalyzovaná enzýmom superoxid dismutázou (SOD, enzýmový antioxidant, ktorý bude popísaný v kapitole 3, 3.1 Superoxid dismutázy) vedie k vzniku H_2O_2 :



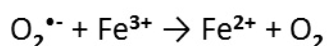
Hlavným zdrojom H_2O_2 *in vivo* je dismutácia superoxidových radikálov vo vodných roztokoch, ktorá konkuruje reakciám superoxidu s inými molekulami (tiež môže byť katalyzovaná SOD):



V menšej miere produkujú H_2O_2 aj oxidázy peroxizómov, či aminoroxidázy (monoamín-, diamín-oxidáza) a iné enzýmy. V organizme sa podľa výsledkov mnohých štúdií tvorí peroxid vodíka vo veľmi nízkych koncentráciách zrejme vo všetkých tkanivách. Peroxid vodíka má pomerne nízky oxidačný potenciál – neoxiduje nukleové kyseliny, lipidy a väčšinu proteínov, inhibuje však niektoré enzýmy oxidáciou tiolových skupín, dôležitých pre ich katalytickú aktivitu. H_2O_2 oxiduje aj hémové proteíny (hemoglobín a myoglobín), čo môže viesť až k uvoľňovaniu iónov železa a rozpadu tetrapyrrolového jadra hému. Toxicita peroxidu vodíka je daná najmä jeho vysokou stabilitou, bezproblémovým prechodom biologickými membránami a možnosťou rozkladu na hydroxylový radikál v prítomnosti iónov niektorých prechodných kovov (predovšetkým Fe^{2+} a Cu^+). Práve posledná uvedená reakcia je považovaná za najvýznamnejší zdroj vzniku OH^{\bullet} v biologických systémoch a je známa ako **Fentonova reakcia**:



Oxidovaný železitý ión je naspäť redukovaný pomocou $\text{O}_2^{\bullet-}$, alebo citrátu (**Haber-Weissova reakcia**):

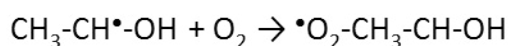
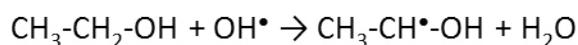


Rýchlosť Fentonovej reakcie je pomerne nízka, stúpa však pri naviazaní železa na nízkomolekulárne látky ako napríklad adenosín 5'-fosfát, či citrát.

In vitro, v laboratórnych podmienkach sa hydroxylové radikály pripravujú UV-indukovaným homolytickým štiepením H_2O_2 , či H_2O . Podobný proces je možné pozorovať aj *in vivo*, a to pri vystavení pokožky slnečnému žiareniu. Bolo dokázané, že hydroxylové radikály vznikajúce v dermálnych bunkách priamo poškodzujú ich DNA, čo má za následok starnutie pokožky.

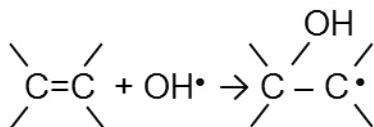
Na rozdiel od superoxidového radikálu a peroxidu vodíka je hydroxylový radikál jeden z najagresívnejších oxidantov spôsobujúcich závažné oxidačné poškodenia nukleových kyselín, lipidov aj proteínov. Vo všeobecnosti sú rýchlostné konštanty reakcií OH^{\bullet} s inými molekulami tak vysoké, že v konečnom dôsledku sú rýchlosti týchto reakcií kontrolované rýchlosťou difúzie OH^{\bullet} v biologických systémoch a prítomnosťou reakčného partnera v jeho blízkosti. Vysoká reaktivita OH^{\bullet} je jedným z dôvodov, prečo sa podieľa na vzniku a rozvoji veľkého množstva ochorení, tak ako je to uvedené v kapitole 6 (Úloha oxidačného stresu pri vzniku a rozvoji vybraných ochorení) (nádorové a neurologické ochorenia, chronický zápal, ateroskleróza, infarkt myokardu,...). Z chemického hľadiska sa hydroxylové radikály zúčastňujú na troch typoch reakcií, vedúcich k produkcii radikálov atakovaných molekúl:

1. **Odobratie protónu H^+** – príkladom je reakcia s alkoholmi, pri ktorých vznikajú hydroxyalkylové radikály, ktoré reagujú s kyslíkom za vzniku peroxylového radikálu:

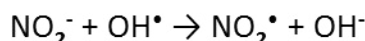


2. **Adícia** – najčastejšie prebieha v prítomnosti aromatických zlúčenín, alebo zlúčenín s násobnou

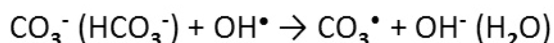
väzbou:



3. **Elektrónový transfer** – príkladom sú reakcie s halidmi a nitritmi:



Pri reakcii $\text{OH}\cdot$ s karbonátovými a bikarbonátovými iónmi vzniká karbonátový radikál $\text{CO}_3^{\cdot-}$, ktorý je dobrým oxidantom (ľahko akceptuje elektrón) pri jednoelektrónových prenosoch:



Medzi biologické štruktúry, ktoré karbonátový radikál oxiduje, patria kyselina hyalurónová, cysteín, tyrozín, metionín, NAD(P)H, kyselina askorbová a guanín. V porovnaní s $\text{OH}\cdot$ má však slabší účinok na oxidáciu lipidov, proteínov a nukleových kyselín.

Protonáciou $\text{O}_2^{\cdot-}$ vzniká najjednoduchší **peroxylový radikál** – $\text{HO}_2\cdot$ (všeobecné označenie je $\text{RO}_2\cdot$). Nebezpečenstvo vzniku peroxylových a **alkoxylových ($\text{RO}\cdot$) radikálov** spočíva predovšetkým v iniciáciách oxidácie mastných kyselín, ktorým odoberajú protón vodíka a spúšťajú tak reťazové reakcie peroxidácie lipidov.

V literatúre sa často v súvislosti s oxidačným stresom a kyslíkovými radikálmi vyskytuje skratka **ROS (reactive oxygen species = reaktívne formy kyslíka)**. Tento pojem zahŕňa okrem kyslíkových radikálov aj skupinu kyslíkových derivátov, ktoré nemajú charakter radikálu (napríklad H_2O_2 , singletový kyslík, či ozón (tab.1)), ale zohrávajú pri oxidačnom strese dôležitú úlohu. Teda kým všetky kyslíkové radikály sú ROS, nie všetky ROS sú kyslíkovými radikálmi. Pojem „reaktívny“ v označení ROS je však relatívny, nakoľko účinky niektorých ROS (H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$) nie sú založené na ich priamom ataku biologických štruktúr, ktoré sú v procese oxidačného stresu poškodené.

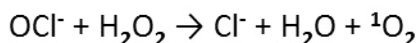
Tabuľka 1. Vybrané reaktívne formy kyslíka - ROS

Radikály	Neradikálové ROS
Superoxid (hyperoxid) $\text{O}_2^{\cdot-}$	Peroxid vodíka H_2O_2
Hydroperoxyl $\text{HOO}\cdot$	Singletový kyslík $^1\text{O}_2$
Hydroxyl $\text{OH}\cdot$	Ozón O_3
Peroxyl $\text{ROO}\cdot$	Kyselina chlórna HClO
Alkoxy $\text{RO}\cdot$	Kyselina brómna HBrO
Karbonát $\text{CO}_3^{\cdot-}$	
Karbón dioxid $\text{CO}_2^{\cdot-}$	

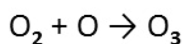
Ak sa v molekule kyslíka dva elektróny s paralelným spinom umiestnené v protiväzbových orbitáloch spárujú (teda jeden z elektrónov zmení spin), vzniká **singletový kyslík ($^1\text{O}_2$)**. Táto premena však neprebíha samovoľne, ale vyžaduje si prekonanie istej energetickej bariéry. Jedným z mechanizmov

vzniku singletového kyslíka je fotosenzitizácia - proces, pri ktorom po absorpcii žiarenia fotosenzitívnymi molekulami dochádza k jeho opätovnej emisii, pričom vyžiarená energia je využitá na excitáciu O_2 . Singletový kyslík môže následne atakovať aj molekulu fotosenzitizéra. Medzi fotosenzitívne molekuly patrí okrem iných aj celá skupina porfyrínov, zlúčenín z ktorých sa syntetizuje hém. Pri rôznych druhoch porfýrií (zväčša vrodené poruchy enzýmov syntézy hému) sa porfyríny hromadia v pokožke a po jej vystavení slnečnému žiareniu tak vzniká 1O_2 . Fotosenzitívny charakter majú aj niektoré liečivá (antidepresíva, tetracyklíny, fluorochinolónové antibiotiká), čo spôsobuje celú škálu ich nežiaducich účinkov, a preto sa pri ich užívaní pacientom neodporúča vystavovať sa slnečnému žiareniu.

Singletový kyslík vzniká aj ako intermediát počas peroxidácie lipidov, pri reakciách ozónu s niektorými biomolekulami, reakciou peroxylových radikálov a z peroxidu vodíka v prítomnosti chlórnanov:



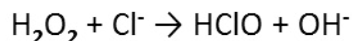
Reaktivita singletového kyslíka je daná jednak priamou chemickou reakciou s reakčným partnerom, a jednak predaním svojej excitačnej energie inej molekule, čím sa singletový kyslík vráti naspäť do základného stavu O_2 . Singletový kyslík reaguje predovšetkým s organickými zlúčeninami, ktoré majú v štruktúre konjugované väzby za vzniku endoperoxidov. Príkladom takýchto molekúl sú karotenoidy, aromatické aminokyseliny (tryptofán, histidín), puríny (guanozín) a mastné kyseliny. Je teda možné zhrnúť, že 1O_2 vyvoláva oxidačné poškodenie lipidov, proteínov aj nukleových kyselín. **Ozón (O_3)** je dráždivý plyn s typickým zápachom, ktorý je tvorený tromi atómami kyslíka. Dve väzby medzi atómami kyslíka v ozóne sú rovnocenné, ich energia a dĺžka zodpovedá prechodnému stavu medzi jednoduchou a násobnou väzbou. Ozónová vrstva, ktorá sa nachádza vo vyšších častiach atmosféry zabraňuje prieniku škodlivých lúčov UV-slnečného žiarenia na Zem. Chemicky sa v nej ozón tvorí po fotodisociácii kyslíkových molekúl, ktoré potom reagujú s ďalšími molekulami kyslíka:



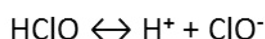
Na rozdiel od ozónosféry je prítomnosť ozónu v nižších častiach atmosféry nežiaduca. Ozón sa tu napriek tomu vyskytuje vo vysokých koncentráciách, a to najmä v oblastiach s vysokou frekvenciou automobilovej dopravy. Príčinou sú zmesi výfukových plynov (obsahujú oxidy dusíka a plynné uhľovodíky), vznikajúce spaľovaním pohonných hmôt, ktoré podliehajú fotosyntetickým reakciám za vzniku O_3 . V týchto procesoch vznikajú voľné atómy kyslíka, ktoré majú potenciál reagovať s molekulami O_2 podľa vyššie uvedenej reakcie.

Vystavenie ľudského organizmu O_3 vyvoláva podráždenie očí a slizníc a je spojené predovšetkým s rozvojom rôznych respiračných ochorení (kašeľ, astmatické záchvaty, ťažké dýchanie, zápal pľúc). Tieto stavy sú spôsobené vyvolaním zápalovej reakcie v pľúcach a aktiváciou makrofágov so zvýšenou infiltráciou neutrofilov do pľúcneho parenchýmu. Voľné radikály produkované neutrofilmi v pľúcach vyvolávajú následne ďalšie poškodenia pľúcneho tkaniva a prehlbujú rozvoj zápalu. Aj z hľadiska potenciálu atakovať iné biomolekuly je ozón považovaný za vysoko reaktívny plyn. Adíciou ozónu na dvojité väzby lipidov vznikajú ozonidy, ktoré sa rozkladajú na mimoriadne cytotoxické aldehydy. Ozón tiež priamo oxiduje mnohé aminokyseliny, čím spôsobuje poškodenie proteínov. Pri reakcii ozónu s niektorými biomolekulami (NADH, NADPH, albumín, kyselina močová) dochádza k tvorbe singletového kyslíka, čo opäť vedie k oxidačným poškodeniam biologických štruktúr. Vo vodnom roztoku sa O_3 môže rozkladať na OH^\cdot ; rýchlosť tejto reakcie je však pri fyziologickom pH pomerne nízka.

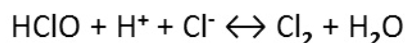
Medzi ROS sa zaraďuje aj **kyselina chlórna (HClO)**, oxidant, ktorý sa podieľa na dvojelektrónových prenosoch. HClO vzniká reakciou katalyzovanou enzýmom myeloperoxidázou z peroxidu vodíka:



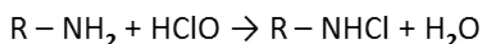
Kyselina chlórna je pri fyziologickom pH 7,4 asi na 50% ionizovaná na chlórne anióny:



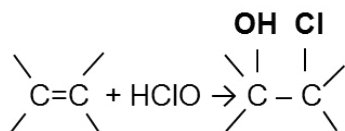
V kyslom prostredí sa HClO rozkladá za uvoľnenia chlóru, ktorý má antibakteriálne účinky a je produkovaný fagocytmi ako obranný mechanizmus organizmu v boji proti patogénom:



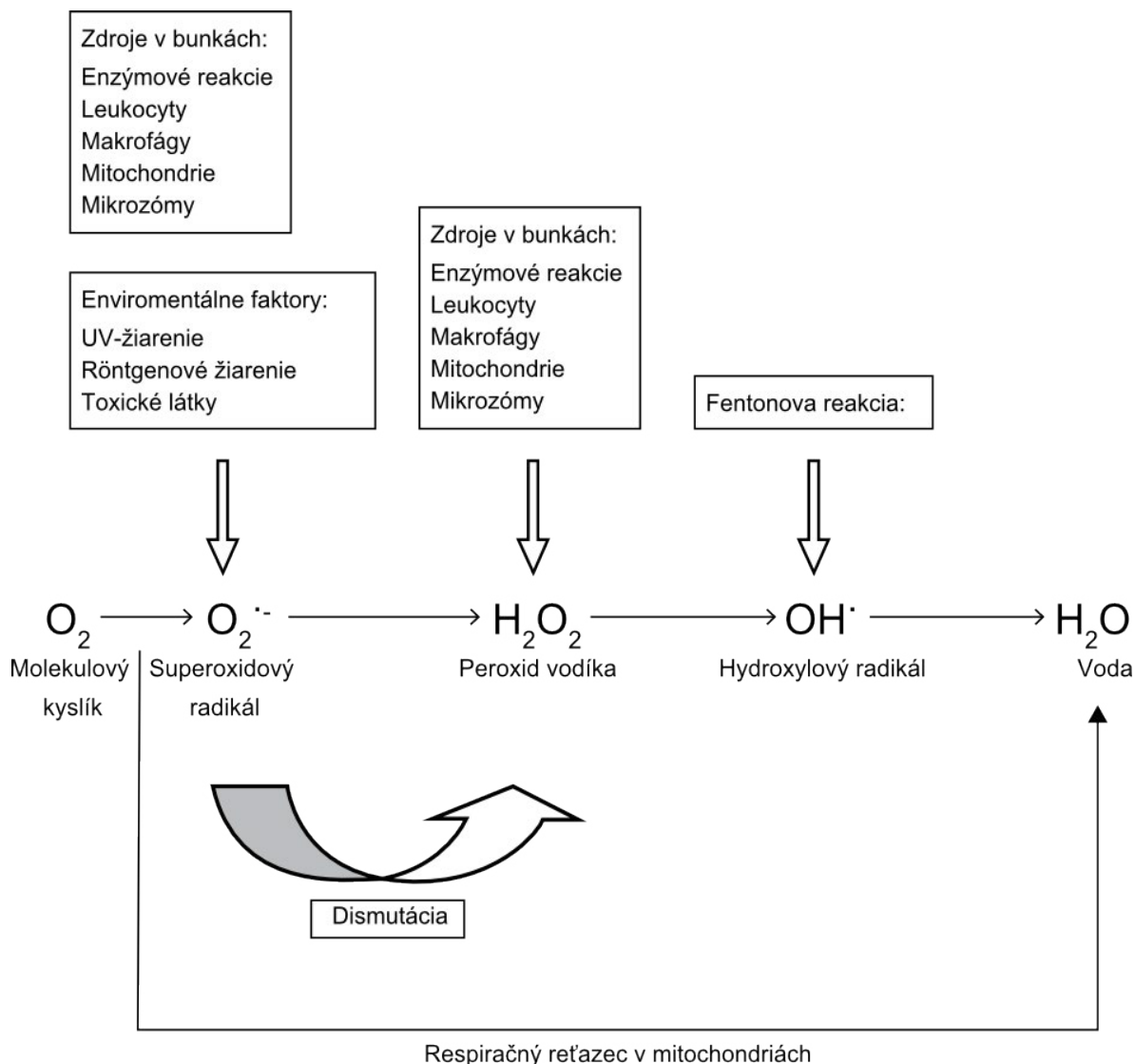
Kyselina chlórna patrí medzi najsilnejšie a najreaktívnejšie oxidačné činidlá, pričom ľahko preniká membránami. To sú dôvody prečo poškodzuje väčšinu molekúl, ktoré sa vyskytujú v jej blízkosti, medzi nimi tioly, kyselinu askorbovú, NAD(P)H, lipidy, proteíny a DNA. Poškodenie DNA a proteínov kyselinou chlórnu je spôsobené aj chloráciou niektorých báz (hlavne pyrimidínov) a aminokyselín (tyrozín). Pri reakciách kyseliny chlórnej s funkčnými skupinami na postranných reťazcoch aminokyselín (-NH₂, -SH) dochádza často k fragmentácii a agregácii proteínov. S amínmi reaguje kyselina chlórna za vzniku chlóraminov, ktoré si zachovávajú schopnosť oxidovať tioly, kyselinu askorbovú a metionín:



Adíciou kyseliny chlórnej na dvojité väzby v nenasýtených mastných kyselinách vznikajú **chlorohydríny**:



S podobnými adíciami sa stretávame aj u kyseliny brómnej (HBrO) za vzniku **bromohydrínov**. Okrem toho, že kyselina chlórna reaguje priamo s biomolekulami, ktoré tak poškodzuje a inhibuje ich funkciu, vstupuje aj do reakcií, pri ktorých dochádza k produkcii ďalších škodlivých ROS, napr. singletového kyslíka, hydroxylového radikálu, či nitrylchloridu. Oxiduje tiež nitrity na nitráty.



Obrázok 1. Zdroje reaktívnych foriem kyslíka

Superoxidový radikál a peroxid vodíka sú primárne zdroje reaktívnych foriem kyslíka v organizme. Hydroxylový radikál je produkovaný sekundárne Fentonovou reakciou.

1.1.2 DUSÍKOVÉ RADIKÁLY A REAKTÍVNE FORMY DUSÍKA

Podobne ako sa v literatúre stretávame s označením ROS, pre reaktívne formy dusíka je zaužívaná skratka **RNS (reactive nitrogen species = reaktívne formy dusíka)**, ktorá zahŕňa širokú škálu dusíkových derivátov, zúčastňujúcich sa na oxidačnom poškodení biologických štruktúr.

Oxid dusnatý ($\cdot NO$), ktorý je hlavným zástupcom RNS obsahuje v protiväzbovom π^*2p orbitále jeden voľný elektrón, a preto sa zaraďuje medzi radikály. Prvýkrát bol $\cdot NO$ identifikovaný v 80-tych rokoch dvadsiateho storočia a bol pomenovaný EDRF (endothelium-derived relaxing factor - od endotelu odvodený relaxačný faktor), na základe jeho schopnosti uvoľniť kontrahovaný hladký sval. Mechanizmus účinku $\cdot NO$ spočíva v aktivácii enzýmu guanylátcyklázy, ktorý katalyzuje vznik cyklického guanozín-5'-monofosfátu - druhého posla, zabezpečujúceho v bunke rôzne funkcie, medziiným aj relaxáciu hladkých svalov. Výskum $\cdot NO$ priniesol poznatky aj o jeho ďalších významných funkciách v organizme (tab.2), pričom pozoruhodná rôznorodosť biologických aktivít tejto molekule vyniesla v roku 1992 titul „molekula roka“, ktorý udeľuje vedecký žurnál „Science.“ V roku 1998 dostali Nobelovu cenu za medicínu prof. R. F. Furchgott, prof. L. J. Ignarro a prof. F. Murad za objavy spojené so signálnou funkciou $\cdot NO$ v rámci kardiovaskulárneho systému.

Tabuľka 2. Funkcie $\cdot\text{NO}$ v organizme

Orgán/dej, ktorý $\cdot\text{NO}$ ovplyvňuje	Funkcia $\cdot\text{NO}$	
Cievy	Kardiovaskulárny systém	- zlepšenie priechodu krvi cievami - inhibícia agregácie trombocytov
	Obličky	- zvýšený prietok krvi v oblasti glomerúl - zvýšená glomerulárna filtrácia
	Penis	- uvoľnenie z nervových zakončení a z endotelu ciev v oblasti penisu zabezpečuje erekciu
Črevá	- relaxácia hladkého svalu v črevnej stene	
Maternica	- relaxácia svalov maternice	
Zápal	- inhibícia exocytózy mediátorov zápalu endoteliálnymi bunkami, makrofágmi a cytotoxickými T-lymfocytmi	
Hormonálny systém	- stimulácia vylučovania hormónu uvoľňujúceho gonadotropín a adrenalínu	
Nervový systém	- neurotransmitter niektorých nervov parasimpatiku	
Predĺžená miecha	- stimulácia hĺbky a frekvencie dýchania	
Mozog	- stimulácia NMDA receptorov a dlhodobej pamäte	
Oplodnenie	- produkcia $\cdot\text{NO}$ spermiami pri vstupe do vajíčka zabraňuje vstupu ďalších spermií	
Usmrtenie patogénov	- pomoc pri usmrtení patogénov vo fagozómoch makrofágov - usmrtenie baktérií prijatých v potrave ($\cdot\text{NO}$ uvoľňovaný v žalúdku z NO_3^- pôsobením HCl)	

$\cdot\text{NO}$ je malá molekula plynného skupenstva, rozpustná čiastočne vo vode a veľmi dobre v organických rozpúšťadlách. Pretože nemá voľný náboj, ľahko difunduje membránami. *In vivo* vzniká $\cdot\text{NO}$ reakciami katalyzovanými skupinou enzýmov označovaných ako syntázy oxidu dusnatého (NOS) z aminokyseliny L-arginín (druhým produktom reakcie je L-citrulín). Existujú 3 hlavné podtypy NOS pomenované podľa tkanív, v ktorých boli prvýkrát detegované a charakterizované: neuronálna (nNOS), endotelová (eNOS) a induktabilná (iNOS). Všetky typy NOS sú NADPH-dependentné enzýmy, ktoré v prítomnosti kyslíka a kofaktorov (flavínadenínindinukleotid (FAD), tetrahydrobiopterín, hém a Ca^{2+} /kalmodulín) katalyzujú syntézu $\cdot\text{NO}$ z L-arginínu. Aktivita jednotlivých podtypov NOS je však regulovaná rozdielne. nNOS a eNOS sú konštitutívne enzýmy (ich expresia prebieha za všetkých fyziologických podmienok rovnakou rýchlosťou), kým iNOS aktivita je indukovaná len v zápalových ložiskách. Fyziologicky je aktivita všetkých NOS inhibovaná **asymetrickým N, N-dimetylarginínom (ADMA)**, ktorý je štruktúrnym analógom L-arginínu (nesie dve metylové skupiny na aminoskupine guanidínového rezidua), no po jeho naviazaní sa v aktívnom centre NOS zabraňuje syntéze $\cdot\text{NO}$. Zvýšené hladiny ADMA tak môžu viesť k zníženiu dostupného $\cdot\text{NO}$, potrebného na relaxáciu hladkých svalov, resp. zabezpečenie jeho ďalších vyššie spomínaných fyziologických funkcií. V súčasnosti je preto ADMA často študovaný v spojení s viacerými ochoreniami (tab.3). Výskum sa zameriava predovšetkým na kardiovaskulárne ochorenia, pretože hladiny ADMA signifikantne korelujú s niektorými ich rizikovými faktormi (hypertenzia, hypercholesterolémia). Napriek tomu, že nie je známy mechanizmus, ktorý vedie k zvýšeniu hladín ADMA v organizme, na základe výsledkov klinických štúdií sa predpokladá, že redukcia hladiny ADMA by mohla byť jedným z možných terapeutických miest zásahu pri liečbe kardiovaskulárnych ochorení (resp. iných ochorení, v ktorých patofyziológii má ADMA centrálnu postavenie).

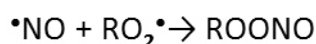
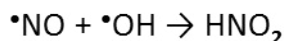
Aj zvýšená syntéza $\cdot\text{NO}$ však môže prispievať k vzniku a rozvoju viacerých ochorení (napr. zápalové,

nádorové, kardiovaskulárne ochorenia), a teda v týchto situáciách by bolo možné inhibičný účinok ADMA na NOS vnímať pozitívne. Z terapeutického hľadiska však stále ostáva otvorená otázka selektívnej inhibície patologicky zvýšených hladín $\cdot\text{NO}$ (týka sa to predovšetkým iNOS), pri zachovaní všetkých ostatných fyziologických procesov, v ktorých $\cdot\text{NO}$ zohráva dôležitú úlohu.

Tabuľka 3. Prehľad ochorení, pri ktorých sú zvýšené hladiny ADMA v plazme

Choroby, pri ktorých je signifikantne zvýšená hladina ADMA v plazme
Choroby kardiovaskulárneho systému: hypertenzia, ateroskleróza, kongestívne srdcové zlyhanie, zlyhanie obličiek spojené s kardiovaskulárnym zlyhaním
Diabetes mellitus
Plúcna hypertenzia a chronická tromboembolická plúcna hypertenzia
Hypercholesterolémia a hyperhomocysteinémia
Proteínúria, sekundárna amyloidóza a endoteliálna dysfunkcia
Alzheimerova choroba
Depresia

V medicíne sa na zvýšenie koncentrácie $\cdot\text{NO}$ v organizme pri liečbe vybraných ochorení vyplývajúcich predovšetkým z endotelovej dysfunkcie (angina pectoris, hypertenzia, ateroskleróza) aplikujú liečivá zo skupiny „donórov $\cdot\text{NO}$.“ Tieto organické látky – nitráty, nitrity a iné organické zlúčeniny dusíka (z ktorých veľmi známy je nitroglycerín) po vstupe do bunky uvoľňujú $\cdot\text{NO}$ za katalytickej účasti iónov prechodných kovov. Ukázalo sa, že okrem liečby endotelovej dysfunkcie spočíva prínos $\cdot\text{NO}$ molekúl vo vychytávaní iných voľných radikálov, čím môže predchádzať nežiaducim oxidáciám biologických štruktúr, ktoré tieto radikály zapríčínujú. Interakciou s $\cdot\text{OH}$ tak vzniká kyselina dusitá a s peroxylovými radikálmi tvorí $\cdot\text{NO}$ **peroxynitrity**:

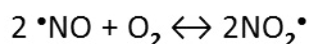


S tiolovými radikálmi tvorí oxid dusnatý **nitrozotioly**:



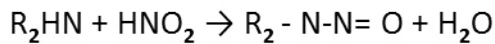
Nitrozotioly nemajú charakter radikálov, sú však tiež podskupinou RNS. $\cdot\text{NO}$ nereaguje s tiolmi priamo, ale cez oxidované intermediáty ($\text{ONOO}\cdot$, N_2O_3). Do skupiny nitrozotiolov patrí napríklad S-nitrozoglutation a S-nitrozocysteín, ktoré sú donormi $\cdot\text{NO}$ a zohrávajú tak dôležitú úlohu v signálnych dejoch.

Pri pomalej oxidácii kyslíkom vzniká z $\cdot\text{NO}$ veľmi dráždivý hnedastý plyn oxid dusičitý ($\text{NO}_2\cdot$), ktorý pri ďalšej reakcii s $\cdot\text{NO}$ vo vodných roztokoch tvorí nitrit (NO_2^-):

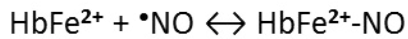


Nitrity (NO_2^-) vznikajú v organizme aj redukciami nitrátov (NO_3^-) prijatých v diéte. Deoxyhemoglobín je schopný redukovať nitrity na $\cdot\text{NO}$, čo je mechanizmus dôležitý pre zabezpečenie relaxácie hladkého svalstva v stave hypoxie, pri ktorom O_2 -dependentná NOS nie je schopná syntetizovať $\cdot\text{NO}$. Nitrity

zároveň pomáhajú rozkladať vysoko reaktívnu kyselinu chlórnu, teda ich fyziologické funkcie majú značný význam. Negatívne účinky nitritov vyplývajú z ich reakcií s amínmi, pri ktorých vznikajú potenciálne karcinogénne **nitrozamíny**:

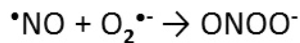


Na rozdiel od pomalej oxidácie atmosférickým kyslíkom *in vitro*, $\cdot NO$ je *in vivo* vo vaskulárnom systéme veľmi rýchlo odstraňovaný naviazaním sa na hémovú skupinu hemoglobínu za tvorby komplexu s Fe^{2+} :

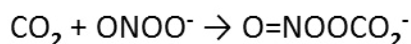


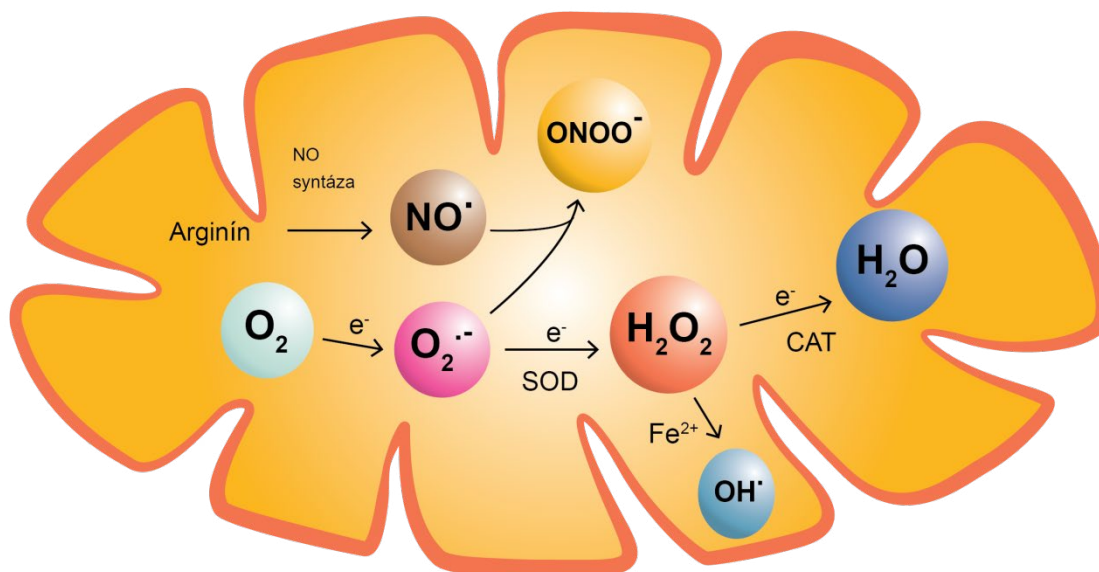
Rýchla reakcia s hemoglobínom zodpovedá za krátky biologický polčas $\cdot NO$ v krvi (1,8 ms).

Oxidáciou $\cdot NO$ superoxidovým radikálom sa tvorí stabilný toxický anión **peroxynitrit** ($ONOO^-$), ktorý oxiduje väčšinu biologických štruktúr – lipidov, proteínov i nukleových kyselín:



Bolo dokázané, že množstvo negatívnych účinkov v minulosti prisudzovaných $\cdot NO$ je sprostredkovaných práve peroxynitritom. Peroxynitrit zapríčiňuje v bunkách rozpad $-SH$ skupín (ktoré majú antioxidačné účinky), oxidáciu a nitráciu lipidov, rozpad DNA, nitráciu a deamináciu báz nukleových kyselín (najmä guanínu). Nitrácia aromatických aminokyselín (tyrozín, tryptofán, fenylalanín) vedie k strate funkcie proteínov a v prípade tyrozínových reziduí môže inhibovať ich fosforyláciu tyrozínkinázami, a tak zasahovať do aktivity signálnych transdukčných dráh. Peroxynitrit je toxický aj pre hemoglobín, ktorý sa v jeho prítomnosti oxiduje na methemoglobín. Oxidácii peroxynitritom podliehajú aj mnohé metabolické enzýmy, či štruktúrne proteíny. Napriek širokému spektru potenciálnych reakčných partnerov, peroxynitrit je podobne ako $\cdot NO$ pomerne stabilný a nereaguje s biologickými štruktúrami priamo. V prvom kroku tvorí v prítomnosti CO_2 **nitrozoperoxykarbonát**, ktorý zodpovedá za väčšinu jeho negatívnych účinkov:





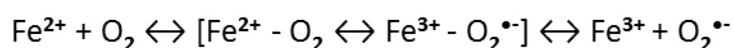
Obrázok 2. Tvorba peroxynitritu v mitochondriách

Peroxynitrit, silné oxidačné činidlo väčšiny biomakromolekúl sa tvorí reakciou medzi voľným radikálom superoxidu a oxidom dusnatým. Z peroxynitritu môže vzniknúť ďalšími reakciami vysoko reaktívny hydroxylový radikál. SOD = superoxid dismutáza, CAT = kataláza. http://www.mitosciences.com/oxidative_stress.html

1.1.3 PRECHODNÉ KOVY – ŽELEZO, MEĎ, MANGÁN

Nakoľko niektoré prvky z d-skupiny (prechodné kovy) periodickej tabuľky nesú vo svojom vonkajšom orbitále jeden nespárený elektrón, môžeme ich zaradiť do skupiny voľných radikálov. Pretože mnohé prvky zo skupiny prechodných kovov sú schopné ľahko prijať a odovzdať elektróny za vzniku iónov, slúžia ako transportéry voľných elektrónov. Tento fakt stavia prechodné kovy do úlohy katalyzátorov mnohých oxidačných reakcií. Napríklad pri jedoelektrónovom prenose na molekulu O₂ (vznik superoxidového radikálu) sa výrazne zvyšuje jeho reaktivita s biologickými štruktúrami, teda prechodné prvky výrazne zvyšujú oxidačný potenciál niektorých molekúl. Navyše tieto prvky katalyzujú aj mnohé autooxidačné reakcie a reakcie vedúce k vzniku OH[•] (Fentonova reakcia).

Železo má v základnom stave 4 nespárené elektróny v 3d orbitále, často sa však vyskytuje vo forme železnatých iónov - Fe²⁺, železitých iónov - Fe³⁺ a železičitých iónov - Fe⁴⁺. Najstabilnejšie z vyššie uvedených iónov sú Fe³⁺, preto reaktivita druhých dvoch typov iónov smeruje k stavu Fe³⁺, z čoho vyplýva, že Fe²⁺ majú mierne redukčné účinky a Fe⁴⁺ ióny sú silné oxidačné činidlá. V prítomnosti O₂ teda železnaté ióny generujú vznik superoxidového radikálu:

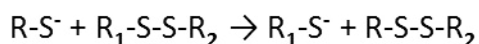


Reakcia je vratná, nakoľko železo dokáže elektróny prijímať aj odovzdávať, rovnováha je však posunutá v prospech stabilnejších iónov Fe³⁺. Pokiaľ sa Fe²⁺ ióny viažu na ligandy a všetky 4 pôvodne nespárené elektróny sa spárujú s reakčným partnerom, železo sa dostáva do nízkoenergetického stabilného stavu, v ktorom je ťažko oxidovateľné. Príkladom sú hémové proteíny s naviazaným kyslíkom - oxyhemoglobín a oxymyoglobín.

Med' síce neobsahuje nespárené elektróny, ale ľahko prijíma a odovzdáva elektróny, čo ju zaraďuje podobne ako iné prechodné prvky medzi voľné radikály. Med' sa vyskytuje v biologických systémoch prevažne vo forme meďných a meďnatých katiónov. K prechodným prvkom s oxidoredukčnými vlastnosťami patrí aj mangán, ktorý je stabilný vo vodných roztokoch ako Mn^{2+} . V biológii sa stretávame aj so zlúčeninami s vyšším oxidačným číslom (Mn^{3+} , Mn^{4+} , Mn^{7+}). Podobne ako Cu^{2+} aj ióny Mn^{2+} zabezpečujú dismutáciu superoxidového radikálu za vzniku H_2O_2 . Na rozdiel od iónov železa a medi sa Mn^{2+} nepodieľajú na tvorbe hydroxyloých radikálov z H_2O_2 (Fentonova reakcia).

1.1.4 RADIKÁLY SÍRY

Alifatické tioly (R-SH) sa nachádzajú v živých organizmoch vo vysokých koncentráciách, hladiny najtypickejšieho tiolu - tripeptidu glutatiónu (γ -glutamylcysteinylglycín) sa pohybujú v rozmedzí 5-10 mmol/L. Pri fyziologickom pH sa tioly nachádzajú v neionizovanom stave, pri zvýšení pH však vznikajú tioláty ($R-S^-$), jedny z najreaktívnejších funkčných skupín, ktoré sa nachádzajú v proteínoch. Môžu reagovať ako nukleofily a atakovať disulfidové väzby za vzniku nových tiolátov a disulfidov. Pri uvedených reakciách dochádza vlastne k oxidácii pôvodného tiolu a redukcii atakovanej disulfidovej väzby:



Uvedená oxidoredukčná reakcia má široký biologický význam pri enzýmových katalýzach, ochrane pred oxidačným poškodením, či stabilizácii extracelulárnych proteínov.

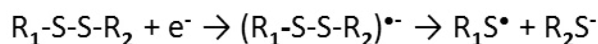
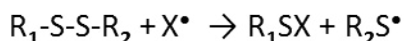
Z tiolových skupín sa môžu tvoriť za určitých podmienok **tiolové radikály (RS^\bullet)**. Pri fyziologických procesoch vznikajú ako intermediáty, zabezpečujúce reakčný mechanizmus niektorých enzýmov. Príkladom je syntéza DNA, pri ktorej tiolové radikály v aktívnom centre ribonukleotidovej reduktázy umožňujú jej katalytickú aktivitu. V bunkách však dochádza k vzniku tiolových radikálov bez fyziologickej funkcie, ktorých prítomnosť v organizme nie je žiaduca. Najčastejšie sa tiolové radikály tvoria pri reparácii oxidačného poškodenia DNA, pri ktorom vznikajú uhlíkové radikály ako následok poškodenia C-H väzby. Pretože tiolová skupina je dobrým donormom vodíka, odovzdáva ho na molekulu DNA (čím ju reparuje), za vzniku tiolového radikálu:



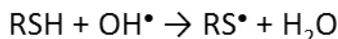
Podobnú „opravnú“ funkciu majú tiolové skupiny aj v reakciách s peroxyloými a inými radikálmi.

Ďalšie cesty, ktorými môžu vznikať tiolové radikály sú:

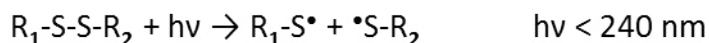
reakcie disulfidov s inými voľnými radikálmi, resp. ich jednoelektrónové redukcie:



reakcie tiolov s inými voľnými radikálmi (kyslíka, dusíka), resp. jednoelektrónové oxidácie s iónmi prechodných kovov (Fe^{3+} , Cu^{2+}), pričom ako sprievodné produkty vznikajú príslušné hydridy a tioétery:



v laboratórnych podmienkach je možné pripraviť tiolové radikály homolytickým štiepením disulfidovej väzby, ale aj tioéterov ($\text{R}_1\text{-S-R}_2$) a tioesterov (R-COS^\bullet):



V minulosti sa predpokladalo, že reaktivita tiolových radikálov je nízka, nakoľko spolu zreagujú za vzniku disulfidov. Nie je to však celkom pravda, nakoľko koncentrácie týchto radikálov sú príliš nízke, aby došlo k ich stretu. Za vychytávanie tiolových radikálov za fyziologických podmienok zodpovedá kyselina askorbová (AscH_2 , vitamín C), ktorá ionizuje na askorbát (AscH^-) a reakciou s tiolovými radikálmi tvorí askorbátový radikál:



Tiolové radikály majú deštruktívny účinok na iné makromolekuly, predovšetkým lipidy, ale aj aminokyseliny a karbohydráty. V anaeróbnom prostredí tiolové radikály indukujú izomerizáciu prirodzene sa vyskytujúcich *cis* násobných väzieb v mono- a polynenasýtených mastných kyselinách a vedú k vzniku zmesi s prevahou *trans* izomérov. Výskyt *trans* izomérov mastných kyselín je spájaný s etiológiou rôznych metabolických a funkčných ochorení, predovšetkým so zmenami lipidového metabolizmu (zvýšenie LDL a zníženie HDL cholesterolu) a rizikom výskytu ischemickej choroby srdca. Aj keď presný mechanizmus týchto zmien nie je známy, predpokladá sa, že u *trans* izomérov dochádza k zmenám metabolizmu mastných kyselín. Pretože *trans* izomerizácia mastných kyselín spôsobuje aj zmeny ich priestorového usporiadania - neumožňuje ich ohyb ako je to v prípade *cis* väzby, má značný vplyv aj na fyzikálne vlastnosti membrán, ktorých súčasťou sú fosfolipidy nesúce mastné kyseliny.

Tiolové radikály cysteínu často spúšťajú iniciačnú fázu peroxidácie mastných kyselín a podieľajú sa na oxidácii deoxyribózy, v oboch prípadoch abstrahovaním atómu vodíka. DNA poškodzujú aj radikály cysteamínu, reakciou s bázami tymínu.

Tiolové radikály tvoria v prítomnosti kyslíka vysoko reaktívne sulfonylové radikály $-\text{SO}_2^\bullet$, ktoré sú ďalej oxidované na sulfonylperoxylové radikály $\text{RSO}_2\text{OO}^\bullet$. Tento proces sa môže odohrávať aj na rezidue cysteínu, ktorý je stavebnou zložkou proteínov.

1.2 OXIDAČNÝ STRES A OXIDAČNÉ POŠKODENIE BIOLOGICKÝCH ŠTRUKTÚR

Oxidačno-redukčné reakcie sú nutnou súčasťou metabolizmu každej bunky v organizme. Volné radikály, ktoré pri týchto reakciách vznikajú, môžu atakovať rôzne biologické štruktúry a zapríčiniť ich oxidačné poškodenie. Ako **oxidačný stres (OS)** sa označuje stav, pri ktorom tvorba voľných radikálov prevažuje nad antioxidačnými kapacitami organizmu. Oxidačné poškodenie je príčinou, ale aj následkom mnohých patofyziologických procesov, preto sú reakcie voľných radikálov s biomolekulami v súčasnosti predmetom tak intenzívneho výskumu. Medzi biomakrobiomolekuly, ktoré ľahko podliehajú voľnoradikálovým reakciám vedúcim k narušeniu ich štruktúry a funkcie patria predovšetkým lipidy a nukleové kyseliny.

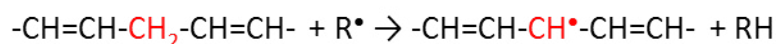
1.2.1 PEROXIDÁCIA LIPIDOV

Poznatky o peroxidácii lipidov a o zatuchnutých tukoch (žltnutie a typický zápach u starých tukov) boli známe v potravinárskom priemysle už začiatkom devätnásteho storočia, no o následkoch podobnej peroxidácie lipidov v biologických systémoch a ich vplyve na zdravie sa začalo diskutovať až v polovici dvadsiateho storočia. Vychádzajúc zo základných funkcií lipidov v bunke (kde sa uplatňujú ako stavebné štruktúry bunkových membrán, signálne molekuly a zásobníky energie) je zrejmé, že ich poškodenie môže viesť až ku kolapsu bunkového metabolizmu a bunkovej smrti - apoptóze. Následkom peroxidácie lipidov endoplazmatického retikula je únik vápenatých iónov do cytoplazmy a strata kontroly nad reguláciou aktivity Ca^{2+} -dependentných enzýmov, ktorých aktivita je riadená hladinami vápenatých iónov v cytoplazme. Zvýšené hladiny Ca^{2+} iónov tiež stimulujú $\cdot\text{NO}$ syntázu, teda aj hladiny $\cdot\text{NO}$, ktorý vyvoláva oxidačné poškodenie. Peroxidácia lipidov v membráne mitochondrií narušuje energetický metabolizmus v bunke, kým poškodenie fosfolipidovej dvojvrstvy bunkovej membrány vedie k uvoľňovaniu malých molekúl do extracelulárneho prostredia, poruchám funkcie membránových receptorov, až ruptúre membrány.

Peroxidácia lipidov je reťazová reakcia katalyzovaná najčastejšie iónmi prechodných kovov, pri ktorej dochádza k oxidácii polynenasýtených mastných kyselín. Prebieha v troch základných krokoch:

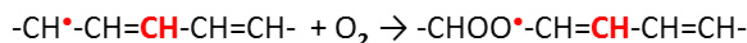
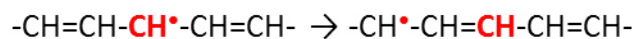
1. Iniciácia peroxidácie lipidov

V tejto fáze silné oxidanty (zväčša voľné radikály vznikajúce pri oxidačno-redukčných reakciách, resp. produkty fagocytov) atakujú násobné väzby polynenasýtených mastných kyselín, ktorým odoberajú z metylénovej skupiny atóm vodíka za vzniku **lipidového C-radikálu** (nespárený elektrón nesie atóm uhlíka):



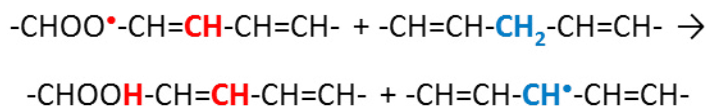
Oxidačným činidlám podliehajú častejšie mastné kyseliny s menej stabilnými konjugovanými násobnými väzbami (linolová, linolénová, arachidónová) než mastné kyseliny s jednou, stabilnejšou násobnou väzbou (olejová). Náchylnosť mastných kyselín podľahnúť oxidačnému efektu je daná nielen pevnosťou väzieb, ale aj stúpajúcim počtom násobných väzieb, s ktorým sa zvyšuje pravdepodobnosť stretu s radikálom. Medzi voľné radikály, ktoré vyvolávajú iniciáciu peroxidácie, patrí v menšej miere peroxylový radikál, no jej najčastejším spúšťačom je hydroxylový radikál, a preto všetky cesty jeho tvorby popísané vyššie sú potenciálnou hrozbou pre spustenie reťazovej reakcie peroxidácie lipidov.

Iniciačná fáza je zakončená stabilizáciou lipidového radikálu tautomerizáciou násobnej väzby – a jeho prechodom na konjugovaný dién, ktorý reaguje s kyslíkom za vzniku **lipidového peroxylového radikálu (LOO \cdot)**:



2. Propagácia peroxidácie lipidov

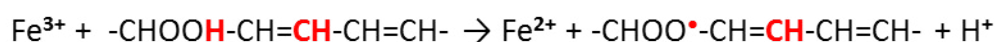
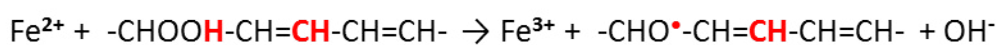
V tomto kroku peroxylové radikály atakujú metylénové skupiny ďalších polynenasýtených mastných kyselín, tentokrát prijímajú atóm vodíka, za vzniku **lipidových hydroperoxidov (LOOH)** a nových lipidových C-radikálov:



Nový radikál môže opäť reagovať s kyslíkom za tvorby $\text{LOO}\bullet$ a viesť k ďalšej propagácii, čím stúpa geometrickým radom počet atakovaných molekúl mastných kyselín. V LDL časticiach môže jediný lipidový C-radikál vyvolať oxidáciu ďalších 30-50 molekúl nenasýtených mastných kyselín.

1.2.1.1 ÚLOHA IÓNOV PRECHODNÝCH KOVOV PRI PEROXIDÁCII LIPIDOV

Ióny prechodných kovov (hlavne železa a medi) ovplyvňujú peroxidáciu lipidov v iniciačnej a propagačnej fáze. K iniciačnej fáze prispievajú zvýšenou generáciou ROS, kým v propagačnej fáze Fe^{2+} a Fe^{3+} (viazané na ligandy) reagujú s lipidovými hydroperoxidmi za vzniku alkoxylov alebo peroxylov, ktoré ďalej rozširujú propagačnú fázu:



Chelatačné činidlá schopné vytvárať komplexy s iónmi železa sú preto schopné zastaviť peroxidáciu lipidov v biomembránach. Naopak, pri ochoreniach spojených so zvýšenými hladinami železa môže dochádzať k iniciácii a propagácii peroxidačných reakcií, čím sa zvyšuje riziko oxidačného poškodenia. Týka sa to napríklad neurodegeneratívnych ochorení, pri ktorých sa vyskytujú zvýšené hladiny železa v mozgu. Zvýšené hladiny meďnatých iónov zasa potencujú peroxidáciu lipidov v LDL časticiach.

3. Terminácia peroxidácie lipidov

Propagačná fáza môže byť zakončená vzájomnou reakciou medzi dvoma lipidovými radikálmi, rozkladom lipidového hydroperoxidu, alkoxylov a peroxylov (za vzniku škodlivých vedľajších produktov), alebo ju môžu ukončiť lipofilné antioxidačné činidlá (napr. α -tokoferol), opäť za vzniku hydroperoxidu.

Nebezpečenstvo peroxidácie lipidov nie je dané len poškodením štruktúry a funkcie mastných kyselín, ale aj vznikom niektorých škodlivých vedľajších produktov, ktoré vznikajú v jednotlivých fázach peroxidácie. Medzi vedľajšie produkty terminácie lipidovej peroxidácie patria prchavé plynné alkány. Tvoria sa pri beta štiepení lipidových alkoxyradikálov za účasti katalýzy iónov prechodných kovov. Od umiestnenia násobnej väzby v mastných kyselinách závisí, aké alkány vznikajú. Najčastejšie sa vyskytujúce ω -3, ω -4, ω -6 a ω -7 mastné kyseliny tak vedú po rozklade k uvoľneniu etánu, propánu, pentánu a hexánu. Tieto plyny je možné stanoviť vo vydychovanom vzduchu u zvierat alebo ľudí pomocou plynovej chromatografie. Aj keď spoľahlivosť a výpovedná hodnota stanovenia alkánov vo výdychu je diskutabilná (kapitola 4, 4.3.1 Markery peroxidácie lipidov), je to jedna z mála metód, ktoré umožňujú stanoviť produkty oxidačného poškodenia *in vivo*. Zvýšené hladiny niektorých alkánov boli zaznamenané pri rôznych stavoch, ktoré súvisia so zvýšeným oxidačným stresom. Mnohé klinické štúdie prezentovali stúpajúce koncentrácie etánu a pentánu s narastajúcim vekom, ako aj s viacerými ochoreniami (sclerosis multiplex, alkoholickou cirhózou, Crohnovou chorobou, ulceratívnou kolitídou, deficienciou či nadbytkom železa,...). Kým alkány predstavujú len malú časť vedľajších produktov peroxidácie lipidov, zmes aldehydov, ketónov, hydroxyaldehydov a epoxidov je naopak zastúpená v najvyššej miere. Štruktúry aldehydov, ktoré vznikajú pri peroxidácii lipidov, závisia od štruktúry pôvodnej kyseliny (počet uhlíkov, počet a poloha násobných väzieb). Túto skupinu však často zastupujú malondialdehyd, hexanal, 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal (4-HNE), 4-hydroxy-2,3-trans-hexenal (4-HHE) a 2-propenal (akroleín). Aldehydy a ketóny je možné tiež stanoviť pomocou viacerých me-

tód, o ktorých bude pojednávať kapitola 4. Na rozdiel od alkánov, aldehydy sú vysoko toxické látky, ktorých pôsobenie na biologické štruktúry umocňuje negatívne následky vlastnej peroxidácie lipidov. Vybrané negatívne účinky aldehydov uvádza tabuľka 4.

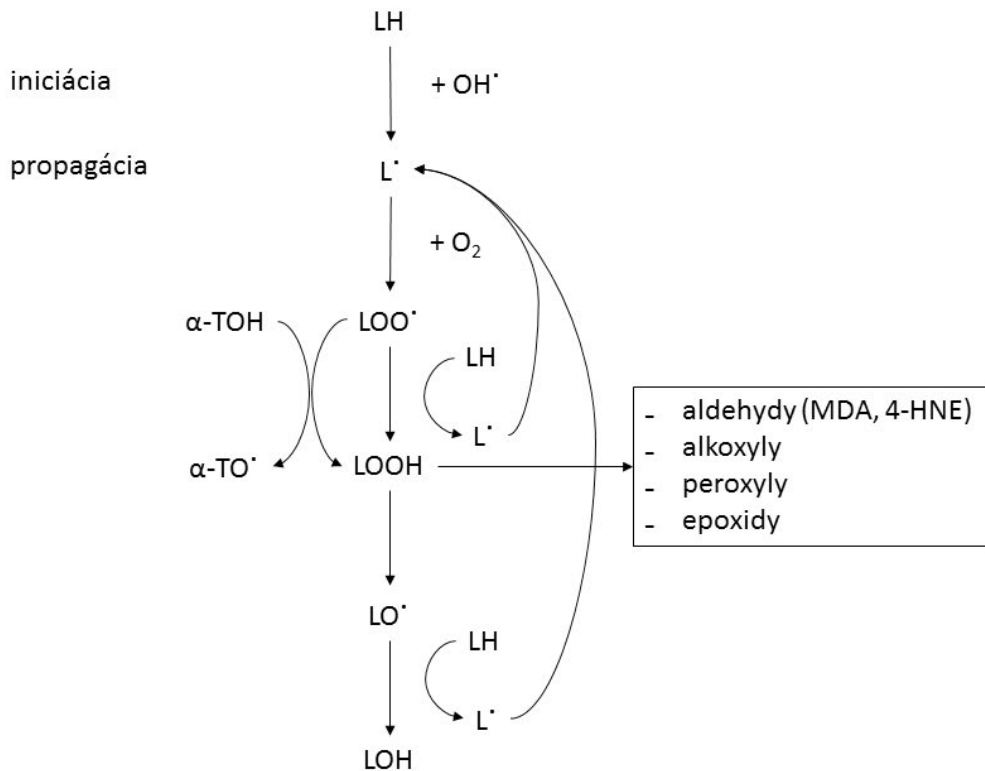
Tabuľka 4. Účinky aldehydov ako vedľajších produktov peroxidácie lipidov

Typ aldehydu	Biologický účinok
Dialdehydy	Väzba na proteíny membrán, asociácia proteínov – inhibícia ich funkcie
MDA	Väzba na hemoglobín, inhibícia prenosu kyslíka
4-HNE	Inhibícia syntézy DNA a proteosyntézy, väzba na proteíny, inhibícia ich funkcie
4-HHE	Neurotoxické účinky (vysoké koncentrácie boli zaznamenané v mozgu u pacientov s Alzheimerovou a Parkinsonovou chorobou), väzba na proteazóm a inhibícia jeho funkciu (dochádza tak aj k akumulácii oxidačne poškodených proteínov v bunke)
Akroleín	Reakcia s nukleofilmi (guanín, cysteín, lyzín, histidín, arginín) vedie k ovplyvneniu štruktúry a funkcií DNA, jadrových faktorov, proteáz a iných proteínov. Komplexy biomolekúl s akroleínom vedú k vzniku mutácii, zmenám génovej transkripcie a apoptóze.

Okrem autooxidačných reakcií mastných kyselín, vyvolaných voľnými radikálmi, podliehajú mastné kyseliny aj fotooxidácii a enzýmovej oxidácii. Pri fotooxidácii sú nenasýtené mastné kyseliny oxidované v prítomnosti senzitizera (porfyríny, myoglobín, riboflavín, bilirubín) singletovým kyslíkom, ktorý vzniká fotosenzitizáciou kyslíka. Mastné kyseliny sú väčšinou oxidované na uhlíkoch poslednej násobnej väzby (u väčšiny esenciálnych mastných kyselín sa vyskytuje na uhlíku č.12), preto vznikajú 12- alebo 13-hydroperoxydy. Enzýmovú peroxidáciu lipidov katalyzujú lipoxygenázy a cyklooxygenázy. Lipoxygenázy zabezpečujú syntézu hydroperoxidov, ktoré sú dôležitými intermediátmi metabolických procesov s vlastnou biologickou aktivitou, kým cyklooxygenázy katalyzujú syntézu endoperoxidov, z ktorých vznikajú prostaglandíny s širokou škálou biologických efektov.

Podobne ako mastné kyseliny môže byť viacerými cestami (autooxidáciou, fotooxidáciou alebo enzýmovou oxidáciou) oxidovaný aj cholesterol za vzniku oxysterolov. Reakciou cholesterolu s ROS vzniká najčastejšie 7 α -OH alebo 7 β -OH cholesterol, ktorý sa oxiduje na 7-keto cholesterol a C-5 a C-6 oxygenované deriváty cholesterolu. Tieto zlúčeniny sú vysoko toxické a majú pro-zápalové a pro-apoptické účinky.

Pri radikálovej peroxidácii kyseliny arachidónovej (kyselina 5,8,11,14-ikozetetraénová) vzniká skupina izomérnych zlúčenín štruktúrne podobných prostaglandínom, ktoré sú označované ako **F₂-izoprostány**. Oxidáciou najrozšírenejšej nenasýtenej kyseliny v centrálnom nervovom systéme (CNS) – kyseliny dokosahexánovej (C22:6 ω 3) vznikajú izoprostanové deriváty, označované ako **neuroprostány**, ktoré sú ukazovateľmi oxidačného poškodenia v CNS. Predpokladá sa, že z fosfolipidov sú izoprostány uvoľňované pôsobením fosfolipáz. Dôležitým aspektom objavu týchto molekúl bolo získanie ďalšej cesty, ktorou je možné stanoviť oxidačný status *in vivo*. Ich objavením sa tak rozšírili možnosti výskumu vzťahov medzi ochoreniami a oxidačným stresom. Izoprostány nie sú len markermi oxidačného stresu, ale predpokladá sa, že sú aj vlastnými mediátormi oxidačného poškodenia. Najviac poznatkov je k dispozícii o často študovanom 15-F_{2t}-izoprostáne, ktorý má výrazný vazokonstrikčný účinok prejavujúci sa na spazmoch hladkého svalstva ciev (dokázaný na pľúcnej artérii, cievach sietnice a portálnej véne), ale aj hladkého svalstva niektorých orgánov. Nadprodukcia F₂-izoprostánov prispieva preto ku bronchokonstrikcii, zníženému prietoku krvi pri hepatorenálnom syndróme, hypoxicko-ischemickej encefalopatii a ďalším ochoreniam. Bolo dokázané, že hoci sa 15-F_{2t}-izoprostán viaže na zatiaľ málo charakterizované receptory, jeho účinky je možné eliminovať aj antagonistami A₂-tromboxánového receptora, čo vysvetľuje mechanizmus účinku niektorých jeho biologických aktivít.



Obrázok 3. Schéma peroxidácie lipidov

Pri iniciácii peroxidácie sú mastné kyseliny (LH) atakované voľnými radikálmi za tvorby alkylového C-radikálu (L^{\cdot}). Jeho oxidáciou vzniká peroxylový radikál (LOO^{\cdot}), ktorý je stabilizovaný reakciou s ďalšou mastnou kyselinou za tvorby lipidového hydroperoxidu (LOOH), zároveň sa však tvorí aj nový alkylový C-radikál, ktorý podlieha oxidácii. Nestabilné lipidové hydroperoxydy sa rozkladajú na toxické produkty.

1.2.2 OXIDAČNÉ POŠKODENIE PROTEÍNOV

Výskum v oblasti oxidačného poškodenia proteínov začal až začiatkom 90-tych rokov 20. storočia. Zistilo sa, že na rozdiel od celej škály mechanizmov, ktoré sú určené na reparáciu DNA, pre prípad oxidačného poškodenia proteínov bunky disponujú len niekoľkými opravnými mechanizmami. Je tomu tak preto, že poškodené proteíny sú zvyčajne označené a podstupujú degradáciu sprostredkovanú endogénnymi proteázami (katepsín c, kalpain, trypsín, proteazómy,...). Pri zvýšenom oxidačnom strese preto bunky stimulujú expresiu proteáz, čím zabezpečujú rýchlejší rozklad proteínov určených na degradáciu a zabraňujú tak akumulácii poškodených proteínov. Neoxidované (nepoškodené) aminokyseliny sú potom opätovne využité na syntézu nových proteínov. Oxidácia proteínov vedie k narušeniu ich rozmanitých funkcií v organizme – v úlohe receptorov, prtilátok, signálnych molekúl a samozrejme enzýmov.

Proteíny môžu byť oxidované reaktívnymi formami kyslíka aj dusíka, produktmi lipidovej peroxidácie a oxidácie sacharidov a oxidačnými systémami, na ktorých sa podieľajú ióny kovov. Vo všeobecnosti sú aminokyseliny v proteínoch oxidované buď na ich bočných reťazcoch alebo na hlavnej kostre, čo vedie k vytváraniu krížových väzieb medzi proteínmi a k ich fragmentácii.

Za oxidácie proteínovej kostry sú najčastejšie zodpovedné hydroxylové radikály. Atakujú peptidové väzby a za odobratia vodíka vytvárajú na polypeptidovej kostre uhlíkový radikál, ktorý reaguje

s kyslíkom za vzniku intermediátu – alkylperoxylového radikálu (C-O-O•). Tento prechádza postupne na alkylperoxid (C-O-O-H) a alkoxylový radikál (C-O•), ktorý sa ľahko štiepi a preto je jeho vznik predpokladom pre fragmentáciu proteínov. Intermediáty, ktoré majú charakter radikálu (COO•, CO•), nemusia vždy nasledovať uvedený reakčný reťazec, ale môžu atakovať polypeptidový reťazec na inom mieste a vyvolať ďalšie oxidácie. V neprítomnosti kyslíka reagujú spolu uhlíkové radikály dvoch proteínov, čím vytvárajú rôzne krížové väzby a vznikajú tak proteínové agregáty. Toto narušuje sekundárne a vyššie štruktúry proteínov. K fragmentácii proteínov dochádza aj priamo po oxidácii bočného reťazca aminokyselín glutamátu, aspartátu a prolínu. Fragmentácia proteínov, ich reakcie s aldehydmi (ktoré vznikajú peroxidáciou lipidov) a karbonylovými derivátmi (glykačné reakcie s ketoamínmi, ketoaldehydmi) vedú k zabudovaniu karbonylových skupín do proteínov. Výskyt karbonylovaných proteínov je preto všeobecne akceptovaný ako marker oxidačného poškodenia a boli vypracované mnohé metodiky, ktoré umožňujú kvantifikáciu karbonylovaných proteínov. Zvýšená koncentrácia karbonylovaných proteínov bola dokázaná u mnohých ochorení – Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, alkoholová steatóza, diabetes mellitus, reumatoidná artritída, chronické zlyhanie obličiek, cystická fibróza, ulceratívna kolitída, ... Koncentrácie karbonylových derivátov proteínov sa zvyšujú aj so stúpajúcim vekom pri starnutí organizmov.

Štruktúra a funkčné skupiny postranných reťazcov niektorých aminokyselín ich predurčujú k preferovanému ataku ROS. Veľmi ľahko oxidovateľné sú na postrannom reťazci aminokyseliny obsahujúce atóm síry, teda cysteín a metionín, ktoré podliehajú oxidácii takmer všetkých ROS. Cysteín je oxidovaný za vzniku disulfidov, kým metionín prechádza na metionínsulfoxid. Obe oxidované reziduá však spätne redukovujú špecifické reduktázy, ktoré sú zástupcami vyššie spomínaných reparačných systémov oxidačne poškodených proteínov. Podobne náchylné na oxidáciu sú aj aromatické aminokyseliny, u ktorých sa stretávame najčastejšie s hydroxyláciami za vzniku hydroxyderivátov. Na oxidácii proteínov sa veľmi významne podieľa aj peroxynitrit. Čiastočne oxiduje cysteín a metionín, kým aromatické aminokyseliny tyrozín a tryptofán sú ním oxidované s vysokou selektivitou. Nitrácia tyrozínu zabraňuje jeho reverzibilnej fosforylácii tyrozínkinázou, čo je jeden z najdôležitejších mechanizmov bunkovej regulácie kľúčových enzýmov a signálnych transdukčných dráh.

Prítomnosť kovových iónov zvyšuje pravdepodobnosť oxidácie proteínov. Ióny železa a medi sa viažu na aminokyseliny proteínov, kde stimulujú vznik voľných radikálov (napríklad reakciou s H₂O₂), vedúcich k miestnemu poškodeniu proteínov. Tento mechanizmus je zodpovedný za poškodenie väčšiny enzýmov, receptorov a štruktúrnych proteínov. Superoxidový radikál inaktivuje enzýmy, ktoré pre dosiahnutie svojho katalytického účinku využívajú komplex [4Fe-4S] v aktívnom centre. Superoxidový radikál oxiduje ióny železa, čím sa jeho komplex so sírou stáva nestabilným a železo je z komplexu uvoľňované z aktívnych miest, pričom enzým stráca svoju funkciu. K uvedenej skupine enzýmov patrí napríklad akonitáza (enzým Krebsovho cyklu) a iné dehydratázy.

1.2.3 OXIDAČNÉ POŠKODENIE NUKLEOVÝCH KYSELÍN

Začiatky výskumov oxidačného poškodenia DNA spadajú zhruba do obdobia po druhej svetovej vojne, keď sa vedci začali zaoberať dôsledkami atómovej bomby a ionizačného žiarenia na ľudský organizmus. V tomto čase však ešte neboli tak dobre preskúmané oxidačné vlastnosti ROS a iných radikálov, a preto trvalo ďalších dvadsať rokov, kým sa hľadali spojitosti medzi poškodením DNA, ionizačným žiarením a kyslíkovými radikálmi.

Oxidačné poškodenie DNA bolo pozorované pri oxidačnom strese za rôznych podmienok, vrátane viacerých ochorení (hlavne nádorové ochorenia) a starnutia organizmu. V podstate všetky ROS, väčšina RNS, ionizačné žiarenie a prítomnosť iónov prechodných kovov majú podiel na oxidácii DNA, či už ju vyvolávajú priamo (oxidáciou báz a cukorných zložiek), alebo nepriamo (napr. generáciou reaktívnych radikálov, aktiváciou Ca²⁺-dependentých endonukleáz). V stave, keď oxidačný stres v organizme prevláda nad schopnosťami reparovať DNA, dochádza k jej mutáciám, zlomom vlákna až fragmentácii, ktoré vedú k apoptóze buniek.

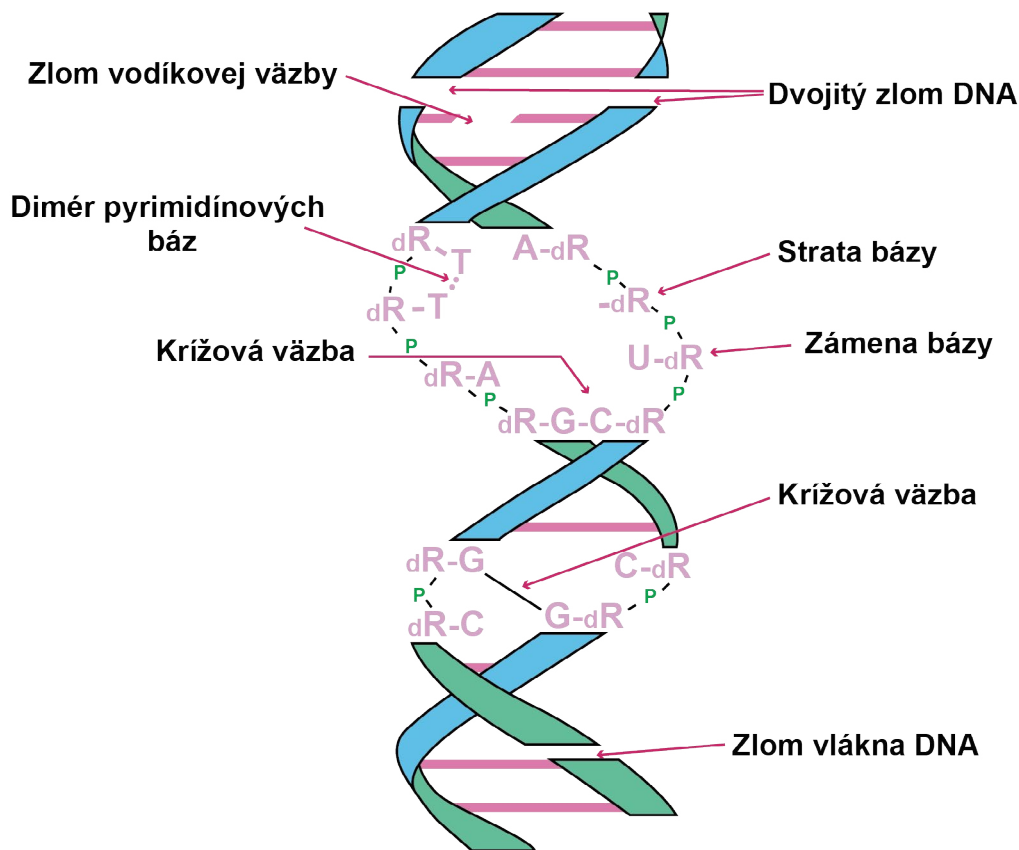
1.2.3.1 OXIDAČNÉ POŠKODENIE BÁZ DNA

Vysokú reaktivitu pri oxidáciách DNA vykazujú hydroxylové radikály, ktoré oxidujú všetky bázy DNA na ich hydroxyderiváty. Oxidácia pyrimidínových báz tymínu a cytozínu vedie aj k vzniku príslušných glykolov a pyrimidínových dimérov. Purínové bázy guanín a adenín sú hydroxylované v polohách 4, 5 alebo 8 za vzniku hydroxylovaných deaminovaných produktov, ako sú 8-hydroxyguanín (8-OH-Gua), 8-hydroxyadenín (8-OH-Ade), 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidín (FapyG). Hydroxylové radikály, ktoré atakujú DNA, bývajú často odvodené od iných ROS, predovšetkým peroxidu vodíka. Nakoľko molekula DNA nesie celkový záporný náboj, priťahuje ľahko katióny kovov (železa, medi, ...), ktoré potom katalyzujú Fentonovu reakciu. Preto prítomnosť chelatačných činidiel inhibuje poškodenie DNA v prítomnosti peroxidov.

Z hľadiska oxidačného poškodenia DNA je v porovnaní s hydroxylovým radikálom oveľa menej nebezpečný singletový kyslík a uhlíkové, peroxylové a alkoxylové radikály, ktoré preferujú pri oxidácii ako substrát guanín, teda najľahšie oxidovateľnú bázu. Kyselina chlórna naopak preferenčne atakuje pyrimidíny za vzniku glykolov a chlórovaných derivátov.

Výsledkom oxidácie DNA v prítomnosti RNS sú najčastejšie 8-nitroguanín, 8-OH-Gua, FapyG, tymínglykol a 5-hydroxymetyluracil.

Následky oxidačného poškodenia báz DNA sú spojené s ich nesprávnym spárovaním, čo by viedlo k vzniku nežiaducich mutácií. Preto existuje v organizme systém prísnej kontroly, pri ktorej sú poškodené bázy „vystrihnuté“ a nahradené novými bázami. Na oprave DNA sa podieľajú nešpecifické endonukleázy, ktoré odstraňujú celý úsek DNA nesúci poškodenú bázu a DNA glykozylázy, ktoré dokážu odstrániť jednu špecifickú poškodenú bázu. Existuje viacero metodík, ktoré umožňujú stanoviť a kvantifikovať oxidačne poškodené bázy a DNA molekuly, ktoré budú podrobnejšie popísané v kapitole 4 (4.3.3 Markery oxidačného poškodenia deoxynukleovej kyseliny).



Obrázok 4. Typy oxidačného poškodenia DNA

Oxidačné poškodenie DNA vedie k vzniku rôznych typov mutácií. Výsledkom reakcií voľných radikálov s DNA sú zmeny v jej primárnej štruktúre, ktoré sú dané predovšetkým zámenou alebo stratou báz, vznikom zlomov na vláknach DNA, alebo vytvorením krížových väzieb. Krížové väzby môžu vznikať na tom istom vlákne DNA, ale aj medzi jednotlivými vláknami navzájom. Často sa krížové väzby tvoria medzi vláknami DNA a inými molekulami, napríklad proteínmi, čím dochádza k narušeniu ich funkcie. <http://www.radiation-scott.org/radsources/3-0.htm>

1.2.3.2 OXIDAČNÉ POŠKODENIE CUKORNEJ ZLOŽKY DNA A PROTEÍNOV CHROMATÍNU

Oxidácie postihujú aj cukornú zložku DNA – deoxyribózu, ktorá sa po oxidácii decyklizuje a rozpadá na rôzne uhlíkové radikály. Tieto v prítomnosti kyslíka vytvárajú peroxylové radikály, ktoré podliehajú ďalším reakciám za vzniku karbonylových derivátov (meziiným aj MDA). Oxidácia sacharidovej zložky DNA môže viesť k zlomu vlákna DNA, kde poškodené cukry tvoria konce fragmentov DNA, alebo sú z DNA uvoľnené. Pri nízkej dostupnosti kyslíka sa C5' radikály deoxyribózy môžu viazať s purínom toho istého nukleozidu v polohe C8 za vzniku cyklických produktov (8,5'-cyklo-2'-deoxy-guanozín/adenozín).

Oxidačným reakciám podliehajú tiež aminokyseliny proteínovej zložky DNA (v rámci chromatínu). Radikály aminokyselín často atakujú bázy DNA a vytvárajú tak medzi nimi krížové väzby, ktoré zabraňujú DNA v jej replikácii a transkripcii.

1.3 LITERATÚRA

Berlett BS, Stadtman ER. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *J. Bio Chem.* 1997, Vol. 272, No. 33 (15): 20313–20316.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Fourth Edition, Oxford University Press, Oxford, UK, 2007.

Hermes-Lima M. *Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals*. Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. 2004, John Wiley & Sons, Inc. 319-367.

Knutson MD, Walter PB, Ames BN, Viteri FE. Both iron deficiency and daily iron supplements increase lipid peroxidation in rats. *J Nutr.* 2000 Mar;130(3):621-8.

Moscarella S, Caramelli L, Mannaioni PF, Gentilini P. Effect of alcoholic cirrhosis on ethane and pentane levels in breath. *Boll Soc Ital Biol Sper.* 1984 Mar 30;60(3):529-33.

Pelli MA, Trovarelli G, Capodicasa E, De Medio GE, Bassotti G. Breath alkanes determination in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Colon Rectum.* 1999 Jan;42(1):71-6.

Sedghi S, Keshavarzian A, Klamut M, Eiznhamer D, Zarling EJ. Elevated breath ethane levels in active ulcerative colitis: evidence for excessive lipid peroxidation. *Am J Gastroenterol.* 1994 Dec; 89(12):2217-21.

Scheibmeir HD, Christensen K, Whitaker SH, Jegaethesan J, Clancy R, Pierce JD. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive and Critical Care Nursing.* 2005 (21): 24-28.

Stevens JF, Maier CS. Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Mol Nutr Food Res.* 2008 Jan;52(1):7-25.

Toshniwal PK, Zarling EJ. Evidence for increased lipid peroxidation in multiple sclerosis. *Neurochem Res.* 1992 Feb;17(2):205-7.

Wendland BE, Aghdassi E, Tam C, Carrrier J, Steinhart AH, Wolman SL, Baron D, Allard JP. Li-

lipid peroxidation and plasma antioxidant micronutrients in Crohn disease. *Am J Clin Nutr.* 2001 Aug;74(2):259-64.

Zarling EJ, Mobarhan S, Bowen P, Kamath S. Pulmonary pentane excretion increases with age in healthy subjects. *Mech Ageing Dev.* 1993 Feb;67(1-2):141-7.

NEENZÝMOVÉ ANTIOXIDANTY

Ako antioxidanty sú označované všetky látky, ktoré zabraňujú voľnoradikálovým reakciám. V priebehu evolúcie sa u všetkých živých organizmov vyvinuli ochranné systémy zamerané na boj s voľnými radikálmi a oxidačným stresom. Týka sa to dokonca aj anaeróbných baktérií, ktoré sa málokedy dostávajú do kontaktu s kyslíkom. Jedná sa predovšetkým o enzýmové systémy, ktoré sa akýmkoľvek spôsobom zúčastňujú na antioxidačnej aktivite. Podľa miesta ich zásahu ich možno rozdeliť do troch základných kategórií:

1. **Enzýmy s priamou antioxidačnou aktivitou** - reagujú priamo s molekulami s oxidačným účinkom (voľnými radikálmi)
2. **Doplňujúce enzýmové systémy** - podporujú funkcie enzýmov prvej skupiny (napríklad sa zúčastňujú na obnove ich aktivity)
3. **Reparačné enzýmy** - zabezpečujú „opravu“ oxidačne poškodených biomolekúl (príkladom sú reparačné enzýmy oxidačne poškodenej DNA)

Zvyšok oxidačnej obrany organizmov je zabezpečený nízkomolekulárnymi látkami neenzýmového charakteru, ktoré môžu svojou aktivitou podporovať enzýmové antioxidanty. Väčšina z nich nie je syntetizovaná v organizme a je nutné ich prijať v diéte. Okrem širokého spektra látok rastlinného pôvodu (vitamíny, karotenoidy, organosulfátové zlúčeniny, polyfenoly a mnohé iné) sa do tejto skupiny zaraďujú aj kovové a niektoré nekovové minerály. Sú dôležitými kofaktormi mnohých antioxidačne pôsobiacich enzýmov, čo poukazuje na ich významné postavenie v oblasti regulácie oxidačného stresu.

Z endogénnych neenzýmových zlúčenín sa ako antioxidanty uplatňujú glutatión, tioredoxíny, kyselina močová, kyselina lipoová, koenzým Q10 a mnohé ďalšie, ktorých antioxidačná aktivita je stále v procese výskumu.

Denne sa objavujú správy o nových, zatiaľ menej známych látkach zo skupiny nízkomolekulárnych neenzýmových antioxidantov a benefitoch ich užívania pri rôznych ochoreniach. Táto kapitola je zameraná na charakterizáciu najznámejších neenzýmových antioxidantov, pričom mnohé z nich sú súčasťou výživových doplnkov, ktoré je možné zakúpiť bežne v lekárňach.

2.1 MINERÁLY

2.1.1 ZINOK

Zinok (Zn) je minerál, u ktorého bol síce dokázaný nepriamy antioxidačný účinok, no nikdy nebola dokázaná jeho priama interakcia s voľnými radikálmi. Mechanizmus jeho antioxidačného pôsobenia nie je preto dodnes celkom známy a podľa výskumov s najväčšou pravdepodobnosťou nesúvisí s aktivitou zinok-dependentných enzýmov s antioxidačnou aktivitou.

Vo všeobecnosti je možné rozdeliť antioxidačný účinok zinku na chronický a akútny. Z dlhodobého hľadiska bolo dokázané, že pri zníženom príjme zinku reaguje organizmus citlivejšie na oxidačný

stres, predovšetkým zvýšenou produkciou voľných radikálov pri oxidačnom poškodení. Podľa výsledkov štúdií zvýšené hladiny zinku stimulujú metalotioneíny, nízkomolekulárne proteíny s vysokým obsahom cysteínu, prostredníctvom ktorého je naviazaný zinok (alebo aj ióny Ag, Cu, Cd a Hg).

Z akútneho hľadiska boli popísané dva možné mechanizmy antioxidantného pôsobenia zinku:

1. **Stabilizácia tiolových (-SH) skupín proteínov.** Tento účinok zinku bol študovaný na enzýme δ -aminolevulinát dehydratáze (podieľa sa na syntéze hému), avšak podobné účinky zinku možno očakávať aj u iných enzýmových systémov, ktorých aktivita závisí na oxidačnom stave ich tiolových skupín. Zinok v experimentoch dokázal zabrániť oxidácii tiolových skupín, ktorá vedie k tvorbe disulfidových mostíkov, kým naopak deprivácia zinku viedla k zvýšeniu reaktivity tiolových skupín a strate enzýmovej aktivity δ -aminolevulinát dehydratázy. Ako možné mechanizmy, ktorými zinok chráni tiolové skupiny, boli navrhnuté priama väzba zinku na tiolové skupiny, alebo väzba na inú časť proteínu. Pri väzbe na proteín pritom zrejme dochádza k sterickejmu chráneniu tiolových skupín, prípadne konformačnej zmene proteínu, ktorej výsledkom je znížená reaktivita tiolových skupín. Je však nutné poznamenať, že nie všetky enzýmy, ktoré viažu zinok, môžu profitovať z jeho antioxidantnej aktivity; príkladom sú už spomínané metalotioneíny, u ktorých oxidácia tiolových skupín vedie k uvoľneniu zinku z proteínu.

2. **Zníženie produkcie OH^\bullet , vznikajúcich z H_2O_2 a $\text{O}_2^{\bullet-}$ prostredníctvom antagonizmu redoxne aktívnych prechodných kovových prvkov** (predovšetkým železa a medi, ale aj kobaltu a niklu, kapitola 1 (1.1.1 Kyslíkové radikály a reaktívne formy kyslíka, Haber-Weissova a Fentonova reakcia). Keďže OH^\bullet sú považované za jeden z najagresívnejších druhov voľných radikálov, ktoré sa zúčastňujú na oxidačnom poškodení všetkých biomolekúl – lipidov, proteínov, nukleových kyselín aj sacharidov, antagonistický efekt zinku má pri týchto reakciách zásadné postavenie. Nakoľko zinok je z hľadiska schopnosti vytvárať koordinačné väzby podobný železu a medi, je schopný vytlačiť tieto redoxne aktívne kovy z miesta ich väzby na biomolekulách, kde ich prítomnosť stimuluje vznik hydroxylových radikálov, čo vedie k miestnemu oxidačnému poškodeniu. Zinok viazaný na biomolekuly, na rozdiel od železa a medi, nekatalyzuje vznik voľných OH^\bullet . Pozitívny efekt nahrádzania redoxne aktívnych kovov zinkom bol dokázaný vo viacerých štúdiách, poukazujúcich predovšetkým na jeho miestne špecifické antioxidantné účinky. Preto sa začalo uvažovať o možnosti podávania zinku ako antioxidantnej podpory pri akútnom oxidačnom poškodení tkanív. Štúdie, ktoré nasledovali demonštrovali opakovane *in vitro*, ako aj *in vivo* kardioprotektívny účinok zinku a jeho schopnosť oslabiť ischemické a postischemické poškodenie tkaniva. Postupne sa tieto štúdie rozšírili aj na ďalšie orgánové systémy (žalúdok, mozog, obličky, retina,...), na ktorých bol tiež dokázaný jeho antioxidantný účinok.

2.1.2 SELÉN

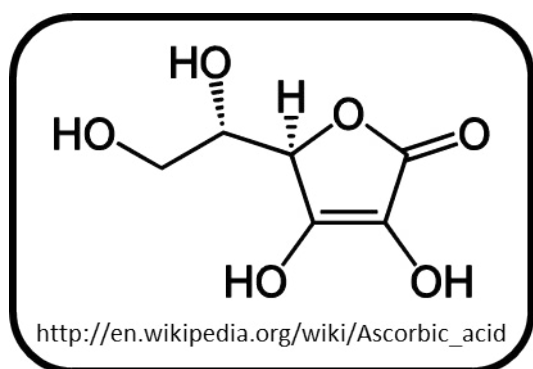
Selén (Se) je stopový prvok, ktorého nedostatok sa spája so zvýšeným rizikom výskytu viacerých ochorení (nádorových, srdcových a ďalších). Výskum úlohy selénu v týchto patologických stavoch, ktoré úzko súvisia s oxidačným stresom stúpol po tom, ako bolo zistené, že selén je zastúpený v selénoproteínoch, ktoré sú súčasťou antioxidantne aktívnych selénoenzýmov (glutatiónpoxidázy, tioredoxín reductázy). Hlavnou formou selénu v selénoproteínoch je selénocysteín (atóm síry v cysteíne je nahradený selénom), často označovaný ako 21. esenciálna aminokyselina. Selénoenzýmy budú detailnejšie popísané v ďalšom texte (3.4.1 Glutatión peroxidázy (GPx)).

2.2 VITAMÍNY

2.2.1 VITAMÍN C (Kyselina askorbová)

Vitamín C je produktom glukózového metabolizmu rastlín a všetkých živočíchov okrem primátov, ktoré ho nedokážu syntetizovať. V poslednom kroku je syntéza vitamínu C zabezpečená enzýmom

L-gulonolaktón oxidázou, ktorého gén sa v zmutovanej a neaktívnej forme nachádza aj v genóme človeka. Vitamín C však zabezpečuje viaceré metabolické procesy, ako napríklad syntézu noradrenalínu a karnitínu, hydroxyláciu prolínu a lyzínu (tvoria primárnu štruktúru kolagénu), či absorpciu železa v čreve, preto jeho príjem musí byť zabezpečený v dostatočnej dávke v potrave. Nedostatok vitamínu C vedie k ochoreniu označovanému skorbut, ktorého hlavnými symptómami sú osteoporóza, hemorágia a anémia. Priemerné hladiny vitamínu C v krvi (30-100 $\mu\text{mol/l}$) zabezpečí cca 60-100 mg jeho dennej dávky v strave. Po absorpcii vitamínu C je jedna z dvoch hydroxylových skupín, ktoré sa nachádzajú v štruktúre molekuly plne ionizovaná, preto sa vitamín C označuje aj ako "askorbát". Vitamín C je vstrebávaný v čreve gradientovým kotransportom s Na^+ , jeho menšia časť môže byť absorbovaná aj vo forme oxidačného produktu – dehydroaskorbátu (DHA), ktorý je v čreve naspäť redukovaný na askorbát a môže byť transportovaný plazmou do buniek. Väčšina buniek je vybavená transportným systémom pre gradientový kotransport askorbátu s Na^+ , niektoré bunky však dokážu prijímať aj DHA cez transportné systémy glukózy.



Obrázok 5. Štruktúra vitamínu C

Z chemického hľadiska je vitamín C cukorná kyselina – γ -laktón dioxogulónovej kyseliny s endiolovým usporiadaním na atónoch C_2 a C_3 , ktoré sú nositeľmi jej silných redukčných účinkov. Postupnou oxidáciou hydroxylov na týchto dvoch uhlíkoch vzniká L-dehydraskorbát.

Okrem zabezpečenia vyššie uvedených metabolických procesov boli u askorbátu dokázané aj mnohé antioxidantné účinky. Askorbát má silné redukčné účinky, odovzdaním jedného elektrónu z neho vzniká semidehydroaskorbát (SDA), ktorý má charakter radikálu a môže byť ďalej oxidovaný až na DHA. Po reakcii askorbátu s voľnými radikálmi vzniká SDA, pričom dochádza k zneškodneniu voľného radikálu. SDA radikál je vysoko stabilný, nemá výrazné oxidačné ani redukčné účinky, čo askorbát zaraďuje medzi veľmi dobré antioxidanty. Takto askorbát zabezpečuje antioxidantnú ochranu pri vychytávaní širokej škály ROS ($\text{O}_2^{\cdot-}$, HOO^{\cdot} , OH^{\cdot} , RO_2^{\cdot} ; $^1\text{O}_2$, O_3), RNS (NOO^{\cdot}), radikálov síry, HClO , ONOOH a nitrozylačných činidiel. Kým výsledky antioxidantnej aktivity askorbátu dokladujú predovšetkým mnohé *in vitro* štúdie, priame dôkazy o antioxidantnej obrane organizmu *in vivo* sú obmedzené. U jedincoov so zníženými hladinami askorbátu bol preukázaný jeho pozitívny účinok v súvislosti s oxidačným poškodením buniek. No u zdravých ľudí s vyváženou stravou zvýšený príjem askorbátu vo forme doplnkov výživy nezabezpečí dodatočný antioxidantný účinok. Faktom však zostáva, že pri miestnom oxidačnom poškodení (napríklad v kĺboch u pacientov s reumatoidnou artritídou) je askorbát oxidovaný vo vyššej miere za vzniku DHA. Tiež bolo potvrdené, že u fajčiarov a pacientov s diabetes mellitus, teda u skupín ľudí so zvýšeným oxidačným stresom, sú hladiny askorbátu znížené.

U zdravých ľudí je pomer askorbát/DHA vysoký, pri oxidačnom zaťažení organizmu vznikajúce SDA radikály podliehajú disproporciačnej reakcii za vzniku askorbátu a DHA, ktorý sa rozkladá na rôzne produkty oxalátu. Väčšina buniek disponuje enzýmami, ktoré dokážu redukovať DHA naspäť na askorbát, na úkor oxidácie glutatiónu a NADH.

Vo vodných roztokoch je askorbát pri fyziologickom pH stabilný, ale v prítomnosti iónov prechodných kovov, najmä železa a medi, dochádza k jeho rýchlej oxidácii za vzniku peroxidu vodíka a hydroxylových radikálov. *In vitro* tak bol pozorovaný vzostup OH^{\cdot} napríklad pri rozpúšťaní šumivých

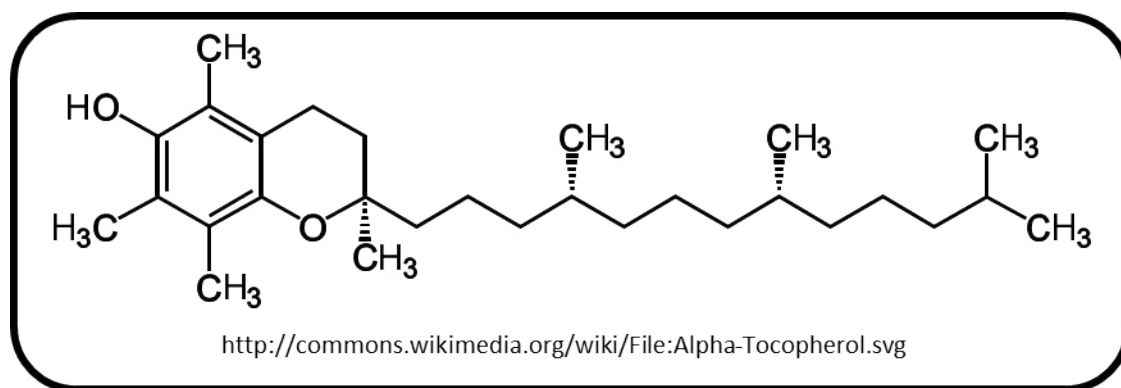
tabliet askorbátu vo vode z vodovodu, čo má viac-menej negatívne následky. Prooxidačná aktivita askorbátu preto predstavuje technologický problém pre farmaceutický, ako aj potravinársky priemysel pri spracovávaní askorbátu a príprave vhodných liekových foriem, či potravín. *In vivo* prooxidačná aktivita askorbátu závisí od dostupnosti voľných iónov kovových prvkov, ktorá je limitovaná, nakoľko kovy sa vyskytujú v bunkách prevažne vo viazanej forme. Mnohí autori však diskutujú prooxidačné účinky askorbátu pri poranení tkanív, u ktorých dochádza k uvoľňovaniu kovových iónov. Je to aj dôvod pochybností pre podávanie vysokých dávok vitamínu C u pacientov s diabetes mellitus.

Často sa polemizuje o vplyve rádo gramových dávok vitamínu C vo výživových doplnkoch a o ich vplyve na zdravie. Zástancom podávania vysokých dávok vitamínu C bol laureát Nobelovej ceny profesor Linus Pauling, ktorý navrhoval podávať 1 gram vitamínu C denne ako prevenciu pred prechladnutím, pričom neskôr sa vysoké dávky vitamínu C začali propagovať ako prevencia proti oxidačnému stresu v liečbe ďalších ochorení a starnutiu. Napriek mnohým ohlasom o toxicite vysokých dávok vitamínu C takéto tvrdenia neboli dokázané, no na druhej strane neexistujú ani jednoznačné dôkazy o pozitívnom účinku "megadávok". Vitamín C je vylučovaný močom, v obličkách prebieha jeho aktívna reabsorbcia, no kapacita týchto transportných systémov je limitovaná. Denne sa tak reabsorbuje asi 200 mg vitamínu C, akýkoľvek nadbytok pri zvýšenej dávke je vylúčený z organizmu.

2.2.2 VITAMÍN E

Vitamín E nie je, ako by sa mohlo zdať, označenie pre konkrétnu zlúčeninu. Treba ho chápať ako nutričný pojem, ktorý pomenúva celú skupinu v tukoch rozpustných látok podobnej štruktúry. Vitamín E teda v skutočnosti zahŕňa skupinu štyroch **tokoferolov** (α , β , γ a δ) a štyroch **tokotrienolov** (α , β , γ a δ). V literatúre je často vitamín E synonymom pre α -tokoferol (čo je najčastejšie sa vyskytujúca zlúčenina tejto skupiny látok u cicavcov), nie je to však správne označenie.

Vitamín E bol objavený v roku 1922 ako faktor nevyhnutný pre zabezpečenie reprodukcie potkanov. Jeho ďalší výskum poukázal predovšetkým na dobré antioxidantné účinky v lipidových štruktúrach.



Obrázok 6. Štruktúra α -tokoferolu

Všetky tokoferoly pozostávajú z 6-hydroxychromanového jadra a dlhého izoprenoidného reťazca. Lipofilný reťazec je v membránach orientovaný do vnútra lipidovej dvojvrstvy, kým hydrofilné jadro, ktoré je zodpovedné za antioxidantný účinok, sa nachádza na povrchu membrány, kde prichádza do kontaktu s voľnými radikálmi.

Zo štruktúry vitamínu E vyplýva, že sa jedná o látky dobre rozpustné v tukoch, v organizme je preto vitamín E distribuovaný najmä v membránach a lipoproteínoch, kde sa zúčastňuje na vychytávaní voľných radikálov, predovšetkým v procesoch peroxidácie lipidov. *In vitro* neexistujú medzi tokoferolmi a tokotrienolmi takmer žiadne rozdiely v ich antioxidantnej kapacite. Výhodou vitamínu E je, že lipidové peroxyradikály (LOO^{\bullet}) vychytáva rýchlosťou rádo 4-krát vyššou, než je ich rýchlosť reakcie s lipidmi. Navyše, radikály vitamínu E môžu reagovať s ďalším voľným lipidovým peroxyradikálom za vzniku stabilnej štruktúry. Teda jedna molekula vitamínu E je schopná zneškodniť dve molekuly

voľného radikálu, pričom okrem lipidových peroxylov je vitamín E schopný pôsobiť aj ako zhášač singletového kyslíka a hydroxylových radikálov.

U ľudí najviac zastúpený α -tokoferol je študovaný aj z hľadiska možnosti recyklácie svojho radikálu, ktorá prebieha na neenzýmovej úrovni. Medzi látky, ktoré dokážu α -tokoferol recyklovať, patria v prvom rade askorbát, koenzým Q, glutatión a niektoré flavonoidy. Možnosť recyklácie α -tokoferolu je eventuálne jedným z vysvetlení, prečo sa v biologických štruktúrach nachádza v pomerne nízkych koncentráciách (napríklad v jednom LDL lipoproteíne je len 6-10 molekúl vitamínu E).

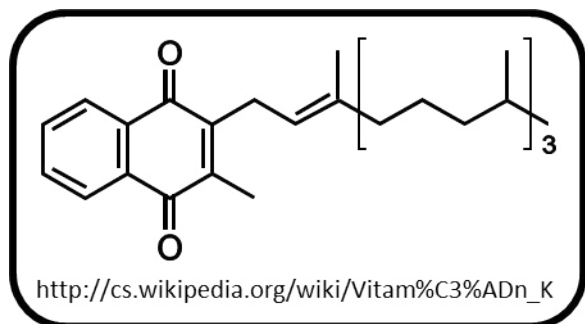
Podobne ako vitamín C, zlúčeniny vitamínu E majú tiež tendenciu redukovať prechodné kovy, a tak podnecovať ich prooxidačný účinok. Prooxidačné účinky vitamínu E vyplývajú aj z jeho schopnosti reagovať (aj keď len nízkou rýchlosťou) s polynenasýtenými mastnými kyselinami za odobratia vodíka a vzniku lipidového peroxylového radikálu. Tento fenomén spôsobuje skôr problém *in vitro* pri nadbytku pridaného vitamínu E v potravinách a rôznych liekových formách (napríklad lipidových emulziách), čo vedie skôr ku generácii voľných radikálov a potláča antioxidantný efekt vitamínu E.

Odporúčaná denná dávka vitamínu E pre dospelých ľudí je 10 mg pre mužov a 8 mg pre ženy. Zvýšené dávky vitamínu E nemajú toxický účinok, no môžu do istej miery ovplyvňovať zrážanlivosť krvi. Metabolit α -tokoferolu – α -tokoferylchinón – je totiž štruktúrny analóg vitamínu K a oveľa silnejší antikoagulant.

Antioxidačné schopnosti α -tokoferolu sú veľmi dobre preskúmané *in vitro*. V podmienkach *in vivo* platí opäť, že pri vyváženej strave zvýšené dávky vitamínu E vo výživových doplnkoch neprinášajú dodatočný antioxidantný efekt. Preto je aj väčšina štúdií orientovaná na výskum porúch spojených so zníženými hladinami vitamínu E, u ktorých bola dokázaná zvýšená miera oxidačného stresu a náchylnosť na toxicitu kyslíka. Znížené hladiny vitamínu E u hlodavcov sprevádzajú aj zvýšené hladiny markerov starnutia buniek. U zvierat nevedie deficit samotného vitamínu E k závažným poruchám. Ťažké poruchy, nezlúčiteľné so životom boli popísané iba v kombinácii s depriváciou vitamínu C, alebo selénu. U ľudí nedostatok vitamínu E vychádza najčastejšie z porúch vstrebávania tukov (na vstrebávanie vitamínu E v črevách je potrebné isté množstvo tuku, pričom vstrebaných je len cca 25-50 % z podanej dávky). Pri krátkodobom zníženom príjme vitamínu E u ľudí nedochádza k závažným poruchám. Dlhodobý nedostatok vitamínu E sa však prejavuje závažnými poruchami, vrátane neuropatií, porúch zraku (membrány retiny sú mimoriadne citlivé na oxidačný stres) a hemolýzy (oxidácia membrány erytrocytov).

2.2.3 VITAMÍN K

Vitamín K bol objavený v roku 1930, na základe jeho dôležitej úlohy v procese krvnej zrážanlivosti. Je to v tukoch rozpustný vitamín, ktorý sa vyskytuje v troch formách – **vitamín K₁** – **fylochinón** je rastlinného pôvodu, **vitamín K₂** – **menachinón** je produkovaný mikróbmami v čreve a **vitamín K₃** – **menadión** – syntetická toxická forma vitamínu K, dnes je už jeho užívanie v mnohých štátoch zakázané. Antioxidačné, protinádorové a protizápalové účinky vitamínu K, rovnako ako funkcia pri zabudovávaní kalcia do kostí patria medzi menej známe účinky vitamínu K.



Obrázok 7. Štruktúra vitamínu K₁

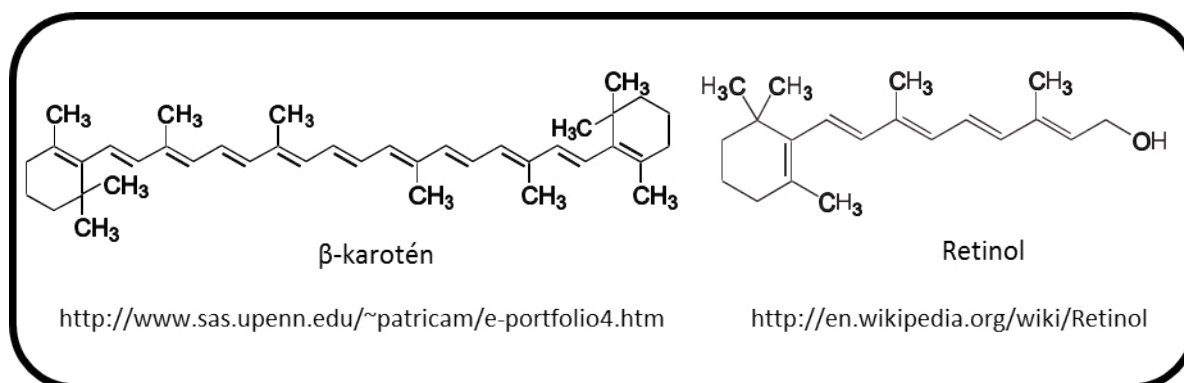
Chemicky je vitamín K₁ derivát 2-metyl-1,4-naftochinónu, ktorý nesie v pozícii 3 postranný reťazec s jedným nenasýteným a tromi nasýtenými izoprenoidnými reziduami.

Vitamín K nie je klasický antioxidant, ale experimenty poukazujú na úlohu hydrochinónovej formy vitamínu K pri zhasaní voľných radikálov. Štúdie potvrdili, že zníženie oxidácie kyseliny linolovej je priamo úmerné koncentrácii vitamínu K a v porovnaní s vitamínom E dosahuje v ekvimolárnych množstvách až 80 % jeho antioxidantného efektu. Nedávno bola dokázaná aj protektívna úloha vitamínu K pri bunkovej smrti primárnych neurocytov spôsobenej oxidačným zranením. V uvedenom experimente podávanie vitamínu K zabránilo akumulácii voľných radikálov, čo odvrátilo bunkovú smrť. Uvažuje sa preto, že v budúcnosti by sa vitamín K mohol aplikovať aj ako ochrana pri ischemickom poškodení mozgu.

2.2.4 VITAMÍN A A KAROTENOIDY

Karotenoidy sú skupinou asi 700 látok, charakteristických svojim výrazným zafarbením, preto sa zaraďujú medzi pigmenty. Sú produktmi metabolizmu rastlín; človek karotenoidy nesyntetizuje, musí ich prijímať v potrave spolu s tukmi, ktoré umožňujú ich vstrebávanie v čreve. Medzi najznámejšie karotenoidy patrí β -karotén, lycopén, zeaxantín a luteín. V organizme sú karotenoidy distribuované v lipoproteínových časticiach a zabudované do membrán a tukových depotov. Najvyššie percento karotenoidov sa nachádza v tukovom tkanive a pečeni. Ich najvyššia koncentrácia je sústredená v žltom teliesku vaječníkov, nadobličkách a semenníkoch. Karotenoidy luteín a zeaxantín sa nachádzajú vo vysokej koncentrácii v očnej makule (žltej škvrne). Hladina karotenoidov v plazme je kolísavá, závisí od zloženia stravy a individuálnej variabilite vstrebávania tukov. V čreve sú karotenoidy štiepené na retinal, z ktorého potom vzniká retinol (vitamín A). Pri saturácii vitamínu A v organizme klesá aktivita štiepiacich enzýmov, čím sa predchádza jeho akumulácii. Zvyšné vstrebávané karotenoidy sú transportované lipoproteínmi do periférnych orgánov.

Ľudský organizmus dokáže prijať a metabolizovať asi 50 zo známych karotenoidov, z ktorých nakoniec syntetizuje vitamín A, pričom β -karotén má najvyššiu aktivitu. Asi 95 % z karotenoidov v plazme tvorí šesť hlavných zlúčenín - β -karotén, β -kryptoxantín, α -karotén, luteín, zeaxantín a **lykopén**. Vitamín A je prekursorom aldehydu 11-cis retinalu, z ktorého vzniká rodopsín. Rodopsín ako súčasť fotoreceptorov na sietnici oka je potrebný pre prenos nervového vzruchu, ktorý zabezpečuje zrakový vnem. Pri dlhodobom nedostatku vitamínu A preto dochádza k slepote.

Obrázok 8. Štruktúra β -karoténu a vitamínu A (retinolu)

Karotenoidy sú terpenoidy syntetizované z niekoľkých izoprenových jednotiek. V procese ich syntézy je lycopén posledným lineárnym karotenoidom. Cyklizácia koncových izoprenoidných jednotiek dáva vznik β -karoténu s dvoma hexacyklami. Ich oxidáciou vznikajú xantofyly (zeaxantín, luteín).

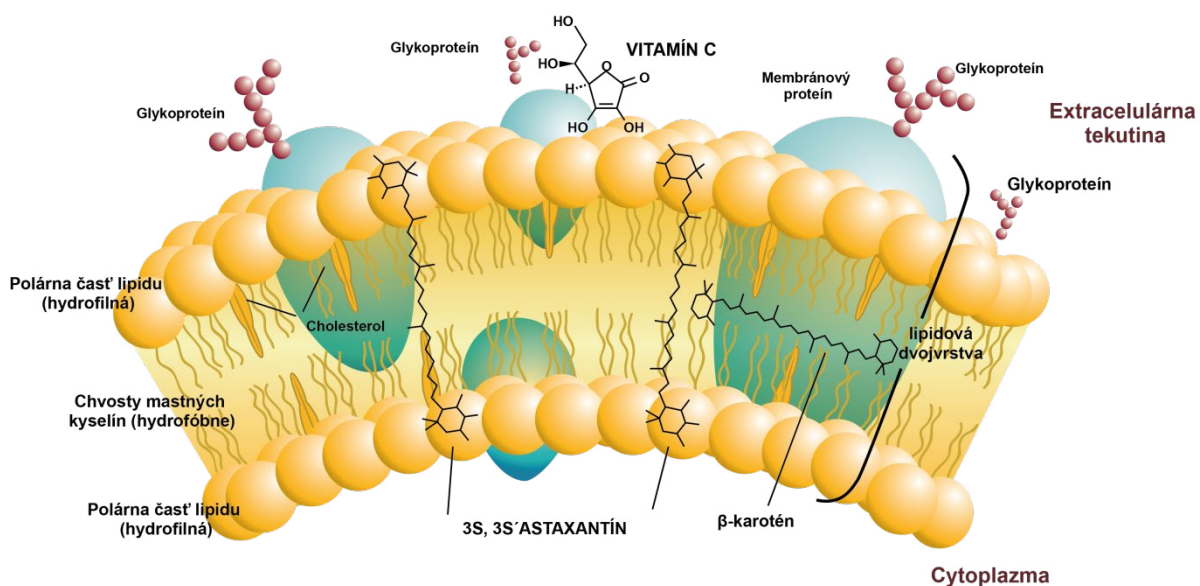
Retinol obsahuje β -jononový cyklus a postranný izoprenoidný reťazec so štyrmi dvojitémi väzbami v konjugácii s násobnou väzbou na jononovom cykle. Efekt delokalizácie elektrónov umožňuje vstrebá-

vanie svetla istej vlnovej dĺžky, čo dáva retinolu špecifické tmavočervené zafarbenie.

Karotenoidy a vitamín A v úlohe antioxidantov slúžia ako priame vychytávače voľných radilákov, pričom antioxidantný účinok karotenoidov je v porovnaní s vitamínom A oveľa silnejší. Keďže tieto molekuly sú lokalizované najmä v lipofilnom prostredí, ich aktivita sa uplatňuje hlavne pri peroxidácii lipidov, protektívny účinok však u nich nebol dokázaný v lipoproteínových časticiach. Pravdepodobne je to spôsobené malou koncentráciou karotenoidov v lipoproteínoch, kde na jednu LDL časticu pripadá len jedna ich molekula. Karotenoidy reagujú s rôznymi typmi voľných radikálov, predovšetkým vychytávajú singletový kyslík, dokonca s vyššou rýchlosťou ako α -tokoferol. Schopnosť neutralizovať oxidačné účinky singletového kyslíka závisí od štruktúry karotenoidov (počet násobných väzieb, prítomnosť cyklov v koncovej časti molekuly a ich substitúcia), pričom najviac aktívny je lykopén. Neutralizácia singletového kyslíka sa považuje za hlavný mechanizmus, ktorým karotenoidy inhibujú peroxidáciu lipidov, a bolo dokázané, že rovnaký mechanizmus prispieva k ochrane pokožky u pacientov s porfýriou. Nevýhodou však je, že karotenoidy sa na dennom svetle rýchlo rozkladajú. Mechanizmus účinku karotenoidov pri kontakte s voľnými radikálmi spočíva v elektrónovom prenose, alebo v odovzdaní vodíka, v oboch prípadoch za vzniku karoténového radikálu. Tento môže ďalej podliehať disproporcionácii, alebo môže byť recyklovaný (napr. askorbátom alebo α -tokoferolom). S peroxylovými radikálmi môžu karotenoidy reagovať aj za tvorby adičného produktu (opäť radikálu), ktorý buď priamo zhaša ďalší radikál, alebo môže byť oxidovaný za tvorby nového peroxylového radikálu. Podobne, pri reakciách s tiolovými radikálmi karotenoidy poskytujú adičné produkty, ktoré sú ďalej oxidované za vzniku peroxylových radikálov. Aj keby sa na prvý pohľad mohlo zdať, že vznik karotenoidových peroxylových radikálov podporuje oxidačný stres, nie je to pravda. V karoténových radikáloch sú totiž elektróny natoľko delokalizované, že v skutočnosti je ich reakcia s kyslíkom veľmi pomalá a jej rýchlosť závisí najmä od koncentrácie kyslíka v prostredí. Preto sú prooxidačné účinky karotenoidov limitované. Je možné zhrnúť, že protektívny antioxidantný účinok karotenoidov závisí od typu reakčného partnera, prostredia, v ktorom sa nachádza, a koncentracii kyslíka v danom prostredí. Bolo dokázané, že pri peroxidácii lipidov je antioxidantný účinok zmesi karotenoidov účinnejší, než v porovnaní s podávaním jedného typu karotenoidu, o to viac, ak zmes obsahuje lykopén a luteín, či navyše vitamín E.

Zeaxantín a luteín sú jediné karotenoidy prítomné v šošovke oka. Keďže oxidačné poškodenie je jednou z príčin vzniku katarakty (zákal očnej šošovky), podávanie oboch karotenoidov by mohlo predchádzať tomuto ochoreniu. U zeaxantínu bolo dokázané, že jeho zvýšené hladiny v plazme signifikantne korelujú so zníženým rizikom výskytu katarakty.

Je treba poznamenať, že v súčasnosti sú karotenoidy skúmané aj pre ich ďalšie metabolické účinky, a to najmä protizápalové účinky (modulácia lipoxygenázovej aktivity) a ich schopnosť regulovať gény riadiace medzibunkovú komunikáciu. V tejto súvislosti sa experimenty zameriavajú na objasnenie úlohy karotenoidov pri kardiovaskulárnych a nádorových ochoreniach. Niekoľko štúdií potvrdilo zníženie rizika výskytu nádorových ochorení pri zvýšenej hladine lykopénu v plazme, ktorý pochádzal zo zvýšenej konzumácie rajčín u sledovaných subjektov.



Obrázok 9. Miesta pôsobenia nízkomolekulárnych antioxidantov na membráne

Vitamín C nie je typickým antioxidantom lipofilných štruktúr, akými sú membrány, preto uplatňuje svoj antioxidačný účinok primárne na ich povrchu, ktorý tvoria polárne časti fosfolipidových molekúl. Karotenoidy sú naopak veľmi účinnými antioxidantmi membrán, kde zabraňujú predovšetkým oxidácii mastných kyselín vo fosfolipidoch (napr. β -karotén). **Astaxantín** je atypický karotenoid, ktorý nesie na β -jonónovom cykle hydrofilné skupiny, čo umožňuje jeho špecifickú orientáciu naprieč membránou. Táto neobvyklá štruktúra astaxantínu tak zodpovedá v membránach za jeho vysoký antioxidačný účinok. http://www.kalahealthinternational.com/astaxanthin_en.htm

2.3 KOENZÝMY

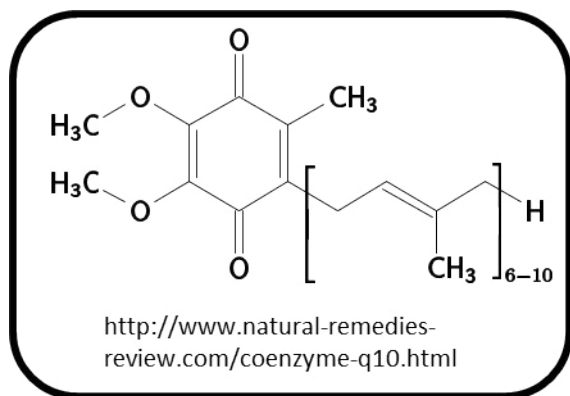
2.3.1 KOENZÝM Q

Koenzým Q (ubichinón) bol objavený v roku 1957 a je jedným z kofaktorov enzýmov oxidoreduktáz, ktorý zabezpečuje ich mechanizmus účinku prenosom atómov vodíka. Koenzým Q sa vyskytuje vo vysokej koncentrácii v mitochondriách, kde sa podieľa na oxidačnej fosforylácii a syntéze makroenergetickej zlúčeniny ATP. Preto sa koenzým Q nachádza vo vysokej koncentrácii v energeticky náročných tkanivách ako srdce, pečeň, svaly a pankreas. V rámci intracelulárnej distribúcie je koenzým Q prítomný aj na membránach iných organel a extracelulárne sa nachádza v lipoproteínoch.

Štúdie dokázali, že koenzým Q má aj výrazné antioxidačné účinky, vychytáva peroxylové radikály za vzniku ubisemichinónového radikálu, čím zabraňuje peroxidácii lipidov v membránach a lipoproteínoch. Rovnaký mechanizmus slúži aj na regeneráciu α -tokoferolového radikálu, čím prispieva k antioxidačnej aktivite α -tokoferolu. Keďže rýchlosť vychytávania peroxylových radikálov koenzýmom Q je asi 10x nižšia ako rýchlosť α -tokoferolu v rovnakých reakciách, jeho recyklácia koenzýmom Q je zrejme výhodnejšia. V experimentoch sa potvrdila aj antioxidačná ochrana koenzýmu Q voči proteí-

nom a DNA.

Antioxidačná aktivita a úloha koenzýmu Q v bioenergetickom metabolizme sú dva základné mechanizmy, ktoré podporujú klinické využitie koenzýmu Q. Niekoľko klinických štúdií preukázalo benefit antioxidačných účinkov koenzýmu Q u rôznych ochorení (kardiovaskulárne, neurodegeneratívne, nádorové, parodontálne ochorenia a imunodeficiencia). Či všetky pozitívne účinky koenzýmu Q súvisia len s jeho známymi funkciami, zatiaľ nie je jasné. Ukázalo sa totiž, že koenzým Q sa zúčastňuje aj regulačných procesov expresie génov zapojených do signálnych dráh a transportu, čo tiež môže prispievať k jeho pozitívnym účinkom.



Obrázok 10. Koenzým Q

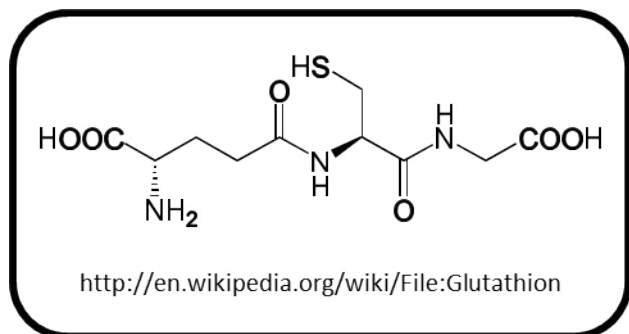
Štruktúrou pripomína koenzým Q vitamín K. Jeho základ tvorí chinónové jadro s postranným reťazcom zloženým u ľudí z 10 jednotiek izoprénu (preto sa u ľudí označuje ako koenzým Q10). Koenzým Q je jediný endogénne syntetizovaný, v tukoch rozpustný antioxidant.

2.4 NÍZKOMOLEKULÁRNE ENDOGÉNNÉ ANTIOXIDANTY

2.4.1 GLUTATIÓN

Glutatión (γ -glutamylcysteinylglycín, GSH) je tripeptid nesúci tiolovú skupinu, ktorý je rozšírený u rastlín, živočíchov aj baktérií. Je rozpustný vo vode, preto je intracelulárne lokalizovaný primárne v cytosóle bunky a jej hydrofilných kompartmentoch. GSH sa nachádza v bunkách v milimolárnych koncentráciách, čo z neho robí jeden z najdôležitejších endogénnych antioxidantov vôbec.

Asi 90 % GSH v bunke je v redukovanom stave, teda ako tripeptid. Oxidáciou glutatiónu dochádza k vytvoreniu hexapeptidu – glutatión disulfidu (GSSG), keď sa 2 molekuly glutatiónu spoja prostredníctvom disulfidového mostíka príslušných cysteínov. Pomer GSH/GSSG je preto jeden zo základných parametrov merania oxidačného statusu v bunkách. Nakoľko GSH má veľmi dobré redukčné účinky (ľahko odovzdáva elektróny), je kofaktorom mnohých antioxidačných enzýmových systémov (peroxidáz), ako aj dobrým antioxidantom *per se*. GSSG je recyklovaný enzýmom NADPH-dependentnou glutatión-reduktázou. Naopak, GSH dokáže redukovať askorbát a v tukoch rozpustné antioxidanty – vitamín E a karotenoidy. Experimenty dokázali, že cieleňá inhibícia syntézy GSH je letálna u zvierat, ktoré nedokážu syntetizovať askorbát, no u zvierat, ktoré askorbát syntetizujú, sa deficit GSH prejavil "len" zvýšením oxidačného stresu. Externý príjem askorbátu dokázal tiež predísť letálnym účinkom deplécie GSH. Naopak, u morčiat na diéte bez askorbátu suplementácia GSH vyvážila jeho nedostatok. Medzi týmito dvoma antioxidantmi teda existuje úzky recipročný vzťah, v rámci ktorého dochádza k ich vzájomnej stabilizácii.



Obrázok 11. Štruktúra glutatiónu

Tiolová skupina cysteínu je nositeľom redukčných vlastností GSH. Koncentrácia redukovaného GSH v bunke je ukazovateľom oxidačného statusu v bunke. O dôležitosti GSH ako bunkového antioxidantu vypovedajú experimenty, v ktorých cielená deplécia GSH vedie k bunkovej smrti – apoptóze.

Vlastná antioxidačná aktivita GSH, spočívajúca v priamych reakciách s voľnými radikálmi, je najdôležitejšia v mitochondriách, kde v rámci oxidačnej fosforylácie dochádza k zvýšenej produkcii voľných kyslíkových radikálov. GSH je schopný reagovať a tak zhášať rôzne voľné radikály (OH^\bullet , HClO , RO^\bullet , RO_2^\bullet , $\text{CO}_3^{\bullet-}$, NO_2^\bullet , ONOO^\bullet , LOO^\bullet , radikály DNA). Vznikajúci tiolový radikál glutatiónu (GS^\bullet) má však potenciál reagovať s kyslíkom za vzniku superoxidového radikálu.

Ďalší mechanizmus, ktorým GSH kontroluje oxidačno-redukčnú rovnováhu, je udržiavanie tiolových skupín iných proteínov v redukovanom stave, medziiným aj antioxidačne pôsobiacich metalotioneínov. GSH chráni pred oxidáciou tiolové skupiny proteínov aj prostredníctvom tvorby tzv. zmiešaných disulfidov, v prípade proteínov sa tento proces označuje ako proteín-S-glutathionylácia. Zvýšené koncentrácie glutathionylovaných proteínov boli pozorované v tkanivách so zvýšeným oxidačným stresom, kde GSSG reaguje s $-\text{SH}$ skupinami proteínov. To je zrejme aj dôvod, prečo bunky v stave oxidačného stresu exportujú GSSG do extracelulárnych priestorov. Na druhej strane glutathionylácia $-\text{SH}$ skupín proteínov môže byť prínosná, nakoľko takto viazané skupiny nepodliehajú dodatočnej oxidácii. Navyše existujú enzýmy – glutaredoxíny (tioltransferázy), ktoré katalyzujú rozklad zmiešaných disulfidov glutatiónu a tak regenerujú ako glutatión, tak aj $-\text{SH}$ skupiny proteínov.

Za antioxidačnú aktivitu možno pokladať aj chelatačný efekt GSH a vychytávanie iónov medi, čo znižuje ich katalytický účinok pri produkcii hydroxylových radikálov.

GSH zastáva v organizme aj ďalšie významné úlohy a zúčastňuje sa mnohých procesov, ako je syntéza proteínov a DNA, enzýmová katalýza, transmembránový transport, receptorová aktivita, intermediárny metabolizmus či dozrievanie buniek. Všetky tieto aktivity GSH sú nevyhnutné pre zachovanie homeostázy organizmu. Bolo dokázané, že vrodené defekty syntézy GSH u ľudí nie sú síce letálne, ale sú spojené s hemolýzou a neuropatiami. Tento stav je možné korigovať dodaním zvýšeného prísunu GSH v diéte. Aj u zdravých ľudí môže dochádzať k zníženiu hladín GSH, a to buď vplyvom rôznych toxických endogénnych faktorov (ionizačné žiarenie, poranenie tkaniva (popáleniny, ischemické poškodenie, trauma, septický šok...), alebo pri zvýšených koncentráciách železa, vírusových a bakteriálnych infekciách, nadmernej konzumácii alkoholu, či nevyváženej diéte (znížený príjem bielkovín s obsahom metionínu, prekursora GSH).

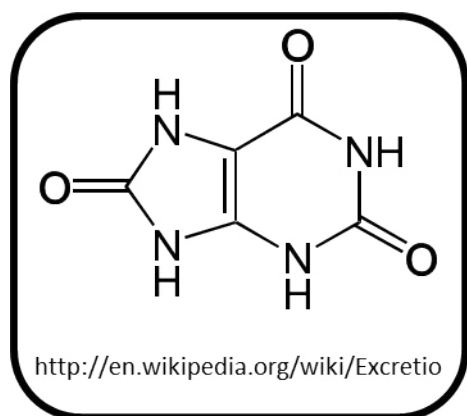
2.4.2 TIOREDOXÍNY

Tioredoxíny sú redukčne aktívne polypeptidy, syntetizované v prokaryotických aj eukaryotických bunkách, ktorých mechanizmus antioxidačného účinku je založený na prítomnosti dvoch tiolových skupín v ich molekule. Bolo popísaných viacero typov tioredoxínov, typických pre rôzne bunkové kompartmenty, z ktorých najznámejší je cytosólový typ - Trx1 a mitochondriálny typ - Trx2. Chýbajúca expresia Trx1 sa ukázala byť letálnou už v embryonálnom štádiu, čo poukazuje na dôležitosť

tioredoxínov v živých organizmoch. Je tomu tak preto, že tioredoxíny majú okrem antioxidantnej úlohy aj ďalšie kritické funkcie, akými sú regulácia apoptózy či imunomodulácia. V úlohe antioxidantov, podobne ako GSH, tioredoxíny prispievajú k udržiavaniu redoxnej homeostázy tiolových skupín štruktúrnych aj funkčných proteínov a niektorých transkripčných faktorov (napr. NF- κ B). Mechanizmus ich účinku spočíva v redukcii disulfidových väzieb proteínov za tvorby intramolekulového disulfidového mostíka v ich vlastnej molekule. Tioredoxíny môžu reagovať s disulfidmi buď samostatne, alebo v komplexoch s biosyntetickými enzýmami (ribonukleotidové reductázy, tioredoxín peroxidázy a metionínsulfoxid reductázy). Oxidované tioredoxíny sú recyklované enzymaticky NADPH-dependntnými tioredoxínovými reductázami, ktoré majú podobný mechanizmus účinku ako glutatión reductázy.

2.4.3 KYSELINA MOČOVÁ

Ďalším endogénnym antioxidantom, ktorý vzniká ako odpadový produkt purínových nukleotidov, je kyselina močová (KM). KM sa akumuluje intracelulárne, ale je prítomná aj v extracelulárnych kvapalinách (plazma, sliny, synovia, slzy,...). Pri fyziologickom pH je KM ionizovaná na urát a nesie negatívny náboj. Pri prekročení prahových koncentrácií urát kryštalizuje a ukladá sa v rôznych tkanivách, predovšetkým v kĺboch, čo vedie k ochoreniu označovanému ako dna.



Obrázok 12. Kyselina močová (2,6, 8 – trihydroxypurín)

Po prijatí elektrónu kyselina močová vytvorí rezonančne stabilizovaný radikál, ktorý má nízky potenciál reakcie s kyslíkom. Recykláciu kyseliny močovej zabezpečuje askorbát.

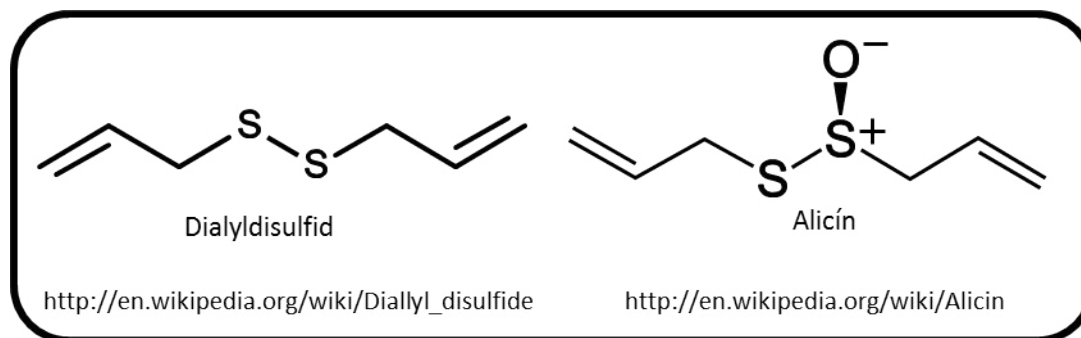
Urát je schopný prijať elektrón z hydroxylových a peroxylových radikálov, čím sa sám stáva radikálom. V urátovom radikále sú však elektróny natoľko delokalizované, že jeho oxidácia a vznik peroxylového radikálu je veľmi pomalý proces. Navyše urát môže byť recyklovaný v prítomnosti askorbátu. V respiračnom systéme urát pomáha vychytávať radikály ozónu a NOO \cdot . Okrem priamej reakcie s voľnými radikálmi prispieva urát k celkovej antioxidantnej aktivite aj prostredníctvom chelatácie iónov železa a medi a tým, že slúži ako preferenčný substrát pre oxidáciu systému hémové proteíny/H $_2$ O $_2$, čím zabraňuje oxidácii iných biomolekúl. Nitrácii proteínov predchádza urát tvorbou adičného produktu s peroxynititom, ktorý sa rozkladá za vzniku NO \cdot , čím ho vlastne recykluje.

2.5 ORGANICKÉ ZLÚČENINY SÍRY

2.5.1 ORGANICKÉ ZLÚČENINY SÍRY V CESNAKOVEJ SILICI

Medzi antioxidantné zlúčeniny patrí aj skupina organických látok s obsahom síry, ktoré sa nachádzajú vo veľkom množstve v cesnaku-dialyldisulfid, dialyltrisulfid a alicín. Zosilnená antioxidantná účinnosť týchto látok bola dokázaná v synergizme s askorbátom a s α -tokoferolom. Počet

alylových skupín a stúpajúci počet atómov síry je rozhodujúci pre ich antioxidačnú aktivitu, preto z uvedených látok je najúčinnější dialyltrisulfid.



Obrázok 13. Štruktúra zlúčenín síry cesnakovej silice

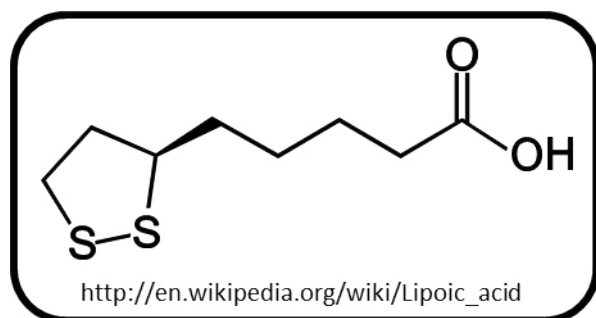
Diallyldisulfid je rozpadovým produktom alicínu. Obe látky sú súčasťou cesnakovej silice.

2.5.2 N-ACETYLCYSTEÍN

N-acetylcysteín (NAC) je známy ako antidótum pri otrave paracetamolom a dodnes sa používa aj ako mukolytikum pri ochoreniach dýchacích ciest. NAC vzniká v procese syntézy GSH, čiže je syntetizovaný endogénne. Je to donor cysteínu pre GSH, ale tiolová skupina NAC zabezpečuje aj jeho antioxidačnú aktivitu. Podávanie NAC znižuje riziko apoptózy v bunkách vystavených oxidačnému zaťaženiu a zabraňuje aj vzniku DNA zlomov pri radiačnom žiarení. NAC prispieva aj k redukcii syntézy nitritov, pričom mechanizmus tohto účinku je založený na reakcii medzi tiolovou skupinou NAC a $\cdot\text{NO}$, čo je aj jeden zo spôsobov prenosu a akumulácie aktívnej formy $\cdot\text{NO}$.

2.5.3 KYSELINA LIPOOVÁ

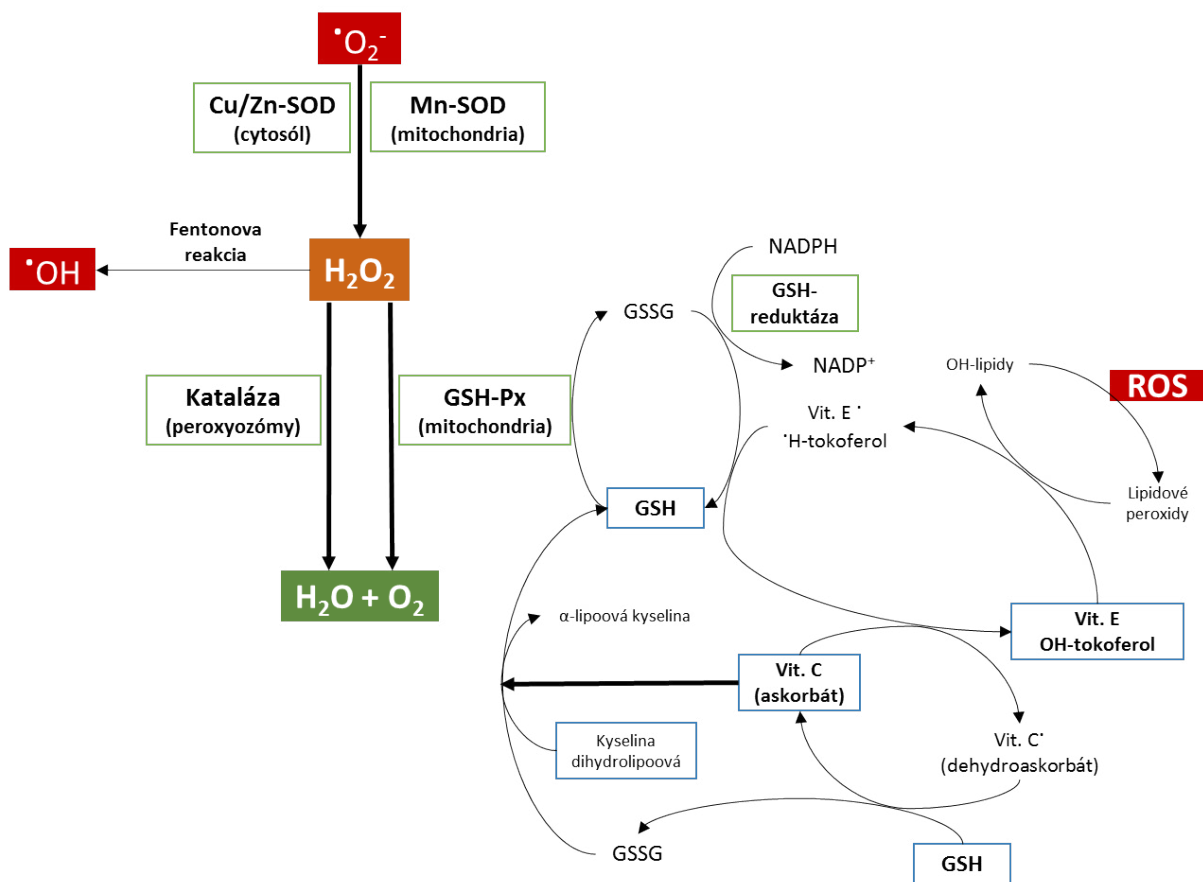
Kyselina α -lipoová (KL) je oxidačný cyklický produkt 6,8-ditio-oktánovej kyseliny, ktorá nesie funkciu kofaktora transferáz, chelatačného činidla a antioxidantu. Redukciou cyklického disulfidu vzniká z KL dihydrolipoová kyselina (DHKL). U ľudí sa KL syntetizuje *de novo*, ale prijímame ju aj v diéte. KL je rozpustná ako v lipofilnom, tak aj v hydrofilnom prostredí, nachádza sa teda v rôznych kompartmentoch bunky a v plazme. KL prijatá v diéte je po absorpcii v bunkách periférnych tkanív enzymaticky redukovaná na DHKL. KL je výnimkou medzi antioxidantmi, ktoré nesú tiolové skupiny, pretože si zachováva antioxidačnú aktivitu vo svojej oxidovanej aj redukovanej forme ako DHKL, táto forma je však antioxidačne účinnejšia. KL vychytáva hydroxylové radikály, hypochlórnú kyselinu, ale nie je aktívna pri zhasaní superoxidu a peroxylových radikálov. Naproti tomu DHKL je účinnejším antioxidantom než samotný glutatión, zhasá aj peroxylové a hydroxylové radikály a predchádza peroxidácii lipidov. KL aj DHKL zabezpečujú obranu voči singletovému kyslíku a peroxidu vodíka.



Obrázok 14. Štruktúra kyseliny α -lipoovej

Z kyseliny lipoovej vzniká po redukcii účinnejší antioxidant kyselina dihydrolipoová.

K nepriamym antioxidantným účinkom oboch kyselín, KL a DHKL, prispieva aj chelatácia iónov prechodných kovov a recyklácia iných antioxidantov (askorbát, vitamín E, GSH, koenzým Q). Výskum potvrdil, že podávanie kyseliny α -lipoovej je prínosom pri ochoreniach spojených s oxidačným poškodením, ako je diabetes mellitus, ischemicko-reperfúzne poškodenie tkanív, neurodegenerácia, rádiácia, či aktivácia HIV vírusu.



Obrázok 15. Antioxidačná úloha vitamínu C, E a kyseliny lipoovej pri tvorbe voľných radikálov

Vitamín E, ktorý je rozpustný v lipofilnom prostredí má veľmi dobré antioxidačné účinky pri oxidácii mastných kyselín. Radikál vitamínu E je regenerovaný prostredníctvom askorbátu (vitamínu C), z ktorého vzniká dehydroaskorbát. Vitamín C a kyselina dihydrolipoová sa podieľajú na recyklácii oxidovanej formy glutatiónu (GSSG) na redukovaný glutatión (GSH).

<http://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-and-chronic-degenerative-diseases-a-role-for-antioxidants/oxidative-stress-in-diabetes-mellitus-and-the-role-of-vitamins-with-antioxidant-actions>

2.5.4 METALOTIONEÍNY

Už vyššie popísané proteíny sú lokalizované v cytósole a jadre buniek. Ich mechanizmus antioxidačného účinku je daný vychytávaním voľných iónov prechodných kovov, čím redukujú riziko generácie kyslíkových radikálov. Metalotioneíny možno teda považovať za depotné proteíny kovových iónov, ktoré ich uchovávajú v netoxickej, neaktívnej forme a zároveň kontrolujú vstrebávanie týchto iónov v čreve. Metalotioneíny sú bohaté na tiolové skupiny, čo vysvetľuje ich antioxidačný efekt voči singletovému kyslíku, hydroxylovému radikálu, hypochlórnjej kyseline a nitritovému radikálu. Doterajšie štúdie potvrdili antioxidačný účinok metalotioneínov pri rádiožiarení, toxickom pôsobení cytostatika doxorubicínu, užívaní alkoholu a mnohých ďalších stavoch spojených so zvýšeným oxidačným stresom.

2.6 POLYFENOLY

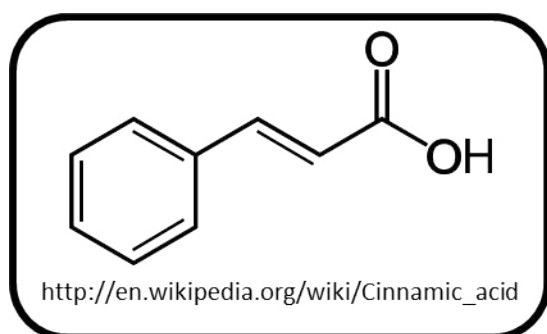
Polyfenoly sú sekundárne metabolity vyšších rastlín, ktoré si ich syntetizujú na ochranu pred UV žiarením a napadnutím patogénmi. Polyfenoly prijímame najmä v ovocí, víne, ale aj v káve a čaji, cereáliách a čokoláde. Existuje množstvo štúdií, ktoré potvrdili inverznú koreláciu medzi výskytom chronických civilizačných ochorení (kardiovaskulárne, neurodegeneratívne, nádorové ochorenia, diabetes mellitus a osteoporóza) a množstvom príjmu polyfenolov v diéte.

V rastlinách bolo popísaných viac ako 8000 polyfenolových zlúčenín. Ich prekurzormi sú fenylalanín, alebo kyselina šikimová. Spoločný štruktúrny znak – fenolový cyklus – je nositeľom antioxidantnej aktivity polyfenolov, nakoľko pri kontakte s voľnými radikálmi dokáže prijať a delokalizovať elektrón za tvorby relatívne stabilného fenolového radikálu. Medzi radikály, ktoré polyfenoly zhasajú, patria $\text{ROO}\cdot$, $\text{OH}\cdot$, $\text{ONOO}\cdot$, N_2O_3 , HClO a $\text{O}_2\cdot^-$. Tento antioxidantný mechanizmus je podporený aj dodatočnou chelatačnou aktivitou voči iónom prechodných kovov (Fe, Cu).

Antioxidatívne účinky polyfenolov závisia od počtu a polohy ich hydroxylových skupín na aromatickom jadre. Polyfenoly sa klasifikujú na podskupiny na základe rozličných štruktúrnych kritérií, prípadne na základe východiskovej zlúčeniny, z ktorej vychádza ich syntéza. Medzi hlavné skupiny patria:

- **Fenolové kyseliny**

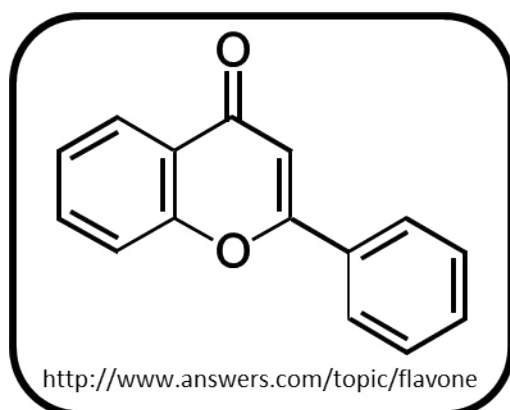
Fenolové kyseliny sú deriváty kyseliny benzoovej a škoricovej. Medzi najznámejšie fenolové kyseliny patria kyselina ferulová, *p*-kumarová, gallová, ellagová a kávová.



Obrázok 16. Kyselina škoricová

- **Bioflavonoidy**

Flavonoidy sú v súčasnosti bezpochyby najčastejšie študované polyfenoly. Základná štruktúra flavonoidov – flavón, pozostáva z dvoch aromatických cyklov spojených tromi uhlíkmi, ktoré tvoria heterocyklus s atómom kyslíka. Medzi hlavné flavonoidy patria quercetín, myricetín, kampferol, genistein, katechín, kyanidín, pelagonidín, hesperidín, rutín, naringín, chrysin.

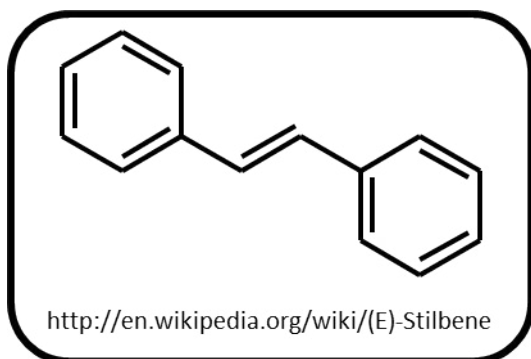


Obrázok 17. Základná štruktúra flavonoidov- flavón

Jednotlivé flavonoidy sa líšia počtom a polohou hydroxylových a iných funkčných skupín na fenyle a benzopyránovom jadre.

- **Stilbény**

Stilbény patria medzi polyfenoly, ktorých príjem v diéte je pomerne nízky, pretože rastliny ich produkujú iba ako odpoveď pri zraneniach a infekciách *ad hoc*. Najlepšie preskúmaný je stilbén resveratrol, ktorý je bohato zastúpený v hrozne a červenom víne. Práve vysokým obsahom resveratrolu vo víne sa vysvetľuje "francúzsky paradox" – nízka incidencia kardiovaskulárnych ochorení vo Francúzsku napriek fajčeniu a konzumácii diéty bohatej na tuky.



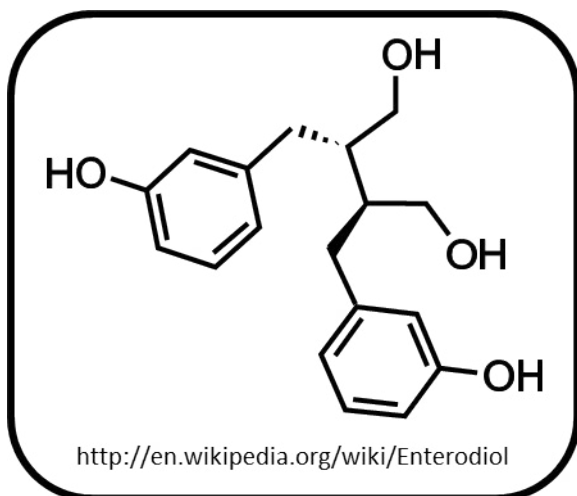
Obrázok 18. Štruktúra stilbénu

Resveratrol nesie 2 hydroxylové skupiny v polohách 3 a 5 na jednom aromatickom jadre a v polohe 4 na druhom aromatickom jadre.

- **Lignány**

Lignány vznikajú dimerizáciou kyseliny škoricovej. Niektoré lignány, napríklad v ľanových semenách sa vyskytujúci sekoizolaricirezinol, majú povahu fytoestrogénov.

Bolo dokázané, že polyfenoly pôsobia protektívne u pacientov s aterosklerózou, čo sa pripisuje ich antioxidantnej aktivite na LDL častice, rovnako ako aj ich protizápalovým a endotel- a trombocyty-stabilizujúcim efektom. Navyše príjem polyfenolov zvyšuje hladiny HDL častíc. Štúdie účinkov polyfenolov na kardiovaskulárny systém poukázali aj na ich hypotonický účinok, ktorý tiež súvisí s antioxidantným a endotel-stabilizujúcim účinkom a sčasti aj estrogénovou aktivitou.



Obrázok 19. Štruktúra enterodiolu

Enterodiol vzniká pôsobením baktérií črevnej flóry z lignánov.

Mnohé z polyfenolov (kvercetín, katechíny, isoflavóny, lignány, ellágová kyselina, resveratrol a kur-

kumín), testovaných vo vzťahu k nádorovým ochoreniam, vykazujú antikancerogénne účinky. Bolo identifikovaných niekoľko mechanizmov, ktorými sa jednotlivé polyfenoly podieľajú na redukcii rastu tumorov, vrátane estrogénnej/antiestrogénnej aktivity, inhibície proliferácie a indukcie bunkového cyklu, predchádzaním oxidácii, indukciou detoxifikačných enzýmov, reguláciou imunitného systému, protizápalovou aktivitou a zásahom do signálnych dráh.

Antidiabetické účinky polyfenolov boli testované u resveratrolu, kyseliny ferulovej a mnohých flavonoidov. Zistilo sa, že k zlepšeniu zdravotného stavu u diabetikov prispieva nielen ich antioxidantná aktivita, ale aj inhibícia vstrebávania glukózy v čreve a inhibícia enzýmov štiepiacich di-, oligo- a polysacharidy.

Neuroprotektívne účinky polyfenolov sú založené primárne na ich antioxidantnej aktivite a boli potvrdené predovšetkým u pacientov s Alzheimerovou a Parkinsonovou chorobou. U resveratrolu v rámci štúdia antioxidantnej aktivity pri neuropatiách bolo dokázané, že vychytáva hydroxylové a superoxidové radikály a zastavuje reťazové reakcie peroxidácie lipidov.

Antioxidantnou aktivitou disponujú aj ďalšie endogénne syntetizované zlúčeniny, ktoré primárne zabezpečujú v organizme iné funkcie. U väčšiny týchto látok bola potvrdená antioxidantná aktivita *in vitro*, ale nie je jasné, či sú účinnými antioxidantmi aj *in vivo*. Prehľad týchto potenciálnych antioxidantov udáva tabuľka 5.

Tabuľka 5. Prehľad endogénnych antioxidantov

Antioxidant	Mechanizmus antioxidantného účinku
Transferín, Laktoferín	Viažu železo, čím znižujú jeho prooxidačnú katalytickú aktivitu
Ceruloplazmín	Oxiduje Fe ²⁺ na Fe ³⁺ bez generácie superoxidu, vychytáva superoxid
Erytrocyty	Vychytávajú superoxidový radikál a peroxid vodíka pre antioxidantne pôsobiace enzýmy
Albumíny	Viažu železo a meď, sú zdrojom plazmatických tiolových skupín, vychytávajú HClO a ONOOH
Haptoglobín	Viaže hemoglobín, čím znižuje jeho prooxidačné účinky
Glukóza	Vychytáva hydroxylové radikály
Bilirubín	Vychytáva ONOOH, ROO•, RO• a singletový kyslík
Melaníny	Znižujú koncentráciu superoxidových a peroxylových radikálov
Melatonín	Má redukčné účinky

2.7 LITERATÚRA

Atmaca G. Antioxidant effects of Sulfur-containing amino acids. Yonesi medical journal. 2004, Vol.45, No.5: 766-786.

Canfield L.M., Davy L.A., Thomas G.L. Anti-oxidant/pro-oxidant reactions of vitamin K. Biochem Biophys Res Commun. 1985 Apr 16;128(1):211-9.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. Fourth Edition, Oxford University Press, Oxford, UK, 2007.

Hermes-Lima M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. 2004 John Wiley & Sons, Inc. 319-367.

- Kidd P.M., Glutathione: Systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Alternative medicine review*. 1997, Vol.2, No.3: 155-176.
- Li J., Lin J.C., Wang H., Peterson J.W., Furie B.C., Furie B., Booth S.L., Volpe J.J., Rosenberg P.A. Novel Role of Vitamin K in Preventing Oxidative Injury to Developing Oligodendrocytes and Neurons. *J Neurosci*. 2003 Jul 2;23(13):5816-26.
- Littarru G.P., Tiano L.. Bioenergetic and antioxidant properties of coenzyme Q10: recent developments. *Mol Biotechnol*. 2007 Sep;37(1):31-37.
- Mueller L., Volker B. Antioxidant Activity of β -Carotene Compounds in Different in Vitro Assays. *Molecules* 2011, 16, 1055-1069.
- Paiva S.A.R., Russell R.M. Review Series: Antioxidants and their Clinical Applications β -Carotene and Other Carotenoids as Antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, 1999, Vol. 18, No. 5, 426–433.
- Pandey K.B., Rizvi S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2009, 2:5, 270-278.
- Peterson A.S. Vitamin K – much more than a coagulation vitamin. *The Journal of Lancaster General Hospital*, 2008, Vol. 3, No. 3:112-113.
- Powell S.R. The Antioxidant Properties of Zinc. *J. Nutr.* May 1, 2000, Vol. 130, No. 5:1447S-1454S.
- Shechtman D., 2009. Zeaxanthin: A Potentially Potent Antioxidant. *Review of optometry*, 2009, October 15:36-37.
- Tinggi U. Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environ. Health Prev. Med.*, 2008, 13:102–108.
- Traber M.T., Atkinson J. Vitamin E, Antioxidant and Nothing More. *Free Radic Biol Med.*, 2007 July 1; 43(1): 4–15.

ENZÝMOVÉ ANTIOXIDANTY

Enzýmové antioxidanty sa vyvinuli počas evolúcie ako rýchla obrana organizmov voči poškodeniu tkanív kyslíkovými radikálmi. Na rozdiel od neenzýmových antioxidantov ide o endogénne syntetizované proteíny, ktoré však pre svoj mechanizmus účinku vyžadujú niektoré esenciálne kofaktory a stopové prvky. Tieto ľudský organizmus nedokáže sám syntetizovať, a preto aj aktivita antioxidantných enzýmov závisí v konečnom dôsledku od zloženia vitamínov a minerálov v potrave.

Existuje viacero typov antioxidantných enzýmov, ktoré sú štruktúrne prispôsobené tak, aby buď priamo metabolizovali a zneškodnili kyslíkové radikály (superoxidový radikál, peroxid vodíka), alebo sa skôr zúčastňujú rozkladu už oxidačne poškodených biomolekúl.

Do prvej skupiny enzýmov sa zaraďujú superoxid dismutázy, ktoré katalyzujú dismutáciu superoxidového radikálu za vzniku peroxidu vodíka. Rozklad slabšieho oxidantu, peroxidu vodíka následne katalyzujú katalázy za vzniku vody a kyslíka, čím dochádza k úplnému zneškodneniu superoxidového radikálu. Do druhej skupiny enzýmov sa zaraďujú štruktúrne a funkčne odlišné peroxidázy, ktoré zodpovedajú za katalytický rozklad oxidačne poškodených biomolekúl. Zvláštnu skupinu antioxidantných enzýmov tvoria také enzýmy, ktorých primárnym účinkom nie je rozklad kyslíkových a iných radikálov, ale v rámci ich katalytických reakcií dochádza k spotrebe voľných radikálov, a preto sekundárne pôsobia aj ako antioxidanty (indolamín-2,3-dioxygenáza). Medzi antioxidantné enzýmy druhej línie sa ďalej zaraďujú aj všetky enzýmové systémy, ktoré sa podieľajú akýmkoľvek spôsobom na regenerácii primárnych antioxidantných enzýmov a udržiavajú ich v aktívnom stave.

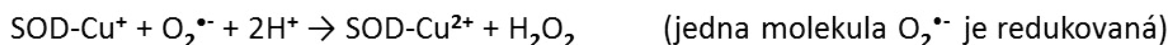
3.1 SUPEROXID DISMUTÁZY

Enzýmy z rodiny superoxid dismutáz (SOD) je možné rozdeliť do štyroch hlavných skupín, na základe väzby odlišných prvkov prechodných kovov, ktoré umožňujú ich katalytický mechanizmus. Existujú dve formy SOD viažuce zinok a meď, ďalšia forma viaže mangán a posledná SOD viaže železo. Bola objavená aj forma SOD viažuca nikel, tá sa však vyskytuje len v baktériách *Streptomyces coelicolor*.

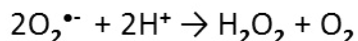
3.1.1 CUZn-SUPEROXID DISMUTÁZA

Prvý z dvoch CuZn-SOD enzýmov, označovaný aj ako SOD1 sa nachádza takmer vo všetkých bunkách eukaryotov. Pôvodne bola SOD1 objavená v cytoplazme buniek, no je aj súčasťou lyzozómov, jadra a mitochondrií. CuZn-SOD kontroluje intracelulárne hladiny $O_2^{\cdot-}$ prostredníctvom katalytickej dismutácie $O_2^{\cdot-}$, čo pri fyziologickom pH znamená urýchlenie rozkladu superoxidového radikálu až o niekoľko poriadkov. Intracelulárna CuZn-SOD je dimér, ktorého povrch nesie prevažne negatívny náboj, čím odpudzuje radikály $O_2^{\cdot-}$. Časť povrchu enzýmu, ktorá vedie priamo ku katalytickému centru nesie pozitívny náboj, čím je zabezpečené vťahovanie a navigácia superoxidových radikálov na miesto katalýzy.

Ióny prechodných kovov majú v CuZn-SOD odlišné úlohy. Zinok je dôležitý pre zachovanie priestorovej 3D štruktúry enzýmu, čím ho stabilizuje, ale nepodieľa sa priamo na katalýze. Aktívne centrum každej z podjednotiek diméru viaže prostredníctvom dusíkových atómov štyroch imidazolových jadier histidínu jeden ión medi, ktorý zabezpečuje katalytický mechanizmus SOD1:



2 molekuly superoxidového radikálu sú teda po katalýze SOD1 premenené na peroxid vodíka a kyslík:

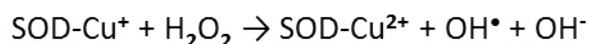
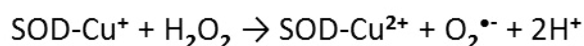


Inhibítormi SOD1 sú azidy, kyanidy a fluoridy (tak ako u všetkých ostatných foriem CuZn-SOD) a navyše dietylditiokarbamát, ktorý viaže atómy medi a uvoľňuje ich z enzýmu.

Extracelulárna CuZn-SOD (EC-SOD, SOD3) je tetramér, ktorý sa ľahko viaže na povrch buniek, predovšetkým v pľúcach, obličkách, na maternici a v cievach. SOD3 katalyzuje rovnakú reakciu rozkladu superoxidového radikálu ako SOD1. Bolo dokázané, že aktivita SOD3 stúpa aj pri zvýšených hladinách $\cdot\text{NO}$. Dôvodom je zrejme snaha predchádzať interakciám medzi superoxidovým radikálom a oxidom dusnatým a následne vzniku peroxyinitritu. Napriek tomu, že SOD3 prispieva k celkovej extracelulárnej antioxidačnej obrane, jej znížená aktivita, zapríčinená genetickým polymorfizmom však nemá patologické následky.

U CuZn-SOD boli študované aj ich prooxidačné účinky. Veľa štúdií poukázalo na fakt, že peroxid vodíka produkovaný reakciami SOD je zdrojom hydroxylových radikálov, ktoré podmieňujú Fentonovu reakciu. Na druhej strane, CuZn-SOD inhibujú rýchlosť reakcie medzi superoxidovým radikálom a železitým kationom, čo udržiava železo v oxidovanom stave, v ktorom Fentonovej reakcii nepodlieha. Z tohto pohľadu je teda výsledný prooxidačný efekt aktivity SOD prinajmenšom diskutabilný.

Ďalším mechanizmom, ktorý by mohol podmieňovať prooxidačnú aktivitu CuZn-SOD, je spätná reakcia medzi vznikajúcim peroxidom vodíka a iónmi medi v aktívnom centre enzýmu, za vzniku superoxidového alebo hydroxylového radikálu:



Vyššie uvedená reakcia bola dokázaná len za podmienok *in vitro*, a to v prítomnosti milimolárnych množstiev H_2O_2 , ktoré nie sú typické ani za podmienok oxidačného stresu. Navyše, takéto vysoké dávky H_2O_2 poškodzujú štruktúru CuZn-SOD oxidáciou jej aminokyselín a agregáciou, a tak je nepravdepodobné, že podobné reakcie by prebiehali aj v živých systémoch a zásadne ovplyvnili antioxidačný účinok SOD. Vo všeobecnosti, aj napriek výsledkom štúdií, ktoré diskutujú prooxidačnú aktivitu CuZn-SOD, ide jednoznačne o antioxidačný enzým prvej línie, ktorý má kľúčové postavenie pri rozklade superoxidového radikálu. Dôkazom sú aj geneticky modifikované myši s chýbajúcim génom pre CuZn-SOD, ktoré sú síce životaschopné, no nedokážu odolávať oxidačnému poškodeniu tak dobre ako zdraví jedinci. Mutácie CuZn-SOD a jej znížená aktivita sa u ľudí spájajú so zvýšeným rizikom amyotrofickej laterálnej sklerózy, urýchleným starnutím a zvýšeným rizikom nádorových ochorení.

3.1.2 Mn-SUPEROXID DISMUTÁZA

Ľudská Mn-SOD (SOD2) je tetramér, ktorý nesie na každej podjednotke jeden atóm Mn. Mn-SOD je v bunkách lokalizovaná v mitochondriách, kde zodpovedá za zneškodnenie radikálov $\text{O}_2^{\bullet-}$, ktoré sú generované najmä v respiračnom reťazci. Koncentrácia Mn-SOD je preto vysoká najmä v tých tka-

nivách, ktoré sú bohaté na mitochondrie (napr. myokard). Mn-SOD katalyzuje rovnakú reakciu ako CuZn-SOD, pričom v aktívnom centre sú za mechanizmus katalýzy zodpovedné ióny mangánu, ktoré oscilujú medzi oxidačnými stupňami Mn^{2+} a Mn^{3+} . Dôležitosť antioxidantnej aktivity Mn-SOD podporujú výsledky mnohých štúdií. Jej nezastupiteľná úloha v organizme bola deklarovaná u Mn-SOD *knockout* myši. Tieto geneticky modifikované zvieratá sa dožívajú len troch týždňov, pričom u nich bolo zaznamenaných niekoľko patologických fenotypov. Najvýraznejšie sa u Mn-SOD *knockout* myši prejavila anémia, neurodegenerácia a kardiomyopatia, ktorých príčinou bolo závažné oxidačné poškodenie na úrovni mitochondrií. U ľudí aktivita Mn-SOD stúpa počas oxidačného stresu a je naopak výrazne redukovaná pri niektorých ochoreniach (nádorové ochorenia, astma, neurodegeneratívne ochorenia, nádory), či pri odmietnutí transplantovaného štepu. Nadexpresia Mn-SOD dokáže úspešne potlačiť tumorogenitu v rôznych typoch nádorových buniek, čo poukazuje na jej úlohu ako jedného z tumor-supresívnych faktorov v širokej škále nádorových ochorení.

3.1.3 SUPEROXID DISMUTÁZA

Fe-SOD sa vyskytuje u baktérií, húb, vyšších rastlín a v riasach, ale tento enzým nie je prítomný u človeka. Fe-SOD nadobúda formu diméru, alebo tetraméru, ktorý je lokalizovaný v cytoplazme buniek. Železo v aktívnom centre enzýmu osciluje medzi oxidačným stupňom Fe^{2+} a Fe^{3+} , pričom mechanizmus katalýzy je zhodný s mechanizmom kovov prítomných u vyššie spomínaných SOD foriem.

Ani Mn-SOD, ani Fe-SOD nie sú na rozdiel od CuZn-SOD inhibovateľné kyanidmi. Okrem inhibície sa jednotlivé SOD od seba líšia aj rýchlosťou katalýzy reakcií v alkalickom prostredí. Kým pri fyziologickom pH je rýchlosť katalýzy superoxidového radikálu u všetkých SOD podobná, v alkalickom prostredí katalytická aktivita Mn-SOD a Fe-SOD výrazne klesá.

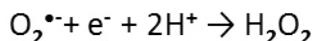
V rôznych baktériách a vyšších rastlinách sa nachádzajú aj iné typy štruktúrne odlišných SOD, ktoré v aktívnych centrách obsahujú ióny železa, mangánu, alebo medi. V cyanobaktériách a streptomycétach boli identifikované aj tetramérne a hexamérne SOD, ktorých katalytický mechanizmus zabezpečujú ióny niklu, oscilujúce medzi oxidačným stupňom Ni^{2+} a Ni^{3+} .

Napriek tomu, že antioxidantné enzýmy si ľudský organizmus dokáže syntetizovať sám, môžeme ich prijímať aj v potrave. Príjem stravy s vysokým obsahom antioxidantných enzýmov tak dokáže do istej miery ovplyvniť oxidačný status a posilniť antioxidantnú obranu organizmu, podobne ako je to u enzýmových antioxidantov.

Bolo dokázané, že príjem SOD v potrave má pozitívny vplyv na niektoré ochorenia. Potraviny, v ktorých sa SOD nachádza v najväčšom množstve sú kapusta, ružičkový kel, brokolica, pšenica a jačmeň. Štúdie sledujúce účinky exogénnej SOD preukázali pozitívny účinok tohto enzýmu v úlohe profylaktika pri poškodení nervových buniek pri amyotrofickkej laterálnej skleróze, zápale, popáleninách, ochorení prostaty, artritíde a rohovkovom vrede. Suplementácia SOD tiež eliminuje dlhotrvajúce následky oxidačných poškodení buniek spôsobených radiačným žiarením a ako následok fajčenia. Podľa výsledkov štúdií, SOD aplikovaná v topickej forme redukuje aj vznik vrások a jaziev a prispieva k redukcii pigmentových škvŕn, preto sa využíva aj v kozmetike. Navyše, SOD pomáha prenášať $\cdot NO$ do vlasových folikul a znižuje tak vypadávanie vlasov, zapríčinené genetickou predispozíciou, alebo nadmernou produkciou voľných radikálov. SOD eliminuje voľné radikály, ktoré spôsobujú odumieranie vlasových folikulov a prenesený $\cdot NO$ zároveň relaxuje krvné cievy, čím sa zvyšuje prívod krvi k folikulom. Tento komplexný mechanizmus SOD dokáže nielen predísť, ale aj zvrátiť proces vypadávania vlasov.

3.2 SUPEROXID REDUKTÁZY (SOR)

U prokaryotov, u niektorých druhov anaeróbných baktérií sa nachádzajú enzýmy superoxid reductázy, ktoré priamo redukovujú superoxidový radikál, za vzniku H_2O_2 , bez tvorby nežiaduceho O_2 :

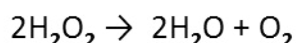


SOR sú nehémové proteíny s obsahom iónov železa, viazaného na štyri molekuly histidínu a jednu molekulu cysteínu v pentakoordinačnom cykle. Donormi elektrónov u SOR sú prevažne kofaktory NADH, alebo NADPH.

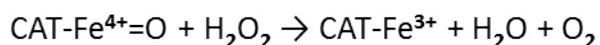
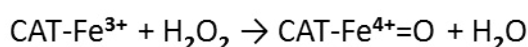
3.3 KATALÁZY (CAT)

Dismutácia superoxidového radikálu vedie k produkcii peroxidu vodíka, ktorý je tiež pomerene silným oxidačným činidlom. Preto sú všetky aeróbne organizmy vybavené enzýmovými systémami, ktoré zabezpečujú jeho rozklad. K týmto systémom patria predovšetkým katalázy a peroxidázy. Katalázy sú tetramérne enzýmy, zastúpené prakticky vo všetkých tkanivách, no ich najvyššia koncentrácia je v pečeni a v erytrocytoch. Na subcelulárnej úrovni sa tieto enzýmy vyskytujú v membránovo viazanej forme v peroxizómoch, organelách pre ktoré je typická zvýšená produkcia H_2O_2 . U cicavcov vzniká H_2O_2 v peroxizómoch ako vedľajší produkt oxidácie mastných kyselín s dlhým reťazcom, ktoré sú v nich čiastočne skrátané, aby mohli podstúpiť β -oxidáciou mastných kyselín v mitochondriách.

Katalázy katalyzujú dismutačnú reakciu H_2O_2 za vzniku vody a kyslíka:



Táto reakcia prebieha v dvoch krokoch:



Ako vyplýva z uvedených reakcií, mechanizmus účinku kataláz zabezpečujú ióny železa viazané na tetrapyrolové jadro, pričom každá zo štyroch podjednotiek enzýmu nesie jednu takúto molekulu. Aktívne centrá kataláz sa nachádzajú na dne priehlbín, ktoré sú lemované hydrofóbnymi aminokyselinami. Sú takmer výlučne prístupné pre H_2O_2 , čím sa predchádza blokovaniu aktívneho centra inými molekulami. Okrem hémového železa sa na každej podjednotke katalázy nachádza aj jedna molekula NADPH. Jej prítomnosť môže byť potrebná pri nízkej koncentrácii H_2O_2 , kedy sú železité ióny katalázy v prvej reakcii oxidované, no nízka koncentrácia H_2O_2 neumožňuje spätnú redukciu Fe^{4+} iónov v aktívnom centre enzýmu. NADPH slúži v takomto prípade ako donor elektrónov a recykluje katalázu do pôvodného aktívneho stavu.

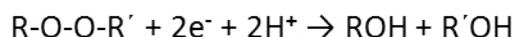
Nešpecifickými inhibítormi kataláz sú azidy, kyanidy, peroxynitry a kyselina chlórna. Špecifickým inhibítorom je aminotriazol, ktorý inhibuje oxidovanú CAT, teda je účinný len v prítomnosti H_2O_2 . U mikroorganizmov boli popísané aj CAT so šiestimi podjednotkami, v ktorých aktívnom centre sú ióny železa v tetrapyrolovom jadre nahradené iónmi mangánu. Tieto CAT nie sú inhibované azidmi, ani kyanidmi.

V ľudskej populácii sa vyskytujú mutácie vedúce k zníženej, alebo dokonca chýbajúcej aktivite CAT. Doterajšie výskumy však nezaznamenali u ľudí so zníženou aktivitou CAT vážnejšie klinické symptómy za fyziologického stavu, nakoľko existujú aj iné enzýmové systémy, ktoré dokážu efektívne eliminovať H_2O_2 a zrejme aj plne nahradiť aktivitu CAT. Experimenty na zvieratách a bunkových kultúrach s chýbajúcim génom CAT však poukázali na zvýšenú citlivosť buniek pri oxidačných poškodeniach spojených s generovaním vysokých koncentrácií H_2O_2 .

Využitie CAT ako antioxidantov si našlo svoje miesto v kontaktológii, kde sa pridávajú do roztokov na uchovávanie a čistenie šošoviek. V dermatológii sú CAT používané ako zložky masiek s obsahom peroxidu vodíka, ktoré sa používajú na zvýšenie oxygenácie a regeneráciu vrchných vrstiev epidermy. CAT sú využívané aj v potravinárstve na odstránenie peroxidu vodíka z mlieka pri produkcii syrov a pri balení potravín, kde zabraňujú ich oxidácii.

3.4 PEROXIDÁZY

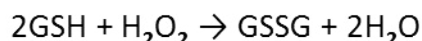
Ďalšou veľkou skupinou enzýmov, ktoré katalyzujú rozklad peroxidov, teda aj peroxidu vodíka, sú peroxidázy. Vo všeobecnosti ich mechanizmus účinku spočíva v prenášaní elektrónov vodíka na peroxidy za redukcie peroxidu:



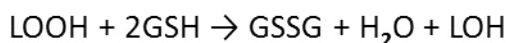
V ich aktívnom centre sa spravidla ako redoxné systémy vyskytujú molekuly hému s naviazaným železom, glutatión, cysteín, selenocysteín, alebo tioredoxíny.

3.4.1 GLUTATIÓN PEROXIDÁZY (GPx)

Výskyt izoenzýmov GPx je typický výhradne pre živočíšnu ríšu, kým samostatne antioxidantne pôsobiaci tripeptid GSH sa nachádza aj u rastlín a baktérií. Glutatión peroxidázy sú selén-dependentné enzýmy, ktoré využívajú redukovaný tripeptid glutatión ako donor elektrónov na redukciu H_2O_2 :

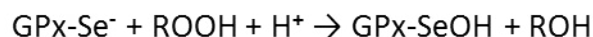


GPx sa podieľajú aj na antioxidantnej ochrane mastných kyselín, u ktorých redukujú oxidované hydroperoxidy na alkoholy:

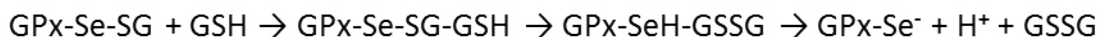
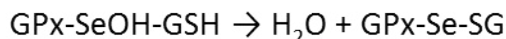


Zo štruktúrneho hľadiska sú GPx1, GPx2 a GPx3 tetraméry, ktoré nesú na každej z podjednotiek v aktívnom centre okrem molekuly GSH aj atóm selénu vo forme selenocysteínu, preto sa aj GPx zaraďujú medzi selenoenzýmy (2.1.2 Selén). GPx4 je monomér s jedným atómom selénu v centre, mechanizmus jeho katalytického účinku je však zhodný s prvými tromi izoenzýmami GPx. Výnimkou u glutatión peroxidáz je GPx5, ktorý nepatrí medzi selenoenzýmy, a preto je aj jeho mechanizmus účinku odlišný od ostatných uvedených izoenzýmov.

Prekurzorom selenocysteínu v aktívnom centre GPx selenoenzýmov je selénofosfát, ktorý je syntetizovaný enzýmom selénofosfát syntetázou. Tento enzým je zároveň potrebný aj na zabudovanie selenocysteínu do selénoproteínov. Selenocysteín je súčasťou katalytického reakčného mechanizmu GPx, kde v prvom kroku reaguje selenol (GPx-Se^-) s peroxidom za vzniku redukovaného produktu a selénovej kyseliny (GPx-SeOH):



V ďalšom kroku sa GPx-SeOH regeneruje postupne naviazaním dvoch molekúl GSH za vzniku oxidovaného glutatiónu – GSSG a redukovaného selenolu:



V prípade vyčerpania GSH (napríklad, ak pri nadmernej záťaži organizmu xenobiotikami je GSH použitý v konjugovaných reakciách) ho môžu v týchto regeneračných reakciách nahradiť aj tioredoxínové systémy.

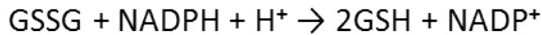
U cicavcov tvorí rodinu GPx päť izoenzýmov s charakteristickou funkciou a odlišnou lokalizáciou na úrovni tkanív. Intracelulárne, v cytosóle a mitochondriách sa nachádza enzým **GPx1**, ktorý je zastúpený vo vysokých množstvách v erytrocytoch, obličkách a pečeni. V plazme a niektorých ďalších extracelulárnych tekutinách (plúcna, očná, amniotická a semenníková tekutina) sa vyskytuje iný typ peroxidázy - **GPx3**. Expresia GPx3 prebieha z väčšej časti v obličkách a miera jej aktivity závisí od koncentrácie GSH v uvedených extracelulárnych tekutinách. Pre bunky lemujuce gastrointestinálny trakt je typický výskyt **GPx2**. Tento izoenzým je potrebný pre antioxidantnú ochranu hydroperoxidov mastných kyselín pochádzajúcich z potravy, prípadne vznikajúcich pri vstrebávaní lipidov. **GPx4** je typická pre antioxidantnú ochranu fosfolipidových hydroperoxidov. GPx4 je zastúpená vo vysokej koncentrácii v cytosóle a membránovej frakcii buniek. Na úrovni tkanív sa vyskytuje predovšetkým v obličkách a semenníkoch. Tento enzým redukuje na rozdiel od ostatných GPx aj esterifikované hydroperoxydy mastných kyselín a cholesterolu priamo v membránach a lipoproteínoch. Navyše redukuje aj tymín hydroperoxid, ktorý vzniká oxidáciou tymínu v DNA. Na rozdiel od GPx2 a GPx3, ktorých výskyt je obmedzený takmer len na vyššie uvedené tkanivá, GPx1 a GPx4 sú vo všeobecnosti zastúpené vo väčšine tkanív. Katalytická aktivita GPx4 je však v porovnaní s GPx1 nižšia. Ako posledný identifikovaný izoenzým tejto skupiny bol **GPx5**, ktorého aktivita nie je viazaná na selén. GPx5 je exprimovaný výlučne v semenníkoch, kde jeho úloha spočíva v antioxidantnej obrane spermii. Bunkové membrány spermii obsahujú vysoké percento polynenasýtených mastných kyselín, preto sú extrémne citlivé na oxidačný stres, ktorý môže pri ich nadmernom poškodení viesť až k neplodnosti, čo poukazuje na dôležitú úlohu GPx5 pri reprodukcii.

Spoločným inhibítorom všetkých GPx je merkaptosukcinát. Výskumy na myšiach potvrdili, že kým *knockout* génu GPx1 a GPx2 vedie len k zvýšenej citlivosti na oxidačné poškodenie, zápalom gastrointestinálneho traktu a nádorom, zvieratá s *knockoutovaným* génom GPx4 nie sú životaschopné.

Vyššie popísaný katalytický mechanizmus GPx vysvetľuje dôležitosť príjmu selénu ako stopového prvku v potrave v dostatočnom množstve. Najväčšia časť selénu je v organizme viazaná na glykoselenoproteín plazmy – **selénoproteín P**, ktorý zabezpečuje transport selénu do periférnych tkanív. Výsledky experimentov poukázali aj na možnosť vlastnej antioxidantnej aktivity tohto proteínu vo fosfolipidových hydroperoxydoch s využitím tioredoxínov ako donórov elektrónov. Podobné antioxidantné účinky má aj **selénoproteín W** lokalizovaný intracelulárne. Z antioxidantných enzýmov je selén aj súčasťou **metionín sulfoxid reductázových (MSR) enzýmových systémov**, ktoré sa podieľajú na oprave (redukcii) sulfoxidovaných reziduí metionínu v oxidačne poškodených proteínoch. Tieto systémy pozostávajú z MSR-A enzýmov, ktoré obsahujú v aktívnom centre cysteín a redukujú oxidované metionín sulfoxidy MRS-B enzýmov, ktoré recyklujú oxidované MRS-A. Pri redukčných reakciách metionín sulfoxid reductázy sú využívané na jej recykláciu enzýmy selénoproteíny, alebo tioredoxíny ako súčasť MRS-B enzýmov. MRS sú exprimované predovšetkým v dreni obličiek a v pečeni, pričom dôvodom vysokej expresie MSR v detoxikačných orgánoch by mohla byť antioxidantná ochrana proteínov dôležitých pre biotransformačné reakcie. MSR redukujú aj voľný oxidovaný metionín, ktorý je pre organizmus toxický a zvyšujú tak koncentrácie metionínu dostupného pre anabolické reakcie proteínov v tkanivách. Ukázalo sa, že cyklická oxidácia a redukcia metionínu v proteínoch predstavuje jeden z regulačných modov pre riadenie niektorých ich fyziologických funkcií, a teda MSR sú aj regulačnými enzýmami. Pre výskum antioxidantnej aktivity MSR boli vyvinuté MSR *knockoutované* myši, ktoré sa dožívali v porovnaní so zdravými jedincami nižšieho veku, boli citlivejšie na oxidačný stres

a trpeli neurologickými poruchami.

Pretože kumulácia GSSG v bunkách je pre ne toxická a v čase oxidačného stresu musia bunky zabezpečiť rýchle obnovenie GSH, disponujú recyklačným enzýmom - **NADPH – dependentnou glutatión reduktázou** (2.4.1 Glutatión). Tento enzým je lokalizovaný v eukaryotických bunkách v cytoplazme a mitochondriách. Pri redukcii GSSG na GSH využíva elektróny z NADPH, ktoré sú prenášané na GSSG cez ďalšie dve centrá enzýmu v jeho aktívnom centre -FAD koenzým a disulfidový mostík:



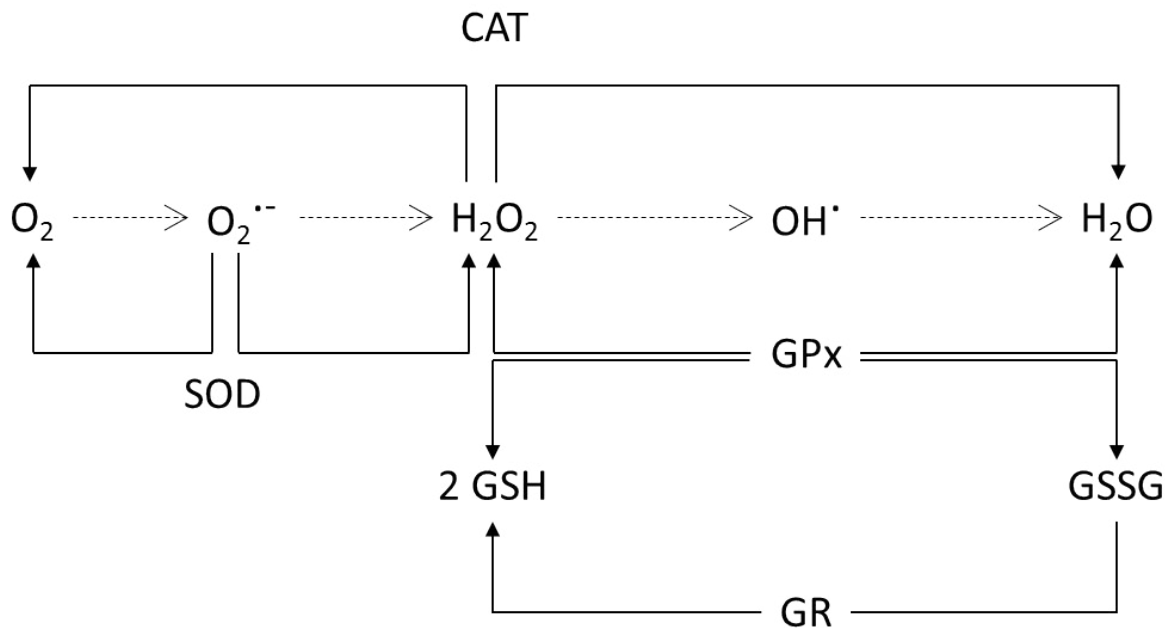
Okrem GSSG môžu byť substrátmi pre glutatión reduktázu aj zmiešané disulfidy GSH s inými tiolmi. Znížená aktivita glutatión reduktázy, ktorá sa vyskytuje ako následok diéty s nízkym obsahom riboflavínu, alebo ako nežiaduci účinok niektorých liekov (olanzapín, pantoprazol, 5-fluoruracil, metotrexát), preto môže ovplyvniť priebeh reakcie organizmu na oxidačný stres.

GSH je aj súčasťou cytosólových **glyoxylázových enzýmových systémov**, ktoré zahŕňajú dva enzýmy: **glyoxylázu I** (v jej štruktúre je inkorporovaný GSH, ktorý je v priebehu katalýzy reakčným partnerom oxidovaný) a **glyoxylázu II** (regeneruje oxidovaný GSH glyoxylázy I). Tieto systémy sa podieľajú na rýchlej eliminácii prooxidačne pôsobiacich dikarbonylov glyoxálu a metylglyoxálu, ktoré vznikajú peroxidáciou lipidov a aminokyselín, ako aj oxidačnou degradáciou sacharidov. Glyoxály sú teda bežnou súčasťou intermediárneho metabolizmu, ale za podmienok oxidačného stresu ich produkcia stúpa. Dochádza tak k dodatočnému vystupňovaniu oxidačných reakcií viacerými mechanizmami, kde glyoxály:

- narušujú mitochondriálnu respiráciu a vedú k zvýšenej produkcii ROS
- alternatívnou cestou glykujú proteíny a generujú produkty pokročilej glykácie. Produkty pokročilej glykácie ďalej rozvíjajú oxidačný stres tým, že slúžia ako ligandy receptorov, ktorých aktivácia vedie k zvýšenej expresii enzýmov generujúcich ROS a RNS (SOD, NADPH-oxidáza, myeloperoxidáza, NOS)
- chelatujú kovové ióny, čím vytvárajú nové redoxné centrá, ktoré katalyzujú tvorbu voľných radikálov
- oxidujú DNA a vytvárajú v jej duplexe priečne väzby, čo spôsobuje mutácie DNA
- reagujú s membránovými lipidmi, čo vedie až k disrupcii membrán

Glyoxylázové systémy, ktoré rozkladajú škodlivé dikarbonyly, sú preto významnou súčasťou antioxidantnej enzýmovej výbavy organizmu.

Antioxidačnú aktivitu, podobnú glutatión peroxidázam vykazujú aj **S-glutatión transferázy**, ktoré boli pôvodne nazvané „**neselénové glutatión peroxidázy**“. Tieto enzýmy sú lokalizované intra- aj extracelulárne, pričom ich primárnou úlohou v organizme je väzba xenobiotík a ich následná eliminácia z organizmu. Primárne ide teda o detoxifikačné enzýmy, čomu nasvedčuje aj ich vysoká koncentrácia v pečeni, kde tvoria až 10% zo solubilných proteínov. S-glutatión transferázy katalyzujú rozklad organických hydroperoxidov (nie však H₂O₂) reakciou s GSH za vzniku alkoholov a GSSG. Význam týchto enzýmov spočíva v antioxidantnom pôsobení pri peroxidácii lipidov, kde sú podobne ako GPx4 schopné katalyzovať rozklad oxidovaných esterifikovaných mastných kyselín a podieľajú sa aj na metabolizácii ďalších rozkladových produktov peroxidácie mastných kyselín (napr. HNE). S-glutatión transferázy môžu tiež nahrádzať aktivitu glutatión peroxidáz v prípade nízkeho príjmu selénu v diéte.



Obrázok 20. Miesta zásahu hlavných antioxidantných enzýmov pri tvorbe voľných radikálov kyslíka

Voľné radikály kyslíka sú degradované v reakciách katalyzovaných špecifickými antioxidantnými enzýmami. Superoxid dismutázy (SOD) rozkladajú superoxidový radikál za vzniku peroxidu vodíka, ktorý je degradovaný katalázou (CAT), alebo glutatión peroxidázou (GPx) na vodu. Kým za katalytický účinok CAT zodpovedajú ióny železa v jej aktívnom centre, aktivita GPx je viazaná na tripeptid glutatión (GSH), ktorý je donorom voľných elektrónov a sám je tak oxidovaný na dimér glutatiónu (GSSG). Redukciu GSSG zabezpečuje NADPH-dependentná glutatión reductáza (GR).

3.4.2 TIOREDOKSÍNOVÉ ENZÝMY

Tioredoxínové enzýmy sú známe už niekoľko desaťročí, no ich úloha v antioxidantných reakciách bola objavená len nedávno. Sú to enzýmy, ktoré na redukciu oxidovaných substrátov využívajú tioredoxíny. Doposiaľ boli známe len ako stimulanty rastu niektorých buniek a proteínových faktorov (napr. faktor odvodený od leukemických T-buniek). Tioredoxíny sú antioxidantne pôsobiace proteíny *per se* (2.4.2 Tioredoxíny), sú však aj súčasťou a zabezpečujú mechanizmus účinku ribonukleotidových reductáz a metionín sulfoxid reductáz. Oxidované tioredoxíny sú redukované NADPH-dependentnými tioredoxínovými reductázami, selénoenzýmami s FAD kofaktorom v aktívnom centre, ktoré facilitujú prenos elektrónov.

3.4.3 PEROXIREDOXÍNY

Peroxiredoxíny (Prx) sú dimérne enzýmy redukujúce ako H_2O_2 , tak aj organické peroxidy. Nie sú závislé od kofaktorov, mechanizmus ich antioxidantného účinku zabezpečuje reziduum cysteínu v ich aktívnom centre. Tiolová skupina cysteínu je oxidovaná peroxidmi za vzniku kyseliny sulfénovej (cys-SOH). Táto reaguje s druhým tiolom za vzniku disulfidu, ktorý je následne redukovaný tioredoxínmi. Podľa regenerácie tiolu v aktívnom centre sa peroxiredoxíny delia na typické 2-cys Prx (tiol v aktívnom centre je regenerovaný tiolovou skupinou na druhej podjednotke), atypické 2-cys Prx (tiol v aktívnom centre je regenerovaný tiolovou skupinou na rovnakej podjednotke) a 1-cys Prx (nie je známe, ako je tiol v aktívnom centre regenerovaný). V súčasnosti je známych minimálne 6 odlišných typov peroxiredoxínov, kategorizovaných podľa subcelulárnej lokalizácie. Podľa výsledkov niektorých štúdií sú peroxiredoxíny dokonca významnejšími antioxidantnými enzýmami ako GPx a CAT, pričom tvoria až do 0,8 % z celkových solubilných proteínov buniek.

3.5 INDOLAMÍN-2,3-DIOXYGENÁZA (IDO)

IDO je enzým, ktorý oxidačne decyklizuje (degraduje) indolový kruh viacerých metabolicky významných zlúčenín, ako je tryptofán, tryptamín, melatonín, či serotonín. Medzi antioxidantné enzýmy je ho možné zaradiť preto, že pri katalýze využíva ako kofaktor superoxidový radikál, ktorý vycytáva, najmä za podmienok, pri ktorých je aktivita SOD inhibovaná. IDO je hém-dependentný, cytosólový enzým, ktorý sa nachádza prednostne v monocytoch, makrofágoch a mikrogliálnych bunkách v mozgovom parenchýme. Bolo dokázané, že k stimulácii IDO dochádza v prostredí prozápalových cytokínov, predovšetkým IFN γ , vírusov, ale aj pri podaní bakteriálneho endotoxínu, čo sú všetko podmienky, ktoré sa spájajú so vznikom oxidačného stresu.

3.6 PARAOXONÁZY

Názov tejto skupiny enzýmov je odvodený od ich schopnosti hydrolyzovať estery toxických organofosfátov, ktorých typickým zástupcom je paraoxon. V súčasnosti sú u ľudí známe tri paraoxonázy označované ako PON1, PON2 a PON3 s 60-65% homológiou v ich aminokyselinovej sekvencii. Napriek tomu, že je známe veľké množstvo syntetických exogénnych zlúčenín, ktoré PON hydrolyzujú, nie je celkom jasné, či tieto enzýmy majú aj endogénny substrát, a teda aj konkrétnu fyziologickú funkciu. PON enzýmy sú Ca²⁺-dependentné enzýmy, exprimované primárne v pečeni. Ióny kalcia sú nielenže nutné pre vlastný mechanizmus hydrolyzy substrátov, ale prispievajú aj k stabilizácii enzýmu. PON nesú vo svojej štruktúre tri tiolové skupiny. Kým dve z nich tvoria intramolekulový disulfidový mostík, tretia skupina v blízkosti aktívneho centra PON zostáva voľná. Jej význam spočíva v rozpoznaní a väzbe substrátu, no nepodieľa sa na vlastnej hydrolyze organofosfátov. Výsledky experimentov svedčia o tom, že tretia voľná tiolová skupina je kľúčová pre antioxidantný účinok PON. Výmena tohto cysteínu za alanín, alebo serín vedie k strate antioxidantnej aktivity PON.

HDL častice facilitujú distribúciu PON do periférnych tkanív organizmu, ktoré PON neexprimujú. PON sa viažu na HDL častice prostredníctvom fosfolipidov, ale ich väzbu stabilizuje najmä hlavný apolipoproteín HDL častíc – Apo-A1. Ukázalo sa, že rozdiel v štruktúre medzi Apo-A1 a Apo-A2 (druhý najčastejšie sa vyskytujúci apolipoproteín HDL častíc, tiež viaže PON) je zodpovedný za zníženú stabilitu a antioxidantnú aktivitu PON. Kým Apo-A1 podporuje antioxidantnú aktivitu PON, Apo-A2 destabilizuje jej väzbu na HDL a má tak v konečnom dôsledku opačný účinok.

Najčastejšie študovaná PON je sérová PON1, ktorá je z väčšej časti v plazme viazaná na HDL častice (čiastočne je viazaná aj na VLDL častice a chylomikróny). HDL-PON má profylaktickú funkciu pri medou katalyzovanej oxidácii nielen HDL, ale aj LDL častíc v cirkulácii. Bolo dokázané, že PON1 predlžuje oxidačnú „lag fázu“ a redukuje hladiny aldehydov a peroxidov, vznikajúcich oxidáciou HDL častíc. V prospech antioxidantnej aktivity PON1 vypovedajú aj výsledky *in vitro* štúdií, v ktorých PON1 inkubovaná v prítomnosti lipidových peroxidov viedla k ich rozkladu. PON1 rozkladá aj peroxid vodíka, ktorý je pri ateroskleróze produkovaný bunkami ciev v najvyššej miere spomedzi všetkých ROS. Pri nízkej antioxidantnej obrane je peroxid vodíka v procese oxidačného stresu metabolizovaný na agresívnejšie hydroxylové radikály, ktoré sa intenzívne podieľajú na peroxidácii lipidov. Eliminácia peroxidu vodíka PON1 je ďalšou cestou, ktorou sa v skorej fáze predchádza reťazovým peroxidáciám lipoproteínov. Výraznú antioxidantnú aktivitu prejavuje PON1 pri rozklade hydroperoxidov kyseliny linolovej a oxidovaných fosfolipidov, ktorých hlavnou kyselinou je arachidonát, ale rozkladá aj oxidované mastné kyseliny, ktoré sú súčasťou cholesterylesterov. Presný mechanizmus hydrolyzy oxidovaných esterov mastných kyselín paraoxonázou nie je dodnes celkom preskúmaný, ale podľa výsledkov štúdií nesúvisí s cheláciou iónov medi, ani s potenciálnym prenosom lipidových hydroperoxidov z LDL na HDL častice. Podmienkou antioxidantnej aktivity PON1 nie sú ani ióny kalcia, no musí si zachovať vlastnosti enzýmu, nakoľko pri tepelnej inaktivácii sa stráca aj jej antioxidantná funkcia.

K antioxidantnej aktivite PON prispieva aj jej laktonázová aktivita – schopnosť štiepiť laktony. Jedným z jej substrátov je homocystein-tiolaktón (Hcy-tiolaktón), ktorý vzniká intracelulárnou cykli-

záciou, reakciou medzi tiolovou a karboxylovou skupinou Hcy. Zabudovávanie Hcy do proteínov je spôsobené chybným výberom aminokyseliny metionyl-tRNA syntázou, ktorá zamieňa aminokyselinu metionín za Hcy pri syntéze metionyl-tRNA. Cyklický Hcy-tiolaktón je nestabilný intermediát, ktorý je pre bunky toxický, najmä preto, že vedie k rýchlej N-homocysteinyllácii lyzínových reziduí v proteínoch a spôsobuje stratu ich funkcie. U N-homocysteinylovaných LDL častíc bola dokázaná ich zvýšená náchylnosť k oxidácii a rýchlejšie odstraňovanie makrofágmi z cirkulácie. Hcy-tiolaktón navyše vyvoláva aj zápalovú a autoimunitnú odpoveď, endoteliálnu dysfunkciu a trombózu. Nakoľko Hcy-tiolaktón je endogénny produkt a PON dokázateľne zodpovedá za jeho rozklad, bolo navrhnuté, že toto je pravá fyziologická úloha PON v organizme a preto by sa mali tieto enzýmy premenovať na homocysteín-tiolaktonázy.

Tabuľka 6. Zmeny, ktoré vyvoláva knockout génu PON1 v myšiach

Zvýšenie hladín oxidovaných LDL a IDL častíc
Zvýšená rýchlosť oxidácie LDL častíc a ich odstraňovania z cirkulácie
Zvýšená adhézna schopnosť leukocytov, zvýšenie exprese adhezívnych molekúl (ICAM1, P-selektín)
Zrýchlený vznik ateromatóznych plakov
Zvýšené hladiny superoxidového radikálu v stene aorty
Skrátený čas trombotickej oklúzie

Pretože oxidačný stres a vznik peroxidovaných lipoproteínov sú nezávislými rizikovými faktormi rozvoja aterosklerózy, aktivita sérovej PON1 je spájaná s profylaktickým účinkom pri vzniku a rozvoji tohto ochorenia. Z pohľadu patogenézy aterosklerózy spôsobujú voľné radikály peroxidáciu lipidov nielen v lipoproteínoch, ale aj v endotelových bunkách ciev a makrofágoch, ktoré nakoniec infiltrujú do ateromatóznych plakov a menia sa na penové bunky. Okrem toho, že makrofágy s oxidovanými lipidmi sa ukladajú do ateromatóznych plakov, podporujú tiež vznik oxidovaných LDL častíc. Preto podpora zvýšeného efluxu cholesterolu z makrofágov a inhibícia jeho oxidácie paraoxonázou 1, vedie sekundárne k poklesu tvorby oxidovaných LDL častíc v cirkulácii. Keď uvážime, že PON1 aktivita je navyše dôležitá aj pre zníženie exprese adhezívnych molekúl a potlačenie trombózy, je zrejmé, že PON1 má celkový protektívny účinok na kardiovaskulárny systém (tab. 6).

3.7 HÉM OXYGENÁZA

Molekula hému je tvorená porfyrínovým (tetrapyrrolovým) jadrom, ktoré viaže centrálny atóm železa. Hém je súčasťou proteínov transportujúcich kyslík (hemoglobín, myoglobín), alebo tvorí prostetickú skupinu oxidačno-redukčných enzýmov (cytochrómy), u ktorých zabezpečuje ich katalytický mechanizmus. Voľný hém, ktorý ešte nebol inkorporovaný do proteínov, alebo sa uvoľňuje z hémových enzýmov počas oxidačného stresu je pri koncentráciách prekračujúcich 1 $\mu\text{mol/l}$ pre organizmus vysoko toxický. V plazme sa preto voľný hém viaže na transportný proteín hemopexín, ktorý je exprimovaný v pečeni a jeho syntéza stúpa v prvých fázach zápalových reakcií, pri zvýšenom rozpade hémových proteínov. Podobnú funkciu má haptoglobín, ktorý viaže oxidačne pôsobiaci hemoglobín, uvoľňovaný počas degradácie erytrocytov. Pri masívnej hemolýze, keď je prekročená väzbová kapacita haptoglobínu, je hemoglobín rýchlo oxidovaný na ferrihemoglobín, z ktorého sa uvoľňuje hém. Za týchto podmienok môže dôjsť aj k prekročeniu väzbovej kapacity hemopexínu a zvýšeniu koncentrácie voľného hému. Úloha hemopexínu v ochrane pred oxidačným stresom bola potvrdená aj na štúdiách s hemopexín *knockout* myšami, ktoré boli pri hemolýze viac náchylné na oxidačné poškodenie v porovnaní so zdravými jedincami. Toxicita voľného hému je daná prítomnosťou koordinačne viazaných iónov železa v molekule, ktoré sú schopné katalyzovať Fentonovu reakciu a zúčastňujú sa na vzniku hydroxylových radikálov. Negatívne následky prooxidačnej aktivity hému boli študované podrobnejšie až v ostatnom desaťročí. Vysoko lipofilný hém ľahko preniká do lipidovej dvojvrstvy membrán, kde sprostredkováva oxidačné reakcie, vyvolávajúce narušenie cytoskeletu a deštrukciu buniek. Navyše,

hém uvoľnený z methemoglobínu oxiduje priamo v krvi lipidové zložky LDL častíc a vznikajúce lipo-peroxydy spôsobujú endotelovú cytolýzu. Zistilo sa, že hemín (oxidovaná forma hému s iónmi Fe^{3+}) vedie aj k aktivácii mechanizmov vrodenej imunitnej odpovede. Po vystavení endotelových buniek hemínu bola zaznamenaná zvýšená expresia adhézných molekúl – ICAM-1, VCAM-1 a E-selektínu. Hemín tiež indukuje produkciu TNF α prozápalovými makrofágmi a apoptózu buniek. Najnovšie výsledky dokázali, že hém uvoľnený z hemoglobínu je jedným z patogenetických faktorov, ktoré pri mikrobiálnych infekciách vedú k ťažkej sepe. Hladiny hému v organizme musia byť preto prísne regulované na úrovni syntézy a degradácie. Degradčné enzýmy, ktoré zabezpečujú rýchly rozklad voľného hému je zároveň možné považovať za antioxidanty. V katabolizme hému je za kľúčový enzým považovaná hém-oxygenáza, ktorá je rýchlosť limitujúcim enzýmom celého procesu. Tento enzým sa vyskytuje v dvoch izoformách. V pečeni a slezine konštitutívne exprimovaná **hém-oxygenáza 1 (HO-1)** je indukateľná viacerými stimulmi spojenými s oxidačným stresom (cytokíny, ťažké kovy, hypoxia, hyperoxia, ROS, endotoxín). **Hém-oxygenáza 2 (HO-2)** je konštitutívne exprimovaná takmer vo všetkých tkanivách, ale jej vysoké koncentrácie sa nachádzajú v mozgu, obličkách a semenníkoch. Kým HO-2 rozkladá hém za fyziologických podmienok, HO-1 je aktívna najmä počas oxidačného zaťaženia, pri zvýšenej akumulácii voľného hému. Fakt, že HO-1 je indukovaná počas oxidačného stresu a odstraňuje toxický hém, ju zaradil medzi antioxidačné enzýmy. HO rozkladajú hém na oxid uhoľnatý (uvoľňovaný pľúcami, jeho koncentrácia vo vydychovanom vzduchu udáva mieru aktivity hém-oxygenázy), ióny voľného železa a biliverdín, ktorý je následne redukovaný na bilirubín. Za hlavný antioxidačný mechanizmus HO-1 sa považuje rýchly rozklad hému, ale tento enzým zrejme disponuje aj inými mechanizmami, ktoré vedú k eliminácii oxidačného stresu. Takéto hypotézy potvrdili experimenty na bunkách s transfektovaným mutantom HO-1, ktorý nebol schopný degradovať hém, no napriek tomu dokázal bunky ochrániť pred oxidačným stresom. Bolo napríklad dokázané, že HO-1 priamo inhibuje aktiváciu tkanivových makrofágov, čím dochádza k zníženiu produkcie TNF α a IL-6 pri odpovedi na zápalové reakcie vyvolané oxidačným stresom. Antioxidačná aktivita hém-oxygenázy je teda zrejme založená na viacerých mechanizmoch, aj keď nie všetky sú celkom známe a na ich objasnenie je potrebný dodatočný výskum. Navyše, za sekundárny antioxidačný účinok HO-1 možno považovať aj aktivitu rozpadových produktov hému- CO a biliverdínu, ktoré sú antioxidantmi *per se*.

3.7.1 BILIVERDÍN, BILIRUBÍN A OXIDU UHOĽNATÉHO V ÚLOHE ANTI-OXIDANTOV

Bilirubín, vznikajúci redukciou biliverdínu, slúži ako biochemický marker dysfunkcie hepatobiliárneho systému, alebo poškodenia metabolizmu hémových proteínov. Voľný bilirubín je pre bunky vo vysokých koncentráciách (>335 $\mu\text{mol/l}$) toxický, predovšetkým v centrálnom nervovom systéme vedie jeho kumulácia v bunkách k bilirubínovým encefalopatiám. V *in vitro* experimentoch bol však zaznamenaný silný antioxidačný účinok bilirubínu a jeho prekurzora biliverdínu pri peroxidácii lipidov. Obe tieto látky majú dokonca silnejší antioxidačný účinok v porovnaní s α -tokoferolom. Bilirubín je napríklad vo fyziologických koncentráciách (10 nmol/l) schopný zabrániť oxidácii 10 000-krát vyššieho množstva molekúl peroxidu vodíka. Dobré antioxidačné účinky boli zaznamenané u bilirubínu aj v reakcii so superoxidovým radikálom a niektorými RNS. Bolo tiež dokázané, že bilirubín dokáže inhibovať NADPH-oxidázu, ktorá prispieva k produkcii superoxidových radikálov. Bilirubín a biliverdín sú vysoko lipofilné látky, preto poskytujú antioxidačnú ochranu primárne v lipofilnom prostredí membrán. Navyše, bilirubín, ktorý je v krvi naviazaný na albumín, je tiež antioxidačne aktívny a zabraňuje peroxidácii lipidov v LDL časticiach. Antioxidačné účinky bilirubínu boli študované predovšetkým v nervových bunkách, kde *knockdown* jeho génu zvyšoval intracelulárne hladiny ROS a spôsoboval apoptózu. Zaujímavé výsledky priniesol experiment, v ktorom bol porovnávaný vplyv deplécie GSH a bilirubínu na mieru oxidačného stresu v bunke. Zistilo sa, že oveľa vyššie oxidačné zaťaženie buniek je spôsobené rozpadom bilirubínu, a to aj napriek tomu, že GSH patrí k prvej línii antioxidantov v bunkách a dosahuje v nich milimolárne koncentrácie. Profylaktické podávanie bilirubínu zvieratám, ktoré boli vystavené oxidačnému stresu dokonca zabránilo vlastnej deplécii GSH. Antioxidačný účinok bilirubínu potvrdzujú aj ďalšie štúdie, v ktorých bola sledovaná jeho antioxi-

dačná aktivita pri ischemicko-reperfúznom (I/R) poškodení tkanív. Ukázalo sa, že bilirubín pri I/R poškodení myokardu redukuje veľkosť infarktového tkaniva a mitochondriálnu dysfunkciu. Rovnaké účinky boli zaznamenané aj pri I/R tenkého čreva, kde bilirubín znížil mieru peroxidácie lipidov. Pozitívny účinok bilirubínu sa prejavil aj pri astme, kde jeho zvýšené koncentrácie viedli k redukcii zápalu a zníženiu infiltrácie leukocytov do pľúcneho tkaniva.

Antioxidačné účinky bilirubínu vysvetľujú negatívnu koreláciu medzi výskytom kardiovaskulárnych ochorení a zvýšenými hladinami voľného bilirubínu v plazme u pacientov s Gilbertovým syndrómom (GS). Tento syndróm sa vyskytuje asi u 3-17% ľudskej populácie (v závislosti od etnickej skupiny) a je charakterizovaný miernou nekonjugovanou hyperbilirubinémiou. GS je spôsobený vrodenou mutáciou génového promotora uridín difosfát glukuronozyltransferázy, enzýmu, ktorý umožňuje konjugáciu bilirubínu s kyselinou glukurónovou a jeho vylúčenie z organizmu. Pri GS je hladina uridín difosfát glukuronozyltransferázy nízka, čo má za následok znížené uvoľňovanie bilirubínu z pečene do cirkulácie a zvýšenú koncentráciu voľného bilirubínu v plazme. Štúdie u pacientov s GS potvrdili, že bilirubín je u nich jediným zvýšeným štandardným antioxidantom plazmy, a preto je pravdepodobne príčinou jej zvýšenej antioxidačnej kapacity. Zvýšené hladiny bilirubínu sa podieľajú v porovnaní s fyziologickými hladinami u zdravých jedincov efektívnejšie na vychytávaní voľných radikálov a zabraňujú tým vo vyššej miere peroxidácii lipidov, predovšetkým v LDL časticiach, ktoré sú jednou z hlavných príčin rozvoja aterosklerózy.

Mechanizmus antioxidačného pôsobenia bilirubínu je spojený s jeho oxidáciou na biliverdín. Enzým recyklujúci bilirubín – NADPH/NADH-dependentná biliverdín reduktáza je preto dôležitým článkom antioxidačného pôsobenia biliverdínu a patrí medzi antioxidačné enzýmy.

Oxid uhoľnatý je tiež produktom rozpadu hému a je považovaný za toxický plyn. Niektorí autori však na základe výsledkov svojich štúdií navrhujú, že inhlácia CO vo veľmi nízkych koncentráciách má pozitívny účinok v experimentálnych modeloch s vyvolaným I/R poškodením, sepsou, alebo pri transplantáciách.

Protektivný účinok CO je založený na aktivácii guanylátcyklázy, ktorá vedie k relaxácii hladkého svalstva a ciev. Na druhej strane je CO aj parciálnym agonistom NO-syntázy, čo má za následok spätnoväzbovú inhibíciu jej expresie. Ukázalo sa však, že cesta aktivácie guanylátcyklázy vedie súčasne k aktivácii HO-1, čo by mohol byť mechanizmus, ktorým CO uvoľňovaný pri rozklade hému ďalej cyklicky stimuluje HO-1. Štúdium signálnych dráh aktivovaných oxidom uhoľnatým nie je jednoduché, nakoľko ide o bunkovo špecifický proces, ktorý závisí zároveň od typu použitého stresora. Jednou zo signálnych dráh, ktorú CO stimuluje, je MAPK (mitogénmi-aktivovaná proteínkináza), ktorá riadi dôležité bunkové procesy ako sú zápal, diferenciácia buniek, proliferácia, apoptóza a odpoveď na stres. Výsledkom aktivácie MAPK oxidom uhoľnatým je znížená protizápalová odpoveď makrofágov pri ich stimulácii endotoxínom. CO tiež inhibuje niektoré pro-oxidačne pôsobiace enzýmy. Inhibíciou cyklooxygenázy CO prispieva k zníženiu produkcie prozápalových prostaglandínov, ktoré podporujú oxidačný stres. Rovnaký účinok má aj inhibícia cytochrómu P450, ktorý počas katalýzy generuje superoxidové a hydroxylové radikály a peroxid vodíka.

Na záver možno zhrnúť, že bilirubín, biliverdín aj CO majú rôzne antioxidačné účinky, ktoré nie sú ani zďaleka dostatočne preštudované. Napriek tomu zostáva faktom, že miera ich prínosu je daná ich nízkou koncentráciou a pri vyšších koncentráciách sa stávajú toxickými.

3.8 LITERATÚRA

Akkemik E, Şentürk M, Özgeris FB, Taser P, Çiftici M. In vitro effects of some drugs on human erythrocyte glutathione reductase. *Turk J Med Sci* 2011; 41 (2): 235-241.

Atanasiu V, Stoian I, Manolescu B, Lupescu O. The glyoxylase system – a link between carbonilic stress and human therapy. *Revue Roumaine de Chimie*, 2006, 51(9), 861–869.

Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, Eroglu J, Hsu C, Dunlop C, La Du B. Paraoxonase Active Site Required for Protection Against LDL Oxidation Involves Its Free Sulfhydryl Group and Is Different From That Required for Its Arylesterase/Paraoxonase Activities Selective Action of Human Paraoxonase Allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18:1617-1624.

Brouwers O, Niessen PM, Ferreira I, Miyata T, Scheffer PG, Teerlink T, Schrauwen P, Brownlee M, Stehouwer CD, Schalkwijk CG. Overexpression of Glyoxalase-I Reduces Hyperglycemia-induced Levels of Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Diabetic Rats. *JBiolChem*, 2011, Vol. 286, No.2: 1374–1380.

Bulmera AC, Blanchfieldb JT, Tothb I, Fassettd RG, Coombesa JS. Improved resistance to serum oxidation in Gilbert's syndrome: A mechanism for cardiovascular protection. *Atherosclerosis*, 2008, 199: 390–396.

Farid AS, Horii Y. Modulation of paraoxonases during infectious diseases and its potential impact on atherosclerosis. *Lipids in Health and Disease*, 2012, 11:92, doi:10.1186/1476-511X-11-92.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Fourth Edition, Oxford University Press, Oxford, UK, 2007.

Hermes-Lima M. *Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals*. Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. 2004 John Wiley & Sons, Inc. 319-367.

Chabory E, Damon C, Lenoir A, Kauselmann G, Kern H, Zevnik B, Garrel C, Saez F, Cadet F, Henry-Berger J, Schoor M, Gottwald U, Habenicht U, Drevet JR, Vernet P. Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *J. Clin. Invest*, 2009; 119:2074–2085.

Chiabrando D, Vinchi F, Fiorito V, Tolosano E. Haptoglobin and Hemopexin in Heme Detoxification and Iron Recycling, *Acute Phase Proteins - Regulation and Functions of Acute Phase Proteins*, Prof. Francisco Veas (Ed.), ISBN: 978-953-307-252-4, InTech, DOI: 10.5772/18241. <http://www.intechopen.com/books/acute-phase-proteins-regulation-and-functions-of-acute-phase-proteins/haptoglobin-and-hemopexin-in-heme-detoxification-and-iron-recycling>

Kontaş T, Büyükleblebici A, Büyükleblebici O. Paraoxonase: A New Biochemical Marker of Oxidant-Antioxidant Status in Atherosclerosis. *Oxidative Stress - Molecular Mechanisms and Biological Effects*, Dr. Volodymyr Lushchak (Ed.), ISBN: 978-953-51-0554-1, InTech. <http://www.intechopen.com/books/antioxidant-enzyme/oxidative-processes-and-antioxidative-metaloenzymes>

Krishnamurthy P, Wadhvani A. *Antioxidant Enzymes and Human Health*, Antioxidant Enzyme, Prof. Mohammed Amr El-Missiry (Ed.), 2012; ISBN: 978-953-51-0789-7, InTech, DOI: 10.5772/48109. <http://www.intechopen.com/books/antioxidant-enzyme/antioxidant-enzymes-and-human-health>

Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J Jr, Dionne L, Lu N, Huang S, Matzuk MM. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Sep 3;93(18):9782-7.

Lin JP, O'Donnell CJ, Schwaiger JP, Cupples LA, Lingenhel A, Hunt SC, Yang S, Kronenberg F. Association Between the UGT1A1*28 Allele, Bilirubin Levels, and Coronary Heart Disease in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2006;114:1476-1481.

Litvinov D, Mahini H, Garelnabi M. Antioxidant and Anti-Inflammatory Role of Paraoxonase 1: Implication in Atherosclerosis Diseases. *N Am J Med Sci*. 2012 November; 4(11): 523–532.

Macmillan-Crow LA, Cruthirds DL. Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic Res*. 2001 Apr;34(4):325-36.

Miriyala S, Ivan Spasojevic I, Tovmasyan A, Salvemini D, Vujaskovic Z, St. Clair D, Batinic-Haberle I.

Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics. Volume 1822, Issue 5, May 2012:794–814.

Morimatsu H, Takahashi T, Shimizu H, Matsumi J, Kosaka J, Morita K. Heme Proteins, Heme Oxygenase-1 and Oxidative Stress, Oxidative Stress - Molecular Mechanisms and Biological Effects, Dr. Volodymyr Lushchak (Ed.), ISBN: 978-953-51-0554-1, InTech, DOI: 10.5772/33757. 2012. <http://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-molecular-mechanisms-and-biological-effects/heme-proteins-hemeoxygenase-1-and-oxidative-stress>

Moskovitz J. Methionine sulfoxide reductases: ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. 2005 Jan; Vol. 1703(2):213–219.

Reed JR. Elucidating the Role of Biliverdin Reductase in the Expression of Heme Oxygenase-1 as a Cytoprotective Response to Stress, Pharmacology, Dr. Luca Gallelli (Ed.), ISBN: 978-953-51-0222-9, InTech, DOI: 10.5772/33875. <http://www.intechopen.com/books/pharmacology/elucidating-the-cytoprotective-roles-of-biliverdin-reductase-and-heme-oxygenase-1-in-the-cellular-re>

Vašková J, Vaško L, Kron I. Oxidative Processes and Antioxidative Metaloenzymes, Antioxidant Enzyme, Prof. Mohammed Amr El-Missiry (Ed.), 2012; ISBN: 978-953-51-0789-7, InTech. <http://www.intechopen.com/books/antioxidant-enzyme/oxidative-processes-and-antioxidative-metaloenzymes>

MARKERY OXIDAČNÉHO STRESU V BIOLOGICKÝCH SYSTÉMOCH A ME- TÓDY ICH STANOVENIA

Oxidačný stres môže byť príčinou, ale aj následkom rôznych ochorení, čo je jedným z dôvodov prečo si klinická prax, ale aj experimentálny výskum vyžadujú identifikáciu a zavedenie metodík na stanovenie senzitívnych a špecifických biomarkerov oxidačného stresu. V prípade, že OS je príčinným faktorom ochorenia, stanovenie jeho markerov pomáha bližšie charakterizovať patogenetické mechanizmy, ktoré môžu byť vhodným cieľom pre vývin nových liekov. Pri liečbe ochorení markery OS vypovedajú o účinnosti poskytovanej terapie. Ak je oxidačné poškodenie sekundárnym následkom iného ochorenia, môže zhodnotenie OS slúžiť ako marker predikcie, prípadne progresie primárneho ochorenia. Stanovenie biomarkerov oxidačného stresu má teda svoj význam pri určovaní diagnózy a prognózy ochorenia a účinnosti použitej terapie.

Mieru oxidačného stresu v organizme je možné vo všeobecnosti zistiť priamymi, alebo nepriamymi metódami. Medzi priame metódy patrí stanovenie voľných radikálov - reaktívnych molekúl (ROS, RNS,...). ROS sú priamo detegovateľné pomocou elektrónovej paramagnetickej/spinovej rezonancie (EPR/ESR), pri ktorej sa dajú monitorovať aj zmeny chemických foriem oxidovateľných iónov kovov, podieľajúcich sa na tvorbe OS. ESR je však pomerne málo citlivá metóda, preto sa predovšetkým na *in vivo* stanovenia (u zvierat) používa technika "spin trapping" (zachytávanie spinu). Pri tejto metóde reagujú ROS s vybranými molekulami, ktoré majú úlohu zachytávača, za vzniku menej reaktívnych a stabilných zlúčenín (naďalej radikálov), detegovateľných pomocou ESR. Keďže prekryv signálov jednotlivých voľných radikálov neumožňuje jednoznačne kvantifikovať konkrétne ROS, táto metóda sa využíva často na stanovenie celkovej koncentrácie ROS. Hlavnou prednosťou ESR je možnosť stanovenia ROS *in vivo* a sledovanie ich vzniku v jednotlivých orgánoch. Nevýhodou priameho stanovenia radikálov je nemožnosť aplikovať túto metódu u ľudí, nakoľko voľné radikály je nutné merať *in situ*, v čase ich vzniku. ESR si teda vyžaduje invazívne techniky, čo je pre bežnú klinickú prax náročná požiadavka. Otázkou je, či pre potreby zhodnotenia vplyvu OS je naozaj potrebné stanovovať celkové hladiny vybraných voľných radikálov. Voľné radikály napádajú v organizme rôzne ciele, a teda ich celkové množstvo nie je priamo úmerné poškodeniu, ktoré spôsobujú. Preto je možno viac opodstatnené merať OS *nepriamymi metódami* – kvantifikáciou oxidačne poškodených biomolekúl (proteínov, lipidov, nukleových kyselín). Na rozdiel od nestabilných reaktívnych molekúl sú oxidačne poškodené biomolekuly dostatočne stabilné na to, aby mohli byť stanovené *ex vivo*. Ďalšie nepriame metódy, ktorými možno kvantifikovať OS sú založené na detekcii hladín enzýmových a neenzýmových antioxidantov a zisťovaní miery rezistencie, ktorou organizmus odoláva zámerne vyvolanému oxidačnému poškodeniu. Pre stanovenie vplyvu niektorých konkrétnych voľných radikálov na fyziologické funkcie boli zavedené špeciálne metodiky. Napríklad vplyv superoxidového radikálu na funkciu ciev je možné merať stanovením ich rozťažnosti, pretože je známe, že $O_2^{\cdot-}$ eliminuje $\cdot NO$, ktorý ako je dobre známe sprostredkováva vazodilatáciu.

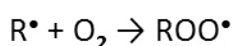
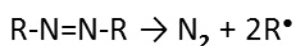
Od osemdesiatych rokov minulého storočia, keď medzi populárne metódy stanovenia OS patrili najmä test TBARS (thiobarbituric acid reactive substances), či stanovenie karbonylov, bolo vyvinutých mnoho iných, presnejších a špecifickejších metód. Napriek tomu ani v dnešnej dobe zatiaľ neexistuje

„zlatý štandard“ na overenie oxidačného poškodenia/obrany v organizme a vývoj a použitie rôznych metodík stanovenia markerov OS, ktoré sú dnes známe je stále vo fáze výskumu. Je nutné si uvedomiť, že od zvolenej metodiky stanovenia OS závisia aj výsledky štúdií, ktoré hodnotia antioxidačne účinné látky. V tejto kapitole sú zhrnuté ako priame, tak aj nepriame metódy stanovenia oxidačného poškodenia, ktoré sa v súčasnosti uplatňujú v experimentálnej a klinickej praxi.

4.1 CELKOVÁ ANTIOXIDAČNÁ AKTIVITA

V posledných rokoch bolo vyvinutých niekoľko druhov testov, ktoré umožňujú stanoviť tzv. celkovú antioxidačnú kapacitu (total antioxidant capacity, TAC) biologických vzoriek. TAC testy sú bežne využívané pri diagnostike a monitorovaní chorôb, preto sa najčastejšie uplatňujú pri plazmatických a sérových stanoveniach. Z analytického hľadiska je efektívnosť antioxidačnej účinnosti plazmy v týchto testoch hodnotená na základe schopnosti plazmy redukovať špecifické substráty. Do úvahy je treba brať heterogenitu vzorky, teda fakt, že plazma obsahuje ako hydrofilné, tak aj lipofilné kompartmenty, ktoré obsahujú príslušné vo vode a v tukoch rozpustné antioxidanty. V biologických vzorkách je tiež dôležité uvažovať aj o možných synergistických interakciách antioxidantov.

V *in vitro* testoch sú často používané ako iniciátory oxidačného stresu **azo zlúčeniny**, ktoré nesú vo svojej molekule – N = N – skupinu. Azo zlúčeniny podliehajú pri zmene teploty rozkladu za vzniku karbónových radikálov, ktoré bezprostredne reagujú s kyslíkom za vzniku peroxylového radikálu:



Vznikajúce peroxylové radikály iniciujú kaskádu peroxidácie lipidov a oxidačne poškadzujú aj proteíny. V závislosti na lipofilite použitého azo iniciátora OS, je možné generovať peroxylové radikály vo vodnej (2,2'-azobis-(2-amidinopropán) dihydrochlorid (AAPH) je hydrofilná zlúčenina), alebo lipofilnej časti plazmy (2,2'-azobis-2,4-dimetylvaleronitril (AMVN) a 2'-azobis-(4-metoxy-2,4-dimetylvaleronitril) (MeO - AMVN) sú lipofilné zlúčeniny).

Výber vhodného iniciátora voľných radikálov je dôležitý, pretože aktivity antioxidantov prítomných v oboch kompartmentoch plazmy závisia práve na mieste tvorby atakujúcich voľných radikálov. Pri použití hydrofilných iniciátorov nie je možné napríklad stanoviť antioxidačnú aktivitu karotenoidov, ktoré sú vnorené do lipofilného jadra lipoproteínov.

Z **hydrofilných testov** je možné využiť dva hlavné prístupy pri stanovení antioxidačnej aktivity plazmy, založené na rozdielnom reakčnom mechanizme. V prvom prípade je možné zhodnotiť antioxidačnú kapacitu plazmy s použitím hydrofilného iniciátora, ktorý má prooxidačné vlastnosti. V týchto testoch sa hodnotí náchylnosť plazmy podliehať oxidácii, pričom sa hodnotí oxidácia exogénne prídavaného substrátu. Podstata testu spočíva v inhibícii oxidácie exogénneho substrátu antioxidantmi plazmy, teda čím je vyššia jej antioxidačná kapacita, tým účinnejšie bude brániť oxidácii exogénneho substrátu. Na tomto princípe sú založené **testy TRAP** (total radical trapping antioxidant parameter) a **ORAC** (oxygen radical absorbing capacity), v súčasnosti najrozšírejšie testy na stanovenie antioxidačnej aktivity biologických vzoriek. Do tejto kategórie testov patrí aj menej využívaný **CBA test** (crocin bleaching, označovaný aj ako β -carotene bleaching). Vo všetkých týchto metódach sa používa hydrofilný induktor voľných radikálov (AAPH) a antioxidačná aktivita sa hodnotí na základe oxidácie 2,7-dichlorodihydrofluoresceín diacetátu (TRAP), β -fykoerytrínu (ORAC), alebo karoténu (CBA). 2,7-dichlorodihydrofluoresceín diacetát a β -fykoerytrín sú nefluoreskujúce zlúčeniny, ktoré po interakcii s voľnými radikálmi (predovšetkým peroxylovým a hydroxylovým) tvoria fluoreskujúci produkt. Nevýhodou β -fykoerytrínu je fotoblednutie, preto sa v ORAC teste pôvodne používaný β -fykoerytrín nahradil syntetickým fluoresceínom. V CBA teste sa používajú β -karotén, alebo krocín

(karotenoid izolovaný zo šafránu), ktorých molekuly obsahujú polyénový uhlíkový reťazec. Pri reakcii s voľnými radikálmi dochádza k nasýteniu násobných väzieb a strate konjugácie, čo má za následok "blednutie" substrátu, monitorované spektrofotometricky pri 445 nm (krocín) a 470 nm (β -karotén). Výhodou CBA testu je, že ním možno merať aj lipofilné antioxidanty. Navyše touto metódou možno stanoviť antioxidantnú, ale aj prooxidantnú aktivitu plazmy. Naopak, nevýhodou CBA testu je blednutie β -karoténu (spontánne alebo zmenou vonkajších podmienok), čo môže ovplyvniť výsledky merania. Do tejto skupiny testov sa zaraďuje aj modifikovaný ORAC – **HORAC test** (hydroxyl radical antioxidant capacity), ktorý využíva peroxid vodíka na generovanie hydroxylových radikálov reagujúcich následne s fluoresceínom. HORAC test teda umožňuje špecificky stanoviť antioxidantnú kapacitu voči hydroxylovým radikálom.

Antioxidantná kapacita plazmy pri vyššie popísaných testoch môže byť vyjadrená rôznym spôsobom, napríklad definovaním „lag fázy“ alebo metódou AUC (obsah plochy pod krivkou), prípadne aj kineticky.

Iným prístupom ako stanoviť antioxidantnú kapacitu hydrofilnej zložky plazmy je meranie vychytávania (zhášania) stabilných radikálov, ktoré nemajú prooxidantné vlastnosti. Medzi tieto metódy sa zaraďuje veľmi známy **TEAC test** (Trolox equivalent antioxidant capacity), zavedený do praxe začiatkom 90-tych rokov 20. storočia. V tomto teste sa stanovuje antioxidantná kapacita plazmy meraním jej schopnosti redukovať radikálový kation 2,2'-azinobis(3-etylbenzotiazolín-6-sulfonát) (ABTS). Zhášacia schopnosť plazmy sa sleduje spektrofotometricky, poklesom absorbancie pri 734 nm, čo je absorpčné maximum radikálového kationu ABTS. Výhodou tohto testu je, že ABTS je stabilný v širokom rozmedzí pH hodnôt, preto je vhodný pre rozličné biologické vzorky. ABTS je tiež rozpustný vo vodných, aj organických rozpúšťadlách, preto môže byť použitý aj na meranie TAC lipofilnej zložky plazmy, ako je popísané nižšie. Navyše, pretože ABTS radikál má nízky redoxný potenciál je vhodný aj na stanovenie antioxidantnej aktivity fenolov, ktoré sa tiež vyznačujú pomerne nízkymi hodnotami redoxného potenciálu. Limitujúcim faktorom TEAC testu je vysoká závislosť výsledkov od inkubačného času, ako aj od pomeru vzorky a ABTS.

Do rovnakej skupiny stanovení ako TEAC patrí aj **FRAP test** (ferric reducing ability of plasma), v ktorom sa sleduje redukcia železitých iónov na železnaté. Reakcia prebieha pri kyslom pH, čo umožňuje sledovať tvorbu zafarbeného produktu – 2,4,6-tripyridyltriazín (TPTZ) železnatého komplexu, pri jeho absorpčnom maxime 593 nm. Výhodou FRAP testu je jeho rýchlosť a jednoduchosť, preto je veľmi rozšírený. Je však založený na predpoklade, že redoxná reakcia prebieha rýchlo, v časovom horizonte štyroch minút. Táto podmienka nie je splnená napríklad pri meraní antioxidantnej aktivity niektorých fenolov, ktoré reagujú pomalšie. Limitujúcim faktorom FRAP testu je, že vzorky s redoxným potenciálom nižším ako 0,7 V môžu redukovať ióny železa. FRAP testom tiež nie je možné merať antioxidantnú aktivitu proteínov a tiolových antioxidantov.

DPPH test (1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl) bol prvýkrát popísaný už v roku 1958 a neskôr veľakrát modifikovaný. Dodnes patrí k najrozšírenejším testom hodnotiacim TAC v plazme. DPPH je stabilný radikál, ktorý je redukovaný antioxidantmi plazmy. Pri tejto reakcii stráca svoje fialové zafarbenie, čo je možné sledovať spektrofotometricky pri jeho absorpčnom maxime 515 nm. Keďže DPPH je stabilný radikál, jeho reaktivita v porovnaní s rýchlo reagujúcimi radikálmi, ktoré sa bežne vyskytujú v organizme, napríklad peroxylovými, je nízka, a teda aj reakcie antioxidantov s DPPH môžu byť pomalšie, čo je jeden z limitujúcich faktorov tohto testu. Podobne obmedzujúci pre niektoré stanovenia môže byť aj absorpčné maximum DPPH, ktoré sa prekrýva s absorpčným maximom niektorých antioxidantov (karotenoidov). Zo sterického hľadiska je radikálové miesto priestorovo objemného DPPH kationu lepšie prístupné pre malé molekuly, akou je kyselina askorbová, čo môže tiež ovplyvniť výsledky meranej TAC.

Vyššie uvedené testy zväčša vyjadrujú antioxidantnú aktivitu biologickej vzorky porovnávaním so štandardom – Troloxom. Trolox je obchodný názov firmy Hoffman-LaRoche pre 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylchróman-2-karboxylovú kyselinu, vo vode rozpustný analóg vitamínu E. Antioxidantná účinnosť biologických vzoriek sa potom vyjadruje v jednotkách ekvivalencie Troloxu.

Pretože aktivita antioxidantov plazmy je závislá na lipofilite kompartmentu, v ktorom sa voľné radikály tvoria, v ostatných dvoch desaťročiach sa pozornosť vedeckej komunity upriamila na štúdie, ktoré využívajú ako zdroje radikálov v tukoch rozpustné zlúčeniny. Hydrofilné testy TAC totiž vôbec nezahŕňajú aktivitu karotenoidov a len minimálne zohľadňujú aktivitu vitamínu E, čo je dané miestom výskytu týchto antioxidantov v plazme. Vitamín E, ktorý má svoju chromofórovú skupinu orientovanú smerom do vnútra lipoproteínovej membrány môže čiastočne prispievať k antioxidantnej obrane interakciou s vo vode solubilnými antioxidantmi. Preto celková antioxidantná kapacita plazmy meraná hydrofilnými testami zahŕňa asi 7-9% antioxidantnej aktivity vitamínu E. V prípade karotenoidov, ktoré sú hlboko vnorené do lipidového jadra lipoproteínov je však zrejmé, že ich antioxidantná aktivita nie je stanoviteľná za experimentálnych podmienok, ktoré využívajú hydrofilné testy.

Massaeli vo svojej práci dokázal, že preinkubácia LDL častíc s antioxidantmi rozpustnými v tukoch zabraňuje ich oxidácii v prítomnosti voľných radikálov, kým vo vode rozpustné antioxidanty tento efekt nemali. V snahe preskúmať biologický význam lipofilných antioxidantov sa mnohé štúdie zaoberajú práve lipofilnou zložkou plazmy, čo si vyžiadalo aj vyvinutie účinných metód pre stanovenie antioxidantnej aktivity tejto časti plazmy.

Jednou z týchto metód je **modifikovaný TEAC test**, kde sa ako generátor voľných radikálov môže použiť ABTS kation vo vhodnom rozpúšťadle, tak, že iniciuje tvorbu voľných radikálov v oboch kompartmentoch plazmy. Podobne bol tiež **modifikovaný ORAC test**, kde bola rozpustnosť AAPH v lipofilnej časti plazmy docielená metylovaným β -cyklodextrínom (RMCD), sledujúc oxidáciu fluoresceínu.

Samozrejme, po tom, ako bolo potvrdené, že je dôležité stanovovať aktivitu antioxidantov v oboch kompartmentoch plazmy súčasne, boli vyvíjané snahy nájsť vhodný systém generátorov a substrátov, pomocou ktorých by sa dala stanoviť antioxidantná aktivita oboch jej zložiek v jednom teste. Takýto test bol vyvinutý kombináciou TRAP testu na stanovenie hydrofilnej antioxidantnej aktivity plazmy s MeO-AMVN, generátorom voľných radikálov v lipofilnom kompartmente plazmy. Kyselina 4,4-difluoro-5-(4-fenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacén-3-undekánová (BODIPY581/591) bola použitá ako selektívny oxidovateľný lipofilný substrát. Uvedený generátor voľných radikálov, ako aj substrát na meranie oxidácie v lipofilnej zložke plazmy priniesli pokrok v lipofilných metódach stanovenia TAC v plazme. MeO-AMNV je oveľa lepším generátorom voľných radikálov v porovnaní s AMNV, pretože má vyššiu rýchlostnú konštantu, teda dokáže oveľa rýchlejšie generovať voľné radikály v porovnaní s AMNV. Použitie substrátu BODIPY581/591 je tiež výhodné v porovnaní s fluoresceínom a DPHPC (difytanoyl-fosfatidylcholín), nakoľko táto zlúčenina nepenetruje do bunkových membrán, ale inkorporuje sa selektívne do lipoproteínových frakcií. Ďalším prínosom tohto testu je, že si vyžaduje oveľa nižšie riedenie plazmy (5-10x zriedenie) v porovnaní s predchádzajúcimi popísanými metodikami (FRAP, ORAC, TRAP), v ktorých je nutné riediť vzorku 100-250x v závislosti od testu. Práve takéto vysoké riedenia plazmy vedú k nízkym koncentráciám antioxidantov v zriedenej vzorke, ktoré môžu byť nižšie ako je potrebný detekčný limit.

Okrem rozdelenia vyššie uvedených metód na hydrofilné/lipofilné testy sa často v literatúre môžeme stretnúť s rozdelením testov na základe reakčného mechanizmu, ktorý je využívaný na stanovenie aktivity OS. Z tohto pohľadu sa testy delia na testy založené na prenose vodíka - **HAT testy** (hydrogen transfer reactions) a testy založené na jedoelektrónovom prenose - **SET testy** (single electron transport), prípadne môže ísť o kombináciu týchto reakčných mechanizmov. Kým HAT testy využívajú 2 zložky – generátor voľných radikálov (oxidant) a oxidovateľný substrát, v SET testoch prebieha len jedna redoxná reakcia, a to medzi oxidantom (ktorý je zároveň aj meraným substrátom) a antioxidantom plazmy.

Vo všeobecnosti je možné zhrnúť, že celková antioxidantná kapacita plazmy závisí od typu voľného radikálu, ktorý vyvoláva oxidačný stres, množstva a typu prítomných antioxidantov v plazme, ako aj synergistických účinkov medzi jednotlivými antioxidantmi. Všetky tieto atribúty je nutné zohľadniť pri vyhodnocovaní TAC v plazme. Množstvo štúdií, ktoré hodnotia vplyv chorôb, ale aj pozitívny účinok externe podávaných antioxidantov na TAC plazmy je realizovaných v *in vitro* modeloch (nie v plazme), ako sú membránové systémy (lipozómy, micely), tlmivé roztoky, izolované LDL častice, bunkové

kultúry, či izolované tkanivové preparáty. Diskutabilné výsledky týchto štúdií poukazujú na fakt, že tieto umelé systémy nedokážu nahradiť reálny biologický systém akým je plazma/sérum, predovšetkým v zmysle heterogenity prostredia (lipofilná a hydrofilná zložka s vysokým obsahom proteínov), ktoré má zásadný vplyv na antioxidačné kapacity. Tiež je nutné zobrať do úvahy početné interakcie medzi jednotlivými antioxidantmi v rámci lipofilnej a hydrofilnej zložky, respektíve na ich rozhraní, ako je napríklad interakcia medzi kyselinou askorbovou a vitamínom E, či karotenoidmi.

4.2 STANOVENIE AKTIVITY ANTIOXIDAČNÝCH ENZÝMOV

Medzi rutinné laboratórne vyšetrenia oxidačného poškodenia patria aj metódy stanovenia antioxidačných enzýmov, ktorých zvýšené aktivity vypovedajú o náraste oxidačného zaťaženia.

Existuje mnoho metodík na **stanovenie aktivity superoxid dismutázy (SOD)**, preto je často zložité porovnávať výsledky medzi jednotlivými štúdiami. Všeobecne sú testy SOD aktivity založené na sledovaní schopnosti použitej vzorky inhibovať na 50% reakciu superoxidového radikálu (ktorý možno generovať viacerými spôsobmi) s detekčnou molekulou. Najčastejšie sa ako systém na tvorbu superoxidového radikálu využíva xantín/xantínoxidáza a ako detekčná molekula cytochróm c, ktorý podstupuje pri reakcii s $O_2^{\cdot-}$ redukciu. Ďalšími generátormi $O_2^{\cdot-}$ môžu byť aj Mn-EDTA/merkaptóetanol a kyslík, ožarované flavíny a kyslík, KO_2 a autooxidačný systém adrenalín/pyrogalol. Ako detektory aktivity SOD sa okrem cytochrómu c používajú aj luminol, luciferín (pri reakcii s $O_2^{\cdot-}$ emitujú žiarenie), nitrotetrazoliová modrá (NTB), adrenalín a hydroxylamín. Nevýhodou týchto stanovení je, že SOD aktivita sa meria nepriamo a nie je vylúčené, že na inhibícii superoxidu sa podieľajú aj iné látky. Pri použití cytochrómu c ako detekčného činidla tiež hrozí, že jeho redukovaná forma je oxidovaná cytochróm oxidázami, a teda výsledky testu sú skreslené. Rovnaký oxidačný efekt na cytochróm c má aj peroxid vodíka generovaný xantínoxidázou. Na zabránenie oxidácie je možné k testovaným vzorkám pridať katalázu (CAT), alebo acetylovať cytochróm c.

Okrem týchto metód je možné SOD aktivitu stanoviť aj pomocou nedenaturujúcej elektroforézy v prítomnosti riboflavínu a NTB. SOD inhibuje redukciu NTB, senzitizedovanú riboflavínom, pričom na géli vzniká modrý formazán, okrem oblastí, v ktorých sa nachádzajú pásiky so SOD aktivitou. Pri rozlíšení aktivít Mn-SOD a CuZn-SOD sa väčšinou inhibuje CuZn-SOD kyanidom, alebo peroxidom vodíka. Jednoduchšie je rozlíšenie jednotlivých typov SOD pri stanovení koncentrácie ich proteínov. Keďže sa jedná o štruktúrne odlišné enzýmy, protilátky, ktoré sa využívajú na western blot, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) stanovenia a v imunohistochemii nepodliehajú skríženej reaktivite, teda tieto enzýmy možno jednoznačne identifikovať.

Najrozšírenejším **testom katalázovej aktivity** je spektrofotometrické stanovenie rozkladu H_2O_2 pri 240 nm, alternatívne sa v rovnakej reakcii sleduje aj vznik produktu - kyslíka.

Glutatiónpoxidázová aktivita (GPx) sa stanovuje zvyčajne v reakcii sledujúcej oxidáciu NADPH s využitím glutatión reduktázy, glutatiónu a H_2O_2 . Toto stanovenie poskytuje aktivitu selén-dependentnej glutatiónpoxidázy. Celková aktivita GPx (selén dependentnej aj independentnej) je meralná v prítomnosti kumén hydroperoxidu, ktorý však zároveň zahŕňa aj podiel peroxidázovej aktivity glutatión-S-trenferáz. Stanovenie glutatión-S-tranferázovej aktivity spočíva v reakcii medzi GSH a 1-chloro-2,4-dinitrobenzénom, pričom vzniká S-(2,4-dinitrofenyl)-glutatión, kvantifikovaný spektrofotometricky pri 340 nm.

Niekoľkými metódami je možné stanoviť aj glutatión v jeho oxidovanej a redukovanej forme (GSSG a GSH). Okrem HPLC metodík s fluorimetrickou a elektrochemickou detekciou sú k dispozícii aj jednoduché laboratórne kity s fluorimetrickým/spektrofotometrickým vyhodnotením. Najčastejšie sa využíva reakcia GSH s 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoovou)kyselinou (DTNB) v prítomnosti NAPH a glutatiónreduktázy. Pri tomto stanovení sa kvantifikuje množstvo oxidovaného aj redukovaného glutatiónu, pretože GSSG je redukovaný glutatiónreduktázou na GSH. Podiel GSSG sa stanovuje v paralelnej reakcii po derivatizácii GSH s 2-vinylpyridínom, ktorý s ním tvorí stabilný komplex a nezú-

častňuje sa tak reakcie s DTNB. Výsledok testu sa udáva ako pomer GSH/GSSG, ktorý s oxidačným stresom klesá.

4.3 MARKERY OXIDAČNÉHO POŠKODENIA BIOMAKROMOLEKÚL

Pri diagnostike, resp. terapii rôznych ochorení, ktoré si vyžadujú stanoviť mieru oxidačného poškodenia je dôležité vybrať správne biomolekuly ako vhodné markery. To, či je vhodné sledovať oxidačné poškodenia lipidov, proteínov, alebo nukleových kyselín závisí predovšetkým od typov voľných radikálov, ktoré sú pri danom ochorení generované.

Napríklad, HClO, ktorá vzniká aktivitou myeloperoxidázy indukuje vznik karbonylových skupín a poškodenie proteínov, no nespôsobuje poškodenie DNA a lipidov. Iné ROS však majú naopak vyšší podiel na oxidácii lipidov, či DNA, a preto v týchto prípadoch je vhodné zvoliť si ako marker oxidačného poškodenia uvedené biomolekuly.

4.3.1 MARKERY PEROXIDÁCIE LIPIDOV

Zhodnotenie peroxidácie lipidov si vyžaduje diagnostiku mnohých, predovšetkým civilizačných ochorení, pri ktorých sa oxidácia lipidov priamo podieľa na ich patogenéze (ateroskleróza, kardiovaskulárne ochorenia,...). Stanovenia peroxidovaných lipidov v potravinárskom priemysle (predovšetkým dôležité pri konzervovaných potravinách) sú založené na rovnakých princípoch ako testy, ktoré sa využívajú v medicíne. Preto je o túto oblasť analytiky vysoký záujem a v ostatných desaťročiach bolo vyvinutých mnoho nových metód. Niektoré z nich sa v súčasnosti už nepoužívajú, nakoľko ich nahradili oveľa presnejšie a technicky menej náročné metódy.

Keďže peroxidácia lipidov je reťazová reakcia, pri ktorej vzniká množstvo intermediátov a koncových produktov, aj prístupy stanovenia oxidácie mastných kyselín sú zamerané na kvantifikáciu úbytku neoxidovaných lipidov, intermediátov peroxidácie lipidov alebo koncových produktov reakcie.

Z lipidov sú pri OS hlavným cieľom voľných radikálov nenasýtené mastné kyseliny (voľné aj esterifikované), preto jeden spôsob ako stanoviť ich mieru oxidácie, je stanoviť úbytok neoxidovaných mastných kyselín. Princíp spočíva v rozklade lipidov vo vzorke a izolácii mastných kyselín z ich esterov do vhodného rozpúšťadla. Voľné mastné kyseliny sa potom stanovia najčastejšie pomocou vysokotlakovej kvapalinovej chromatografie (HPLC), alebo sú cielene degradované na prchavé uhľovodíky a stanovené plynovou chromatografiou (GC).

Konjugované diény mastných kyselín, ktoré vznikajú v skorých štádiách peroxidácie lipidov je možné stanoviť spektrofotometricky pri 230-235 nm, kde vykazujú polyény svoje absorpčné maximum. Výhodou tejto metódy je jej technická nenáročnosť. Pre biologické vzorky, ktoré sú heterogénnej povahy však nie je táto metóda vhodná, pretože pri danej vlnovej dĺžke absorbujú aj mnohé iné zlúčeniny. Spektrofotometricky teda možno stanoviť konjugované diény len v izolovaných lipidoch. Ďalšou nevýhodou tejto metódy je fakt, že pri separácii konjugovaných diénov z biologického materiálu sa ukázalo, že veľké percento z nich tvorí kyselina oktadeka-9,11-diénová, derivát kyseliny linolénovej, ktorý nie je produktom oxidačného poškodenia. Falošné výsledky spektrofotometrického stanovenia konjugovaných diénov možno korigovať dodatočnou identifikáciou diénov vo vzorke inými metódami (HPLC). Napriek tomu, že uvedený derivát linolénovej kyseliny, ktorý je spolu so svojimi izomérmi označovaný ako CLA (conjugated linoleic acid) nepochádza z peroxidácie lipidov, bolo dokázané, že podávanie CLA u ľudí vyvoláva peroxidáciu lipidov. Benefit užívania CLA vo forme výživových doplnkov na podporu redukcie telesnej hmotnosti je teda diskutabilný.

Rozkladom hydrolipoperoxidov vznikajú ako koncové produkty oxidácie mastných kyselín aldehydy a ketóny. Ich koncentrácia *in vivo* je pomerne nízka, pretože ide o nestabilné látky, ktoré sa viažu na

proteíny a DNA. Komplexy aldehydov s proteínmi sú imunogénne, preto sa dajú stanoviť na základe zvýšeného titeru protilátok proti týmto komplexom. Aldehydy, ktoré sa viažu na DNA tvoria adukčné produkty, najmä s ich guanínovými bázami. Tieto komplexy majú fluorescenčné vlastnosti s emisiou pri 420-460 nm. Miera ich fluorescencie je priamo úmerná poškodeniu DNA, ktoré aldehydy spôsobujú. Špecifickejšie je možné stanoviť adukty aldehydov s DNA plynovou chromatografiou spojenou s detekciou hmotnostného spektra. Výsledky štúdií, v ktorých bola využitá táto metodika ukázali, že zdravá pečňová bunka obsahuje až 5400 MDA-deoxyguanozínových komplexov, u ľudí s OS sa ich počet samozrejme zvyšuje.

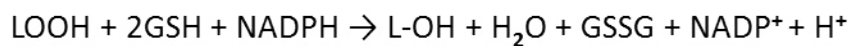
K najstarším, ale stále využívaným metódam stanovenia oxidácie lipidov patrí aj neinvazívne stanovenie prchavých uhľovodíkov vo vydychovanom vzduchu. Alkány, ktoré sa takto stanovujú sú etán (vzniká z omega-3 mastných kyselín) a pentán (pochádza z omega-6 mastných kyselín). Princíp metódy spočíva v tom, že vydychovaný vzduch prechádza vrstvou adsorbentu, kde dochádza k zachytávaniu alkánov, ktoré sú následne izolované a stanovené pomocou GC. Nevýhodou tejto metódy je, že množstvo prchavých alkánov v organizme závisí od prítomnosti iónov ťažkých kovov a koncentrácie kyslíka, oba tieto parametre preto ovplyvňujú výsledky testu. Navyše, je nutné pripomenúť, že alkány sú len minoritným produktom degradácie lipidov a môžu byť metabolizované v pečeni, teda ich stanovenie vo vydychovanom vzduchu nie je reprezentatívnym dôkazom oxidácie lipidov v organizme. Výsledky tohto testu môžu byť ďalej ovplyvnené aj kontamináciou uhľovodíkov produkovaných baktériami, ktoré osídľujú pokožku a ústnu dutinu. Pred testom je tiež dôležité vdychovaním čistého vzduchu odstrániť uhľovodíky, ktoré sú vdychované v znečistenom ovzduší (predovšetkým veľkých miest). Napriek uvedenej technickej náročnosti a nepresnosti tohto testu existuje aj dnes mnoho štúdií, ktoré týmto spôsobom hodnotia oxidáciu lipidov v organizme, pretože je to jeden z mála neinvazívnych testov.

Jednoznačne najznámejšia metóda stanovenia aldehydov je známa aj pod názvom **TBARS test**. Jeho princíp spočíva v reakcii medzi malondialdehydom (MDA) a tiobarbiturovou kyselinou v kyslom prostredí pri zvýšenej teplote, pričom sa tvorí ružový fluoreskujúci komplex MDA:TBA (1:2). Nevýhodou TBARS testu je, že nie je špecifický pre MDA, ale reagujú v ňom aj iné aldehydy, ktoré nemusia (ale môžu) pochádzať z peroxidácie lipidov (napr. HNE), takže test dáva falošnú pozitívnu reakciu na MDA. Ďalšou komplikáciou TBARS testu je, že MDA vzniká aj pri zahrievaní mastných kyselín pri kyslom pH, teda MDA sa generuje v testovaných vzorkách dodatočne počas vlastného stanovenia a jej výsledná nameraná hodnota je zvýšená. Preto je oveľa presnejšie ako TBARS test chromatografické stanovenie MDA pomocou HPLC. Ale aj v tomto prípade je stále možné namietat, že ani využitie HPLC na analýzu MDA neodzrkadľuje presný stav oxidácie lipidov v organizme. Dôvodom je fakt, že MDA predstavuje opäť len minoritnú cestu rozkladu oxidovaných lipidov a navyše nie je stabilným produktom – dehydrogenázy redukujú MDA na príslušný alkohol. Napriek tomu, že TBARS metóda má svoje nevýhody pri hodnotení peroxidácie lipidov, je dodnes často používaná, nakoľko ide o jednoduchý a finančne nenáročný test, ktorý poskytuje preliminárne výsledky o oxidačnom stave lipidov v biologických vzorkách.

Mnohí autori považujú za najobjektívnejšiu metódu hodnotenia oxidačného poškodenia lipidov kvantifikáciu ich konečných produktov – izoprostánov (1.2.1 Peroxidácia lipidov). Izoprostány vznikajúce oxidáciou arachidónovej kyseliny je možné stanoviť chromatograficky (HLPC-MS, GC-MS), alebo imunochemicky (metodiky: western blot, ELISA). U ľudí sa izoprostány stanovujú v plazme, kde je nutné po odobratí vzorky zabrániť dodatočnej oxidácii lipidov jej správnym skladovaním (pri -70°C, alebo pridaním antioxidantu BHT – butylovaný hydroxytoluén). Tento problém sa nevyskytuje pri stanovení izoprostánov v moči, kde nedochádza k ďalšej oxidácii lipidov, preto je moč vhodnejším biologickým materiálom. Bolo zistené, že v moči ovplyvňuje (zvyšuje) hladiny nameraných izoprostánov hladovanie, čo môže byť spôsobené zvýšeným oxidačným stresom, alebo zvýšeným uvoľňovaním izoprostánov z rozkladajúcich sa tukov do moču. Stanovenie izoprostánov v moči kvantifikuje samozrejme ich celkové množstvo v organizme, pričom nie je zjavné, v ktorom orgáne sa tvoria. Špecifickejšie výsledky v tomto smere poskytujú stanovenia izoprostánov v cerebrospinálnom moku, synoviálnej tekutine, pľúcnom výpotku, žlči, perikardiálnom moku, prípadne aj vo vydychovanom

vzduchu. Izoprostány sa nachádzajú v tkanivách v esterifikovanej forme, z ktorej sa uvoľňujú a vo voľnej forme podliehajú rýchlej metabolizácii (najznámejší izoprostán - 15-F_{2t}-izoprostán je metabolizovaný na 2,3-dinor-5,6-dihydro-15-F_{2t}-izoprostán). Pre získanie čo najpresnejších výsledkov, by sa preto mali stanoviť aj metabolity izoprostánov, čo však nie je bežné pre klinickú laboratórnu prax. Hladiny izoprostánov v organizme navyše ovplyvňuje aj koncentrácia kyslíka v bunkách. Pri hyperoxii dochádza k oxidácii monocyklického endoperoxidu mastných kyselín za tvorby izofuránov (namiesto redukcie endoperoxidu, ktorá vedie k produkcii izoprostánov) a napriek oxidačnému stresu sa hladina izoprostánov nezvyšuje. Preto je pri hyperoxii vhodné stanoviť spolu s izoketalmi aj izofurány. Ďalšou cestou metabolizácie prekursoru izoprostánov je jeho izomerizácia na D2 a E2 izoketaly, ktoré vytvárajú adukčné produkty s aminoskupinami proteínov, čím ich poškodzujú. S tiolovými skupinami proteínov reagujú a poškodzujú ich aj dehydratované cyklopentanóny D2 a E2 izoketalov. Tieto adukčné produkty proteínov sa stanovujú imunochemickými metódami.

Okrem vyššie uvedených testov existuje mnoho ďalších ciest ako stanoviť oxidáciu lipidov. V sedemdesiatych a osemdesiatych rokoch 20. storočia sa hydroperoxydy stanovovali takmer výhradne pomocou jodometrie. Táto metóda je založená na reakcii jodidového aniónu s hydroperoxidom (LOOH), pri ktorej vzniká príslušný alkohol (L-OH) a jód. Jód sa nakoniec titruje tiosíranom sodným, ktorého spotreba sa s peroxidáciou kyselín zvyšuje. Pre heterogénne vzorky však nie je tento test vhodný, nakoľko mnoho iných zložiek okrem alkánov môže ľahko oxidovať jodid na jód. Iným testom na stanovenie hydroperoxidov je spektrofotometrická metóda, kde hydroperoxydy reagujú s GPx v prítomnosti NADPH, ktorého oxidácia sa meria pri 340 nm:



Nevýhodou tejto metódy je finančná náročnosť purifikovaného enzýmu GPx a tiež nutnosť izolovať LOOH z membrán pred ich vlastným stanovením purifikovanou fosfolipázou. Membránové LOOH sa preto prednostne stanovujú v oxidačnej reakcii železnatého komplexu s xylénovou oranžovou pri kyslom pH. Farebný komplex železitých iónov s xylénovou oranžovou sa stanovuje spektrofotometricky pri absorpčnom maxime 580 nm.

4.3.2 MARKERY OXIDAČNÉHO POŠKODENIA PROTEÍNOV

Počas oxidačného stresu sú proteíny priamo napádané voľnými radikálmi, alebo tvoria adukčné proteíny s koncovými produktmi oxidácie lipidov, prípadne podliehajú glykácii. Za štandardný test oxidačného poškodenia proteínov sa považuje karbonylový test, pri ktorom sa detegujú karbonylové skupiny proteínov. Stanovenie karbonylovaných proteínov má v porovnaní s peroxidovanými lipidmi výhodu v tom, že proteíny sú karbonylované už v skorých štádiách oxidačného stresu a sú odbúrané v časovom horizonte niekoľkých hodín až dní, v porovnaní s oxidovanými lipidmi, ktoré sú degradované v priebehu niekoľkých minút. Na druhej strane, proteíny sú napádané takmer všetkými druhmi voľných radikálov, čo neumožňuje zistiť "zdroj" oxidačného stresu.

Karbonylové skupiny vznikajú oxidáciou aminokyselín voľnými radikálmi (najčastejšie Lys, Arg, Pro, Thr), alebo môžu byť zabudované do proteínov sekundárne, reakciami medzi postrannými nukleofilnými reťazcami aminokyselín Cys, His a Lys s aldehydmi (koncovými produktmi peroxidácie lipidov) a karbonylovými derivátmi (ketoamíny, ketoaldehydy), ktoré sú produktmi oxidácie cukrov. Karbonylový test teda poskytuje informáciu o celkovom oxidačnom poškodení proteínov, ale na rozlíšenie primárneho a sekundárneho poškodenia proteínov je nutné použiť ďalšie testy, napríklad imunochemické stanovenie komplexov peroxidovaných lipidov s proteínmi. Výhoda väčšiny karbonylových testov spočíva v ich finančnej nenáročnosti a nízkych nárokoch na technické vybavenie.

Jedným zo zaužívaných spôsobov stanovenia karbonylovaných proteínov je ich reakcia s biotín hydrazidom. Proteíny sú následne izolované chromatograficky, naviazaním biotínu na kolónach, prípadne

môže byť vizualizované na géloch pomocou fluorescenčne označeného avidínu (bielkovina viažuca biotín).

Senzitívnym testom na stanovenie proteínových karbonylov je derivatizácia karbonylovej skupiny 2,4-dinitrofenylhydrazinom, za tvorby 2,4-dinitrofenylhydrazónu (DNP). Keďže DNP tvorí adičné produkty aj s nukleovými kyselinami, pred vlastným stanovením karbonylov proteínov musia byť nukleové kyseliny odstránené. Stabilný DNP produkt môže byť kvantifikovaný viacerými spôsobmi, najjednoduchšie spektrofotometricky, pri 370 nm. Limitujúcim faktorom je prítomnosť zlúčenín v biologických vzorkách, ktoré absorbujú žiarenie rovnakej vlnovej dĺžky. Spektrofotometrické stanovenie v spojitosti s HPLC frakcionáciou proteínov je vhodné pri stanovení špecifických, oxidačne poškodených proteínov v ich zmesiach (napríklad tkanivových homogenátoch, alebo bunkových extraktoch), no neumožňuje stanoviť viac proteínov s podobnou molekulovou hmotnosťou. Jeho výhoda oproti klasickému spektrofotometrickému stanoveniu spočíva vo vysokej senzitivite a nižšej spotrebe vzorky.

Na cielenú identifikáciu poškodených proteínov a ich aminokyselinových reziduí boli vyvinuté imunochémické testy ELISA so špecifickou anti-DNP protilátkou. Ich výhodou je vysoká citlivosť a nízka spotreba vzorky. Predovšetkým v experimentálnom výskume sa anti-DNP protilátky využívajú na stanovenie karbonylov proteínov vo western blot analýze, ktorá je v porovnaní s ELISA metódou síce finančne menej náročná, no kladie vyššie požiadavky na minimálny detekčný limit proteínov.

Oxidáciu proteínov indukujú mnohé voľné radikály a potenciálne môžu byť v proteínoch oxidované postranné reťazce každej z aminokyselín. Na stanovenie tohto širokého spektra oxidačne poškodených aminokyselín však neexistuje univerzálny marker. Niektoré oxidačné reakcie sú vysoko špecifické pre danú aminokyselinu a vznik produktu, kým iné vedú k oxidácii rôznych aminokyselín, za vzniku mnohých typov produktov. Výhodou stanovenia špecifického poškodenia aminokyselín je identifikácia voľného radikálu, ktorý je súčasťou študovaného procesu oxidačného stresu. Príkladom špecifického poškodenia proteínov je oxidácia aminokyselín kyselinou chlórnu a vznik chlorotyrozylových reziduí a aduktov na lyzíne, ktoré sú typické pre aterosklerotické lézie. Prítomnosť kyseliny chlórnej zase poukazuje na úlohu neutrofilov a monocytov pri tomto type oxidačného stresu. Podobne, prítomnosť 3-nitrotyrozínu (3-NT) v proteínoch je špecifickým markerom oxidačného poškodenia, zapríčineného peroxynitritom. Ďalším príkladom špecifického poškodenia aminokyselín je vznik dityrozínu z tyrozínu, alebo 3-chlórtyrozínu, vznikajúceho v prítomnosti HClO. Všeobecnou komplikáciou pri stanoveniach špecificky poškodených aminokyselinových reziduí je, že modifikované je len malé množstvo aminokyselín, a preto metódy ich stanovenia musia byť vysoko senzitívne. Napríklad jedna molekula dityrozínu, ktorý sa tvorí v aterosklerotických léziách aorty pripadá na 3 000 intaktných reziduí tyrozínu, čo si vyžaduje jeho stanovenie pomocou vysoko citlivej hmotnostnej spektrometrie. Pri nešpecifickej modifikácii je zasiahnuté vysoké percento aminokyselín, a teda metódy na ich stanovenie nie sú náročné na senzitivitu, prípadne množstvo vzorky.

4.3.3 MARKERY OXIDAČNÉHO POŠKODENIA DEOXYNUKLEOVEJ KYSELINY

Z výskumov vyplýva, že oxidačné poškodenie DNA je spojené s výskytom mnohých ochorení, s vysokým podielom pri nádorových ochoreniach. Oxidačne poškodená DNA je teda na prvom mieste predmetom záujmu výskumných vedeckých tímov, ktoré študujú vplyv faktorov ovplyvňujúcich poškodenie DNA pri oxidačnom strese v spojitosti s nádorovými ochoreniami.

Metódy stanovenia poškodenej DNA sa vzťahujú k mechanizmom, resp. výsledným produktom, ktoré vznikajú pri modifikácii nukleových kyselín. Najvhodnejší cieľ pre identifikáciu oxidačného poškodenia DNA sú modifikované bázy nukleotidov. Z tejto skupiny testov sa najčastejšie stanovuje prítomnosť 8-hydroxydeoxyguanozin (8OHdG), ktorého vznik indukuje široké spektrum voľných radikálov. Nakoľko na eliminácii 8OHdG sa v bunke podieľa súčasne niekoľko mechanizmov, je zrejmé, že ide o vysoko nebezpečný produkt oxidácie DNA, a teda jeho množstvo je v priamej úmere s negatív-

nými následkami oxidačného stresu. Pretože 8OHdG je len minoritným produktom pri poškodení DNA a navyše guanínové rezidua sú oxidované aj za vzniku iných produktov ako 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidín (FAPyG), nemožno posudzovať nárast OS na základe kvantifikácie 8OHdG. Pomer vzniku 8OHdG a FAPyG v bunkách závisí jednak od redoxného stavu a jednak od prítomnosti iónov ťažkých kovov. Teda oba tieto faktory zásadne ovplyvňujú výsledok stanovenia 8OHdG. V neposlednom rade treba zväžiť aj fakt, že 8OHdG, oxidovaný ešte väčšou rýchlosťou než guanín je veľmi nestabilným produktom oxidačného poškodenia DNA. Napriek tomu, že 8OHdG je možné stanoviť pomerne jednoduchou metodikou pomocou HPLC, z vyššie uvedených dôvodov je pre lepšie vyhodnotenia oxidačného poškodenia DNA vhodné stanoviť aj jeho oxidačné produkty, prípadne iné markery DNA oxidácie. Stanovenie viacerých špecifických markerov poškodenia DNA umožňuje podobne ako pri špecifickom poškodení proteínov, identifikovať typ voľných radikálov, ktoré sa na oxidačnom poškodení zúčastňujú (kapitola 1, 1.2.3 Oxidačné poškodenie nukleových kyselín). Vhodnou metódou na identifikáciu oxidačne modifikovaných báz je hmotnostná spektrometria, ktorá umožňuje stanoviť aj adičné produkty báz s proteínmi.

Ak je DNA izolovaná z buniek a poškodené bázy stanovené v takýchto vzorkách ide o stanovenie “steady-state damage”, teda získava sa prehľad o tom, či sa zvýšilo množstvo poškodenej DNA v bunkách, čo však môže vypovedať aj o zmene rýchlostí syntézy DNA, alebo spomalení jej reparačných mechanizmov. Izolácia DNA z moču a stanovenie jej poškodenia je presnejšia metóda, pokiaľ sa jedná o zistenie celkového oxidačného poškodenia “total oxidative DNA damage.” Močom sa vylučuje niekoľko poškodených báz, vrátane 8OHdG, 8OHG, tymínglykolu, 5-hydroxymetylylacilu, 8-hydroxyadenínu a 7-metyl-8-hydroxyguanínu. Kvantifikácia poškodených báz v moči je normalizovaná na kreatinín. Priemerné hodnoty 8OHdG u zdravých ľudí udávajú teda istý štandard medzi reparáciou a poškodením DNA, ktorý je často v štúdiách porovnávaný s hodnotami 8OHdG pri rôznych ochoreniach, prípadne sú na základe tohto štandardu hodnotené antioxidantné účinky zlúčenín, alebo vplyv životného štýlu na poškodenia DNA.

Základným problémom pri analýze oxidačného poškodenia DNA v bunkách je jej izolácia a príprava vzorky na stanovenie, počas ktorej je DNA hydrolyzovaná. Pri tomto procese je DNA vystavená vysokým koncentráciám kyslíka (v porovnaní s koncentráciou kyslíka v jadre) a účinku iónov prechodných kovov, teda podmienkam, ktoré podporujú jej oxidáciu. Pri GC-MS stanovení je nutné analyzovanú vzorku pri derivatizácii zahrievať, čo tiež spôsobuje oxidáciu DNA. Izolácia a príprava bunkovej DNA na analýzu je teda kritickým krokom a zároveň dôvodom, prečo sa namerané hodnoty 8OHdG medzi jednotlivými štúdiami líšia až o celý poriadok. Znížiť riziko oxidácie je možné pridávaním antioxidantov k izolovanej vzorke, prípadne chelatačných činidiel na vychytávanie iónov kovov, alebo izolovať DNA pod dusíkovou atmosférou. Izolácii DNA je možné sa celkom vyhnúť pri imunohistochemických metódach, s použitím protilátok proti 8OHdG, alebo iným oxidovaným bázam. Veľmi populárnou metódou na stanovenie zlomov vlákna DNA, ktorá tiež nevyžaduje izoláciu DNA je **kométový test** (comet assay). Pre potreby tohto testu je nutné pripraviť suspenziu jednotlivých buniek v agarózovom géli, ktorý sa nanáša na mikroskopické sklíčko. Bunky v géli sú následne lyzované a podrobené elektroforéze. Po elektroforéze sa sklíčka zafarbia fluorescenčnou farbičkou, ktorá viaže DNA. Princíp tejto metódy je založený na vzniku “chvostov” – frakcií zlomených vlákien DNA, ktoré vychádzajú z jadra lyzovaných buniek pri elektroforéze. V procese elektroforézy zlomy na DNA vlákne umožňujú jeho relaxáciu a rýchlejší pohyb smerom k anóde. Množstvo DNA v “chvoste” potom odzrkadľuje frekvenciu zlomov vo vláknach DNA. Alternatívne sa v kométovom teste dajú detegovať aj oxidované bázy. Na ich stanovenie sa sklíčka po lýze buniek inkubujú s FAPy-glykozyázou, endonukleázou III a inými DNA-reparačnými enzýmami. Endonukleáza III štiepi DNA na mieste oxidácie pyrimidínových báz, kým FAPy-glykozyáza v mieste 8OHdG a iných oxidovaných purínov. V DNA tak po pôsobení enzýmov vznikajú ďalšie zlomy a porovnanie chvostov medzi bunkami s a bez pridávaných enzýmov umožňuje zistenie prítomnosti oxidovaných báz. Najjednoduchšie vyhodnotenie kométového testu môže byť len empirické, kedy sa zhodnotí, či vznikli “chvosty” vychádzajúce z jadier buniek. Presnejšie je meranie vzdialenosti migrujúcej DNA od stredu bunkového jadra. Vyhodnotenie, ktoré sa označuje “tail moment” zohľadňuje nielen dĺžku “chvosta”, ale aj počet zlomov DNA,

reprezentovaný intenzitou zafarbenia DNA v "chvoste".

K ďalším metódam identifikácie/kvantifikácie zlomov v DNA patrí polymerázová reťazová reakcia, pri ktorej dochádza k zastaveniu amplifikácie DNA v miestach zlomu vlákna. Na géli sa potom nachádza namiesto jedného väčší počet pásov, zodpovedajúci priamo úmerne intenzite zlomov v DNA. V **HALO teste** (HALO assay) sa interkaluje fluorescenčné farbivo propídium jodid alebo etídium bromid do DNA helixu a vyvoláva tak zmeny v stave jej superšpiralizácie. Štruktúrne pozmenená DNA môže byť potom pozorovaná v tvare "svätožiare" (anglicky „halo“), ktorej priemer sa mení s počtom zlomov v DNA. Princíp **TUNEL testu** (deoxyribonucleotidyltransferase mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling) spočíva v detekcii fragmentácie DNA pomocou značenia jej voľných koncov modifikovanými bázami. Zlomy v DNA generujú voľné 3'-OH konce nukleotidov, ktoré sa enzymaticky označia modifikovaným nukleotidom (napr. fluorescenčne značeným). Modifikované nukleotidy sa nakoniec detegujú na základe fluorescencie, alebo pomocou protilátky. V **ARP teste** (aldehyde reactive probe) reaguje N'-aminooxymetylkarbonylhydrazino-D-biotín s aldehydovými skupinami oxidačne poškodenej DNA, ktoré vznikajú otvorením cyklov purínov a pyrimidínov (AP miesta). V reakcii sa na AP miesta viaže biotín, ktorý je ďalej kvantifikovaný spektrofotometricky.

4.4 STANOVENIE VOĽNÝCH RADIKÁLOV

Pre potreby experimentálneho výskumu boli vyvinuté mnohé metódy, ktoré umožňujú priame meranie voľných radikálov. Tieto metódy sa neuplatňujú pri bežných laboratórnych vyšetreniach, nakoľko sú technicky náročné, navyše stanovenie nestabilných voľných radikálov musí prebehnúť okamžite po odobratí biologického materiálu.

Spin trapping, metóda popísaná v úvode kapitoly, ktorá vychádza z ESR sa uplatňuje pri stanovení viacerých typov voľných radikálov po ich reakcii s inou molekulou, ktorá voľný radikál stabilizuje. Princíp ESR metódy je založený na existencii spinu (uhlového momentu) voľných elektrónov (spinové číslo elektrónu môže byť +1/2 alebo -1/2). V magnetickom poli sa preto elektróny orientujú paralelným, alebo antiparalelným smerom, v dvoch možných energetických hladinách. Po vystavení elektrónov elektromagnetickému žiareniu dochádza k jeho absorpcii a presunu elektrónu z nižšej na vyššiu energetickú hladinu. Takto sa môže zaznamenať charakteristický záznam absorpčného spektra daného voľného radikálu. Pri spin trapping metóde sa postupuje rovnako, s tým rozdielom, že sa deteguje spektrum v stabilnom komplexe (voľný radikál reaguje s molekulou, za vzniku stabilnejšieho voľného radikálu s delokalizovanými elektrónmi).

Molekuly, ktoré plnia v reakciách úlohu stabilizátora voľných radikálov by mali spĺňať isté požiadavky, aby ich použitie bolo čo najefektívnejšie. Predovšetkým by mali so zvoleným meraným voľným radikálom reagovať rýchlo a špecificky, za tvorby nemetabolizovateľných a dostatočne stabilných produktov. Ideálne stabilizátory by po reakcii s voľným radikálom mali poskytovať jednoznačne identifikovateľné absorpčné spektrá, bez prekryvu pík. V súčasnosti sa využíva na tento účel viacero zlúčenín, no ani jedna z nich nespĺňa kritéria ideálneho stabilizátora. Najznámejšie stabilizátory sú:

DMPO – 5,5-dimetylpyrolín-N-oxid

DEPMPO – 5-dietoxyfosforyl-5-metyl-1-pyrolín-N-oxid

PBN – alfa-fenyl-terc-butylnitrón

EMPO -5-etoxykarbonyl-5-etyl-1-pyrolín-N-oxid

Tieto zlúčeniny sa používajú v *in vivo* zvieracích experimentoch na stanovenie hydroxylových, či superoxidových radikálov. U ľudí sa vzhľadom na toxicitu *in vivo* nepoužívajú, je ich však možné aplikovať na stanovenie voľných radikálov v biologických vzorkách *ex vivo*. Limitujúcim faktorom pri *ex vivo* detekcii je miera reaktivity radikálov – napríklad hydroxylový radikál je príliš reaktívny, aby na jeho stanovenie mohla byť použitá táto metóda. Stabilnejšie radikály, alebo aj sekundárne produkty reakcií

voľných radikálov s biomolekulami je možné stanoviť aj *ex vivo*. Pri príprave biologických vzoriek je nutné vyhnúť sa použitiu organických rozpúšťadiel, ktoré ľahko podliehajú oxidácii voľnými radikálmi (napr. metanol).

Spin trapping sa používa často v experimentoch na overenie účinnosti antioxidantov voči voľným radikálom, predovšetkým hydroxylovým, superoxidovým a thiylovým. DMPO reaguje aj s radikálmi na proteínoch a DNA, po naviazaní vzniká adukčný produkt, ktorý sa deteguje špecifickými protilátkami. Ak je cieľom zistiť miesto, kde je DNA napadnutá radikálmi, vhodnými metódami sú hmotnostná spektrometria, alebo sekvenovanie DNA.

4.4.1 STANOVENIE KYSLÍKOVÝCH VOĽNÝCH RADIKÁLOV

Okrem „spin trapping“-u existujú aj iné metódy ako stanoviť *in vivo* vysoko reaktívny **hydroxylový radikál**. V experimentoch boli na tento účel použité tereftalová kyselina, ftalylhydrazid, kumarín-3-karboxylová kyselina a benzoová kyselina, reagujúce s OH• za vzniku fluorescenčného produktu. Iným prístupom je podávanie zlúčenín, ktoré sú hydroxylované prostredníctvom OH• (antipyрін, tryptofán, kofeín) na pozíciách netypických pre ich biotransformačné reakcie. Špecifické produkty sa potom kvantifikujú adekvátnymi analytickými metódami.

Na stanovenie **superoxidového radikálu** sa využívajú okrem spin trappingu rovnaké, alebo modifikované metodiky ako pri stanovení aktivity SOD (oxidácia cytochrómu c, NTB, adrenalínu), superoxidové elektródy, či akonitázový test ($O_2^{\cdot-}$ uvoľňuje ióny železa z $[4Fe-4S]^{2+}$ komplexu akonitázy, čím enzým stráca svoju aktivitu). Histochemicky bol $O_2^{\cdot-}$ stanovený v tkanivách perfúziou s tetrazoliovými zlúčeninami, kde sa sledovalo modré zafarbenie vyzrážaného formazánu.

Pri detekcii **peroxidu vodíka** sa často využíva fluorimetria. Schopnosť fluorescencie získavajú niektoré zlúčeniny (7-hydroxy-6-metoxykumarín, skopoletín, kyselina homovanilínová, Amplex red (N-acetyl-3,7-dihydroxyfenoxazín)) peroxidáciou sprostredkovanou H_2O_2 - dependentnou HSR (horseradish peroxidase). Množstvu H_2O_2 zodpovedá aj miera vzniku komplexov, ktoré tvorí s cytochróm c oxidázou, využívajúcou peroxid vodíka pri oxidačných reakciách. Existuje mnoho ďalších spôsobov kvantifikácie H_2O_2 založených na stanovení peroxidom oxidovaných exogénne podávaných zlúčenín. Tieto metódy však nie sú väčšinou špecifické pre H_2O_2 , pretože podávané zlúčeniny sú oxidované aj inými voľnými radikálmi. Superoxidové elektródy umožňujú po pridaní katalázy (rozkladá H_2O_2 na vodu a kyslík) tiež stanoviť nepriamo obsah H_2O_2 vo vzorke, kým elektróda na priamu detekciu H_2O_2 sa ukázala ako nedostatočne senzitívna. Princíp reakčného mechanizmu rozkladu H_2O_2 katalázou využívajú aj ďalšie prístupy stanovenia H_2O_2 v organizme. Príkladom je inhibícia katalázy aminotriazolom v prítomnosti H_2O_2 , kde sa hladiny H_2O_2 stanovia na základe množstva aminotriazolu potrebného na inhibíciu katalázy.

Detekcia **singletového kyslíka** na princípe fotosenzitizačných reakcií, ktorých sa zúčastňuje nie je vhodná, nakoľko pri nich vznikajú voľné radikály. Priamo je možné singletový kyslík detegovať identifikáciou jeho emisného spektra, ktoré pochádza z rozpadu jeho molekuly. Spektrum spadá do infračervenej oblasti (1 270 nm), kde je malá pravdepodobnosť interferencie so spektrami iných molekúl. Na overenie chemizmu 1O_2 , prípadne jeho účasti v reakčných procesoch sa používajú molekuly, ktoré majú úlohu vychytávačov singletového kyslíka. Po naviazaní 1O_2 na vychytávač sa predpokladá inhibícia reakcie, ak sa jej singletový kyslík predtým zúčastnil. Ako uvedené vychytávače 1O_2 sa používajú DABCO (difenylbenzofurán), histidín a azid. Nízka špecifita týchto látok v reakciách s 1O_2 a vysoká reaktivita s inými voľnými radikálmi však nezaručuje reprodukovateľné výsledky. Spoľahlivejšie sú vychytávače, ktoré reagujú s 1O_2 za vzniku fluorescenčného produktu (9,10-difenylantracén).

4.4.2 STANOVENIE VOĽNÝCH RADIKÁLOV DUSÍKA

Zo skupiny dusíkových radikálov sa veľká pozornosť venuje vývinu metodík, ktoré by dokázali spoľah-

livo stanoviť hladiny $\cdot\text{NO}$ *in vivo*. $\cdot\text{NO}$ je nestabilná molekula, ktorá sa ľahko oxiduje za vzniku mnohých sekundárnych produktov, čo je dôvod, prečo dodnes nebola vyvinutá ideálna metóda na jej stanovenie. Predovšetkým v experimentálnom výskume by detekcia $\cdot\text{NO}$ *in situ* pomohla lepšie vysvetliť ešte neobjasnené funkcie prislúchajúce tejto molekule. Doterajšie metódy sa zakladajú na reakciách $\cdot\text{NO}$ s farbivami, hémovými zlúčeninami, ozónom, alebo využívajú spin trapping. Na elektrochemické stanovenia sa používajú $\cdot\text{NO}$ elektródy. $\cdot\text{NO}$ sa viaže na Ni^{2+} -porfyrín adsorbovaný na anóde, kde je elektrochemicky oxidovaný. Nepriamo sa $\cdot\text{NO}$ stanovuje s použitím inhibítorov NOS, alebo po oxidácii na NO_2^- v Griessovej reakcii. V tomto stanovení NO_2^- reaguje so sulfanilamidom v kyslom prostredí N-(1-naftyl)-etyléndiamínu za vzniku zafarbeného azo produktu.

Na stanovenie veľmi agresívneho peroxynitritu sa využívajú nitroderiváty aromatických aminokyselín (tyrozín, tryptofán, fenylalanín). Veľká pozornosť sa venuje detekcii 3-nitrotyrozínu (3-NT), ktorého zvýšené hladiny sprevádzajú rôzne ochorenia (nádorové, nervové, zápalové, pľúcne, kardiovaskulárne, močového systému...). Tyrozín podlieha nitrácii peroxynitritom až po úvodnej oxidácii inými voľnými radikálmi, ktoré peroxynitrit generuje v prvej fáze. 3-NT sa môže stanoviť spektrofotometricky, alebo presnejšími analytickými metódami – GC-MS, HPLC, elektrochemicky, z ktorých MS deteguje aj miesto nitrácie sledovaného proteínu. Na imunochemické a imunohistochemické stanovenia sa používajú špecifické protilátky proti nitrovaným proteínom.

4.4.3 STANOVENIE HALOGÉNOVÝCH VOĽNÝCH RADIKÁLOV

Veľmi silným oxidačným a chloračným činidlom je kyselina chlórna, ktorá rozkladá 3-NT a pri jeho stanovení tak znižuje jeho skutočné koncentrácie. Preto boli vyvinuté viaceré metódy stanovenia HClO . V reakcii s taurínom dáva HClO chlóramin, ktorý v druhom kroku reaguje s žltou zafarbenou tionitrobenzoovou kyselinou za vzniku bezfarebného DTNB, stanoveného spektrofotometricky. Keďže HClO chlórjuje vo vysokej miere tyrozín, no podobne sa správa aj NO_2Cl a NO_3^- je vhodné súbežne stanoviť jeho chlór - aj nitroderiváty (HPLC alebo MS), ak je žiaduce identifikovať zdroj poškodenia tejto aminokyseliny.

4.5 LITERATÚRA

Aldini G, Yeum KJ, Niki E, Russell RM. Biomarkers for Antioxidant Defense and Oxidative Damage. Principles and practical application. Blackwell Publishing, USA, 2010; 4-9.

Aldini G, Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI. A method to measure the oxidizability of both the aqueous and lipid compartments of plasma. *Free Radic Biol Med* 2001; 31:1043-1050.

Dalle-Donnea I, Rossib R, Giustarinib D, Milzania A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, 2003; 329:23–38.

Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* 1995; 339:37-59.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Fourth Edition, Oxford University Press, Oxford, UK, 2007.

Hermes-Lima M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. 2004 John Wiley & Sons, Inc. 319-367.

Kumari S, Rastogi RP, Singh KL, Singh SP, Sinha RP. DNA damage: Detection strategies. *EXCLI Journal* 2008; 7:44-62.

Massaeli H, Sobrattee S, Pierce GN. The importance of lipid solubility in antioxidants and free radical generating systems for determining lipoprotein peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1999; 26:1524- 1530.

Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J.* 18,2004; 1791–1800.

Ndhlala AR, Moyo M, Van Staden J. Natural Antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules? *Molecules* 2010; 15:6905-6930.

Shulaev V, Oliver DJ. Metabolic and Proteomic Markers for Oxidative Stress. *New Tools for Reactive Oxygen Species Research. Plant Physiology*, June 2006; Vol. 141:367-372.

OXIDAČNÝ STRES A ŽIVOTNÝ ŠTÝL

V predchádzajúcich kapitolách bol popísaný vplyv voľných radikálov a oxidačného stresu (OS) na rôzne biomolekuly, ktorých poškodenie sa následne odzrkadľuje v pozmenených biochemických procesoch. Pri nedostatočnej antioxidačnej obrane nedokáže organizmus v potrebnej miere odolávať OS a vyvíja sa patologický stav. Veľká časť chorôb, u ktorých zohráva OS jednu z hlavných úloh sú choroby vyplývajúce z nezdravého životného štýlu, takzvané „lifestyle diseases“. Preto, okrem výskumu anti-oxidantov, ktorých príjem podporuje elimináciu voľných radikálov, existuje aj množstvo takých štúdií, ktoré skúmajú vplyv životného štýlu na vznik a rozvoj OS a s ním spojené patologické stavy. Táto kapitola podáva prehľad najnovších poznatkov o tom, ako možno prostredníctvom určitého životného štýlu ovplyvniť OS, a to nielen v negatívnom, ale aj v pozitívnom smere.

5.1 VPLYV POHYBOVEJ AKTIVITY NA OXIDAČNÝ STRES

Pri náročnejšej pohybovej aktivite dochádza k zvýšenej spotrebe kyslíka, čo vedie následne k zvýšenej tvorbe kyslíkových radikálov a posunu redoxného stavu v bunkách smerom k oxidácii. Na rozdiel od pozitívnych účinkov pohybovej aktivity, ktoré boli preukázané najmä vo vzťahu ku kardiovaskulárnemu systému (zníženie krvných lipidov, rizika hypertenzie, diabetu,...) nastáva preto otázka, či pohybová záťaž nie je naopak vo vzťahu k OS a chorobám, ktoré s ním súvisia kontraproduktívna. Navyše pravidelný pohyb by pre organizmus mohol znamenať opakovaný, teda chronický OS, ktorý presahuje kapacitu antioxidantov pre neutralizáciu kyslíkových radikálov, čo by znamenalo, že práve pravidelný pohyb, ktorého pozitívne účinky sú tak často zdôrazňované, je ešte škodlivejší než nárazová pohybová záťaž. Počet štúdií zaoberajúcich sa vplyvom cvičenia na OS vzrástol najmä v období, keď sa experimentálne potvrdila aj zvýšená peroxidácia lipidov počas aeróbného cvičenia. Dôraz na experimenty hodnotiace OS generovaný počas fyzickej záťaže kladie aj športový priemysel. V súčasnosti sa kladú vyššie nároky na výkon najmä u profesionálnych športovcov a ochrana ich zdravia si vyžaduje prínos nových poznatkov o vhodnej skladbe a dávkach antioxidantov pred, počas a po náročnej fyzickej záťaži. K tomu prispievajú nielen klinické štúdie s použitím doteraz známych antioxidantov, ale aj štúdium nových látok s antioxidačnými účinkami a mechanizmov, ktoré počas fyzickej záťaže vedú k posunu redoxného stavu buniek.

Mechanizmus zvýšenej tvorby ROS počas fyzickej aktivity sa vo všeobecnosti pripisuje vzostupu intenzity:

- mitochondriálnej respirácie (únik elektrónov pri elektrónovom transporte a vznik superoxidového radikálu)
- metabolizmu prostanoidov
- autooxidácie katecholamínov
- enzýmovej aktivity oxidáz (NADP(H) oxidáza, xantín oxidáza)

Okrem týchto základných metabolických dráh boli identifikované aj iné cesty vzniku reaktívnych foriem kyslíka (ROS), a to v závislosti od typu (aeróbna, anaeróbna), dĺžky a intenzity fyzickej aktivity, ako aj nárokov na spotrebu energie, ktorú je nutné vynaložiť. Nemalý podiel na vzniku radikálov má aj

výsledný mechanický stres, ktorý je pri fyzickej aktivite vyvíjaný na tkanivá. Pri deštrukcii tkanív tak dochádza medzi iným aj k narušeniu štruktúry proteínov nesúcich železo, ktoré je dobrým katalyzátorom pri tvorbe ROS. Dôležité je bezpochyby aj množstvo spotrebovaného kyslíka.

Prvé experimenty, ktoré vo vedeckých kruhoch otvorili diskusiu o vplyve fyzickej aktivity na OS, boli skôr zamerané na výskum negatívnych následkov. Novšie štúdie však poukazujú skôr na pozitívne následky produkcie ROS ako na jednu z ich alternatívnych funkcií, ktorou sa organizmus adaptuje na fyzickú záťaž. Samozrejme takýto výskum umožnili aj nové, modernejšie metódy testovania voľných radikálov a OS.

Všetky výskumy sa zhodujú vo fakte, že pri zvýšenej fyzickej aktivite dochádza k zvýšenej tvorbe voľných radikálov, ktoré majú potenciál poškodzovať biomakromolekuly. Do akej miery sa takáto oxidácia prejaví aj v klinickej forme a či vôbec vyústi do patologického stavu je diskutabilné a v súčasnosti neexistujú štúdie, ktoré by potvrdili priamy vzťah medzi OS generovaným počas cvičenia a konkrétnym ochorením. Existujú však dôkazy o adaptácii antioxidantnej výbavy organizmu na opakovaný OS počas cvičenia. Tieto mechanizmy sú spojené nielen s dlhodobou zvýšenou syntézou antioxidantov, ale aj s posunom redoxnej rovnováhy za pokojového stavu v prospech redukcie, aby sa organizmus počas cvičenia nedostával do stavu extrémnej oxidácie. Takáto adaptácia prebieha za predpokladu, že OS počas fyzickej záťaže je dostatočne veľký na to, aby spôsobil poškodenie špecifických biomakromolekúl a vyvolal antioxidantnú reakciu. Preto pri krátkej fyzickej záťaži s nízkou intenzitou nedochádza k popísanej adaptácii a neúmerne zvýšenie intenzity, alebo predĺženie fyzickej aktivity môže v konečnom dôsledku spôsobiť poškodenie tkanív.

5.1.1 AERÓBNA FYZICKÁ AKTIVITA A OXIDAČNÝ STRES

Výskumy rôznej dĺžky a intenzity fyzickej aktivity u zvierat aj ľudí potvrdili, že pri aeróbnom cvičení dochádza k tvorbe voľných radikálov a zvýšenej oxidácii lipidov, proteínov a nukleových kyselín, ako aj glutatiónu, predovšetkým pri akútnej fyzickej záťaži. Zvýšený príjem antioxidantov dokáže do istej miery predísť oxidačnému poškodeniu, a to najmä pri krátkodobej fyzickej aktivite, kým pri dlhodobej záťaži je ich ochrana sporná. Z publikovaných štúdií je zrejme, že najčastejšie sa aplikuje vitamín C, E a β -karotén, ale aj koenzým Q10, N-acetylcysteín, kyselina močová a ďalšie antioxidanty, prípadne ich kombinácie. Treba však pripomenúť, že u ľudí sú tieto štúdie ovplyvnené do veľkej miery potravou, ktorú prijímajú a množstvom v nej obsiahnutých antioxidantov. Protokoly podávania antioxidantov v štúdiách sa pohybujú od dlhodobých (niekoľko týždňov) až po krátkodobé s nárazovým príjmom 1-2 dni pred zvýšenou fyzickou aktivitou.

Pri **krátkodobej fyzickej aktivite** (< 2 hodiny) sa ukázalo, že samostatné podávanie vitamínov C, E a β -karoténu pri cvičení vedie k zníženiu oxidačného poškodenia, aj keď nie všetky namerané markery OS boli znížené. Požadovaný účinok vitamínov C a E na niektoré markery OS sa ukázal byť závislý od použitej dávky a času suplementácie. Napríklad antioxidantný vplyv vitamínu E na F_2 -izoprostány sa pri cvičení dostavil až po 16 týždňoch podávania pri minimálnej dávke 1 600 IU/deň. Je možné, že aj iné antioxidanty, u ktorých štúdie antioxidantný účinok nepreukázali, si vyžadujú „len“ nastavenie dlhodobého podávania dostatočne vysokej dávky. Pri nárazovom podávaní (je iba málo štúdií tohto typu) sa tiež preukázal antioxidantný účinok u mnohých z testovaných antioxidantov (vitamín C, vitamín E, N-acetylcysteín, multivitaminové preparáty, šťavy z hrozna, malín a červenej repy), ale iba u vybraných testovaných markerov OS.

Epidemiologické štúdie potvrdzujú, že **dlhotrvajúca fyzická aktivita** (> 2 hodiny) je jedným z rizikových faktorov pre vznik kardiovaskulárnych ochorení, pričom OS v tomto ohľade zrejme významne prispieva k negatívnym účinkom dlhého cvičenia. Preto má aj výskum antioxidantov pri dlhotrvajúcom cvičení rozhodne svoje opodstatnenie. Ideálnymi objektmi pre výskum dlhodobej fyzickej aktivity sú maratónci, triatlonisti, prípadne cyklisti, ktorí podstúpia niekoľkohodinové fyzické zaťaženie. U týchto športovcov bol vo väčšine štúdií zaznamenaný zvýšený OS potvrdený prostredníctvom biomarkerov oxidácie lipidov (TBARS, MDA, F_2 -izoprostány, oxidované LDL), proteínov (karbonyly),

DNA (kométový test, 8-hydroxydeoxyguanozín) a oxidovaného glutatiónu. Tieto zmeny boli vo väčšine štúdií sprevádzané aj zvýšením antioxidantných enzýmov (superoxid dismutáza, kataláza, glutatión peroxidáza, glutatión reduktáza) a fluktuáciou koncentrácií vybraných antioxidantov (vitamíny A, C, E). Na rozdiel od krátkodobej fyzickej aktivity dlhodobé podávanie antioxidantov nepreukázalo pri dlhotrvajúcej fyzickej aktivite žiaden protektívny účinok. Jednou z teórií je, že pri dlhotrvajúcej fyzickej aktivite v uvedených štúdiách bolo množstvo generovaných ROS tak veľké, že v skutočnosti presiahlo antioxidantný efekt exogénne podávaných antioxidantov. Na druhej strane, u niektorých športovcov v uvedených štúdiách neboli zaznamenané zvýšené hladiny ROS. Vysvetlenie tohto fenoménu by mohlo spočívať okrem zloženia potravy, alebo užívania nesteroidných antiflogistík aj v nedostatočnej intenzite fyzickej záťaže, tak, aby bolo možné ju vykonávať po celý požadovaný časový úsek (napr. maratón). V takomto prípade by však nemohla nastať ani uvažovaná nadpriemerná generácia ROS. Výsledky štúdií teda nie sú konzistentné a aby bolo možné ich relevantne vyhodnotiť, je v tejto oblasti potrebný rozsiahlejší výskum a zjednotenie podmienok, za ktorých je vykonávaný.

5.1.2 ANERÓBNA FYZICKÁ AKTIVITA A OXIDAČNÝ STRES

Výskumy anaeróbnej fyzickej aktivity v spojitosti s OS nie sú veľmi časté. Napriek tomu, že pojem anaeróbny znamená „za podmienok bez kyslíka“, v športe sa tento pojem používa napr. pre silový tréning, ktorý si nevyžaduje vysokú spotrebu kyslíka ako aeróbne aktivity (beh, cyklistika). Teda napriek tomu, že vzostup kyslíka nie je tak vysoký ako pri aeróbných aktivitách, aj pri anaeróbnom tréningu dochádza k zvýšeniu množstva kyslíka v organizme a tvorbe voľných radikálov. Pre vznik OS platia vyššie uvedené mechanizmy, ktorých aktivácia sa predpokladá aj pri aeróbnej fyzickej aktivite. Pri silovom tréningu sa navyše pri intenzívnej svalovej kontrakcii vyskytujú krátke, opakované ischémie, striedajúce s fázami reperfúzie a mechanický stres. Tieto podmienky vyvolávajú dodatočnú nadmernú tvorbu voľných radikálov a migráciu protizápalových buniek (fagocyty, ktoré sú ďalším zdrojom voľných radikálov) do postihnutej oblasti tkaniva.

Protokoly štúdií anaeróbných cvičení sú zamerané na rôzne typy tréningov, pri ktorých sa svaly sťahujú, alebo len predlžujú, prípadne na izotonické cviky, pri ktorých sa dĺžka svalu nemení. Vo všeobecnosti sa vo všetkých štúdiách potvrdilo zvýšenie OS, a to predovšetkým prostredníctvom peroxidácie lipidov, proteínov, oxidovaného glutatiónu, zníženej antioxidantnej kapacity a v niektorých prípadoch aj poškodením DNA. Podávanie antioxidantov (vitamíny E a C, N-acetylcysteín) zabránilo OS len do istej miery, nie však u všetkých sledovaných biomarkerov. Zo štúdií vyplynulo, že antioxidantne účinné sú prevažne kombinácie antioxidantov, kým ich samostatné podávanie nevedie k zmene oxidačného statusu.

Podľa výsledkov, ktoré máme v súčasnosti k dispozícii, nie je možné jednoznačne odpovedať na otázku, či je OS vznikajúci pri zvýšenej fyzickej aktivite rizikovým faktorom ochorení. S veľkou pravdepodobnosťou bude platiť, že existuje istá miera OS, ktorá vedie k adaptácii antioxidantnej odpovede, čo má z dlhodobého hľadiska pre organizmus pozitívny účinok. Teda pravidelná, stredne dlhá (30 – 60 minút) fyzická aktivita strednej intenzity, vedúca k posilneniu antioxidantnej obrany organizmu, by mohla byť vysvetlením pre pokles rizika kardiovaskulárnych ochorení u pravidelne športujúcich jedincov. Napriek tomu, že mechanizmy pri adaptácii na OS sú pomerne dobre popísané na molekulárnej úrovni, nie je známe, aké je optimálne množstvo ROS, ktoré tieto antioxidantné mechanizmy aktivujú. Je tiež diskutabilné, či podávanie antioxidantov pred športovou aktivitou má význam, ak tieto suplementy v podstate bránia aktivácii fyziologických antioxidantných systémov a postupnej adaptácii organizmu na OS. V prípade, ak OS pri fyzickej aktivite presiahne určitú mieru a vysoké množstvá ROS nevedú k adaptačnej odpovedi, suplementácia antioxidantmi má svoje opodstatnenie, aj keď pri dlhotrvajúcej fyzickej aktivite podávanie antioxidantov nepreukázalo zníženie OS.

5.2 VPLYV STRAVY NA OXIDAČNÝ STRES

Rozsah OS je možné čiastočne ovplyvniť širokou škálou exogénne podávaných neenzýmových a enzýmových antioxidantov, ktorých základný prehľad a účinky boli popísané v predchádzajúcich kapitolách. Dnes sa dá zakúpiť nespočetné množstvo doplnkov výživy s obsahom rôznych kombinácií antioxidantov, ktorých podávanie sa odporúča buď ako prevencia ochorení, alebo pri liečbe ochorení ako podporný farmakologický prístup. Napriek tejto možnosti je však lepšie zabezpečiť dostatočný príjem antioxidantov vo vyváženej diéte. Keďže nevyvážené zloženie stravy môžeme považovať za jeden z rizikových faktorov viacerých civilizačných ochorení (ateroskleróza, diabetes mellitus, hypertenzia, obezita, metabolický syndróm,...), ktorých príčinou je aj OS, mnohé výskumy sa zamerali na posúdenie vplyvu konzumácie týchto nezdravých diét na jeho vznik.

Aj v dnešnej dobe je ťažké definovať, čo presne je ideálna diéta a ako by sme sa mali stravovať, aby sme zabezpečili pre organizmus všetko, čo potrebuje. Tabuľky udávajúce priemerné denné dávky potrebných živín pre mužov, ženy, pre deti a starších ľudí predstavujú to, čo označujeme ako „ideálne zloženie stravy“. Je tu však mnoho ďalších faktorov (napr. výška, denná fyzická aktivita ...), ktoré treba individuálne zohľadniť, tak aby sme prijímali stravu, ktorá nám vyhovuje a nespôsobuje zdravotné problémy. Ako „nezdravé diéty“ sa všeobecne označujú diéty s vysokým denným príjmom kalórií, dodávaných najmä v podobe tukov a cukrov, ktoré navyše obsahujú len málo vitamínov a minerálov a nepokrývajú základné nároky organizmu na zabezpečenie fyziologických funkcií. Pri takomto zložení stravy je z dlhodobého hľadiska pravdepodobné, že bude viesť k niektorému z vyššie uvedených civilizačných ochorení. Výskumy sa preto často zameriavajú na vplyv hyperkalorickej diéty s vysokým obsahom tukov alebo cukrov na OS a jeho následky v spojitosti s uvedenými ochoreniami, rovnako ako na výskum účinku exogénne podávaných antioxidantov v týchto podmienkach.

Získavanie energie zo živín v potrave je založené na oxidačnej fosforylácii, ktorej reakčný mechanizmus je založený na zabudovaní molekuly kyslíka do substrátov, čo je proces spojený s produkciou voľných radikálov. V zdravom organizme sú voľné radikály generované touto cestou eliminované prostredníctvom antioxidantných mechanizmov. Ak však antioxidantná obrana pri spracovaní potravy nie je dostatočujúca, nastáva „**nutričný oxidačný stres**“. Pojem „**postprandiálny oxidačný stres**“ vyjadruje potom zvýšenú tendenciu organizmu pretrvávajúť v stave OS po konzumácii jedla s nadpriemerne vysokým obsahom cukrov alebo tukov. Zo živín prijatých v strave sú najľahšie oxidovateľné tuky, najmä tie, ktoré obsahujú polynenasýtené mastné kyseliny. Čím väčšie je ich množstvo, tým vyššia je pravdepodobnosť ich oxidácie a nedostačujúcej antioxidantnej ochrany. Bolo dokázané, že postprandiálne sú oxidované prednostne LDL častice, o ktorých je známe, že sú jedným z hlavných patogenetických faktorov aterosklerózy. Ak teda dochádza k pravidelnej konzumácii jedla s vysokým obsahom tukov niekoľkokrát denne, organizmus sa nachádza v podstate v stave nepretržitého postprandiálneho OS, čím sa riziko aterosklerózy a s ňou súvisiacimi ochoreniami ešte zvyšuje. Príjem lipidov bohatých na polynenasýtené mastné kyseliny vedie k vzniku veľkého množstva hydroperoxidov, ktoré vyvolávajú reťazové oxidácie ďalších molekúl. Pri strave s vysokým obsahom lipidov môže prísť k ich oxidácii ešte pred ich konzumáciou a do organizmu sa tak dostávajú už vo forme voľných radikálov. V potravinárskom priemysle sa preto venuje veľká pozornosť výskumom peroxidácie lipidov pri spracovaní potravín a využívajú sa rôzne lipofilné antioxidanty. Ak sa do organizmu prijatou potravou dostávajú už peroxidované lipidy, tieto sú účinne redukované gastrointestinálnou glutatiómovou peroxidázou pri ich vstrebávaní. Tento enzým však nedokáže redukovať všetky peroxidované lipidy, a to najmä ak ich množstvo presahuje enzýmové kapacity. Isté percento peroxidovaných lipidov sa preto dostáva priamo do krvného obehu. Výskumy potvrdili, že množstvo lipidových hydroperoxidov v plazme po príjme potravy je priamo úmerné aktivite gastrointestinálnej glutatiómovej peroxidázy. Oxidované lipidy v potrave navyše vyvolávajú reťazovými reakciami vznik sekundárnych voľných radikálov, ktoré po vstrebávaní z gastrointestinálneho traktu potencujú OS. Okrem pridania antioxidantov, ktoré sa požívajú pri príprave potravinárskych výrobkov, je možné zabrániť OS aj súčasným dodaním antioxidantov počas konzumácie jedla napríklad vo forme doplnkov výživy, alebo konzumáciou jedla s vysokým obsahom antioxidantov. V štúdiu, v ktorej sa skúmali účinky červeného vína (obsahuje antioxidanty prokyanidí-

ny) u diabetických pacientov sa zistilo, že jeho konzumácia s jedlom zabraňuje postprandiálnemu OS. Podobné antioxidantné účinky boli zaznamenané aj pri výskume rôznych iných polyfenolov.

Tak ako strava s vysokým obsahom lipidov, aj strava s vysokým obsahom cukrov vyvoláva OS. Cukry ale v porovnaní s lipidmi nepodliehajú vo veľkej miere oxidácii, ich zvýšený príjem vyvoláva teda OS inými cestami, pričom zrejme pôjde o kombináciu viacerých mechanizmov. V jednom z experimentov, ktoré sa zaoberajú touto problematikou, bola zaznamenaná nadpriemerná produkcia ROS v leukocytoch pri zvýšenom príjme glukózy. Keďže súčasne bola pozorovaná aj zvýšená expresia NADPH-oxidázy a jej selektívna inhibícia inhibovala produkciu ROS aj pri vysokých hladinách glukózy, autori sa domnievajú, že NADPH-oxidáza zohráva pri OS vyvolanom hyperglykémiou zásadnú úlohu.

Kombinácia vysokého množstva lipidov a cukrov v jednom jedle nesie so sebou kombináciu vyššie uvedených rizík vzniku OS. Ak človek dostáva takúto stravu opakovane, už za 4 dni sa zvyšuje aktivita väčšiny antioxidantných enzýmov (predovšetkým peroxiredoxínov a Mn-superoxid dismutázy), kým aktivity katalázy a CuZn-superoxid dismutázy ostávajú nezmenené. Adaptačný mechanizmus daný zvýšením antioxidantných enzýmov po opakovanom príjme vysokokalorickej stravy síce vedie k zníženiu hladín vybraných voľných radikálov, no hladiny niektorých biomarkerov OS rastú, čo vypovedá o zvyšujúcom sa OS a nedostatočnej antioxidantnej obrane.

Zo štúdií jednoznačne vyplýva, že zloženie diéty ovplyvňuje redoxnú rovnováhu v organizme. Na rozdiel od iných faktorov vedúcich k rozvoju OS, ktoré sú ťažko ovplyvniteľné (napr. smog v ovzduší, užívanie liekov) je v prípade potravín možné si vybrať. A keďže väčšinu dňa sa organizmus nachádza v podstate v postprandiálnom stave, vhodnou voľbou potravy je možné oxidačnú záťaž organizmu aspoň do istej miery regulovať.

5.3 VPLYV NÁVYKOVÝCH LÁTOK NA OXIDAČNÝ STRES

K životnému štýlu môžeme zaradiť aj užívanie niektorých návykových látok, ktoré sú charakterizované aj ako „ľahké drogy.“ Medzi ne zaraďujeme nikotín a kofeín, ktorých užívanie je spojené nielen s psychickou, ale aj fyzickou závislosťou.

5.3.1 KOFEÍN A JEHO VPLYV NA OXIDAČNÝ STRES

Kofeín je na svete najčastejšie užívaná psychostimulačná látka. Najviac kofeínu sa nachádza v káve, čaji, „kolových“ nápojoch a čokoláde (s vysokým obsahom kakaa). Kofeín je aj súčasťou mnohých bežne používaných viaczložkových liekov ako sú analgetiká, spazmolytiká, antialergiká a lieky používané pri prechladnutí. V modernej spoločnosti je teda konzum kofeínu bežným javom, pričom jeho priemerný denný príjem u dospelých je okolo 200 – 300 mg. V malých množstvách kofeín stimuluje mozgovú kôru, potláča únavu a vedie k zvýšeniu mentálnej koncentrácie. Mechanizmus centrálnych účinkov kofeínu nie je dodnes známy, uvažuje sa však nad antagonizáciou adenosínových recepto-rov a zvýšením uvoľňovania katecholamínov. Vo vysokých dávkach pôsobí kofeín kontraproduktívne, vyvoláva nervozitu, nespavosť, tremor a ďalšie negatívne účinky. Pri dlhodobej konzumácii malých dávok kofeínu sa závislosť na tejto látke prejavuje abstinenčnými príznakmi, ktoré sú charakteristické aj pre jeho konzumáciu vo vysokých dávkach – bolesti hlavy, únava, podráždenie, poruchy sústredenia, nauzea, zvracanie a u niektorých ľudí boli dokonca pozorované aj depresívne epizódy a návaly paniky. Abstinenčné bolesti hlavy by mohli byť vysvetlené na základe zvýšeného prekrvenia mozgu po „vysadení“ kofeínu.

Čo sa týka vzťahu kofeínu k oxidačnému stresu, je mnoho štúdií, ktoré prinášajú výsledky o antioxidantných účinkoch kofeínu. V *in vitro* štúdií bolo dokázané, že kofeín pôsobí antioxidantne pri peroxidácii lipidov v LDL časticiach, ktorá bola experimentálne vyvolaná rôznymi druhmi voľných radikálov. V štúdií boli použité fyziologicky prijateľné dávky kofeínu, pričom jeho antioxidantný efekt bol priamo úmerný k použitej dávke. Úloha kofeínu v OS bola sledovaná aj v *in vivo* štúdiách. V rámci výsku-

mu kofeínu a jeho účinkov v centrálnom nervovom systéme sa zistilo, že znižuje peroxidáciu lipidov v mozgu potkanov. Na antioxidantné účinky kofeínu sa odvolávali aj štúdie, ktoré skúmali jeho antikancerogénny efekt dokázaný pri kožných nádoroch myší a rakovine žalúdka u potkanov. Keďže kofeín je štruktúrne podobný kyseline močovej, ktorá je fyziologickým antioxidantom, dobre účinkujúcim voči hydroxylovým a peroxylovým radikálom, niektorí vedci sa domnievajú, že kofeín má podobné antioxidantné vlastnosti. Štúdie však preukázali antioxidantný účinok kofeínu voči hydroxylovým radikálom až pri milimolárnych množstvách, čo je približne tisíckrát vyššia koncentrácia, než v ktorej sa vyskytuje v organizme. V mikromolárnych množstvách síce kofeín nepreukázal antioxidantné účinky, no vykazovali ich niektoré jeho metabolity. V ďalšej štúdií bol po podávaní kofeínu dokázaný pokles peroxidácie lipidov stanovený pomocou malondialdehydu a pokles pokročilých produktov oxidácie proteínov (AOPP) v srdci a pečeni potkanov. V tejto istej štúdií sa zároveň sledoval aj vplyv kofeínu na hladiny oxidu dusnatého. Po podávaní kofeínu jeho koncentrácia signifikantne stúpla v pečeni, kým v srdci neboli zaznamenané žiadne zmeny. Vzostup oxidu dusnatého po konzumácii kofeínu bol zaznamenaný aj v mozgu myší a potkanov, pričom jeho zvýšené hladiny by mohli byť vysvetlené súčasným znížením aktivity arginázy v mozgu. Eliminácia voľných radikálov v centrálnom nervovom systéme po podaní kofeínu bola tiež dokázaná mnohými výskumnými skupinami, ktoré sa zaoberajú neurodegeneratívnymi ochoreniami, pri ktorých OS zásadne prispieva k ich progresii a zrejme je jedným z patogenetických faktorov. Na základe výsledkov týchto štúdií by teda bolo možné povedať, že kofeín je dobrým antioxidantom a jeho konzumácia má pozitívne účinky. Netreba však zabúdať, že kofeín pôsobí na niekoľkých ďalších úrovniach, pričom výsledky experimentov poukazujú často aj na negatívne dopady jeho užívania. Napríklad podľa niektorých štúdií kofeín zvyšuje stresovú odpoveď (prostredníctvom hormonálneho, adrenergného a imunitného systému), ovplyvňuje kardiovaskulárny systém (zvyšuje krvný tlak a riziko infarktu myokardu, spôsobuje arytmie), zhoršuje podmienky gastrointestinálneho systému (podporuje vznik vredov žalúdka a zvyšuje riziko vzniku syndrómu dráždivého čreva). Publikovaná bola dokonca aj štúdia, ktorá poukázala na negatívny antioxidantný vplyv kofeínu na bunkových kultúrach neurocytov. Cieľom experimentu bolo testovať účinky vysokých dávok kofeínu v tzv. „vysokoenergetických“ nápojoch, ktoré väčšinou obsahujú aj ďalšie návykové látky, často výťažky z guarany, ktorá obsahuje okrem kofeínu aj iné metylxantíny, potencujúce „povzbudivý“ účinok týchto nápojov. Antioxidantný účinok kofeínu v týchto vysokých dávkach viedol v neurocytoch k eliminácii voľných radikálov až pod ich fyziologické hodnoty, ktoré sú dôležité pre zabezpečovanie fyziologických funkcií buniek. Jednou z nich je aj stimulácia fyziologickej aktivity antioxidantných enzýmov, ktoré v prípade OS sú schopné zabezpečiť dostatočnú antioxidantnú odpoveď. Pri vysokých dávkach kofeínu však boli aktivity antioxidantných enzýmov (SOD, CAT) výrazne znížené. Tento stav bol zároveň sprevádzaný stratou životaschopnosti buniek a zvýšením proapoptických markerov, preto autori označili kofeín vo vysokých dávkach za priam cytotoxický.

5.3.2 ČOKOLÁDA A OXIDAČNÝ STRES

Kvalitná čokoláda s vysokým obsahom kaka (tmavá/horká čokoláda) môže pôsobiť ako dobrý antioxidant. Mnohé štúdie sa zaoberali antioxidantnými účinkami hlavných obsahových látok kakaových bôbov, z ktorých sa čokoláda vyrába. Kakaové bôby obsahujú asi 380 známych chemických komponentov, z čoho 10 predstavujú psychostimulačné látky (metyl xantíny – kofeín, teobromín, teofylín a iné) a zvyšok sú polyfenoly (flavonoidy), ktoré sú príčinou extrémne horkej chute kakaových bôbov. Spracovaním kakaových bôbov dochádza k postupnému znižovaniu množstva flavonoidov a vo výsledných potravinových produktoch, ako je kakao alebo čokoláda, sa nachádza z pôvodných 100 % flavonoidov približne iba 10 % a úmerne klesá aj percento metylxantínov. Spektrum flavonoidov v čokoláde preto závisí od použitých výrobných postupov, ako aj typu kakaovníka, z ktorého sa kakaové bôby získali. V čerstvých kakaových bôboch sú zastúpené hlavné tri skupiny flavonoidov: katechíny (37 %), antokyanidíny (4 %) a proantokyanidíny (58 %), no ako bolo uvedené, ich pomer sa výrobným procesom mení. Flavonoidy z čokolády (primárne monoméry –epikatechín) sa v gastrointestinálnom trakte dobre vstrebávajú a majú dostatočne vysokú biodostupnosť, na čo poukazujú aj štúdie, v ktorých bola dokázaná korelácia medzi množstvom konzumovanej čokolády a hladinou epikatechínu

v krvi. Bezprostredne po konzumácii 80 g čokolády koncentrácia epikatechínu v krvi u ľudí dosiahla až 355 nmol/l a za 6 hodín bolo v krvi dobrovoľníkov nameraných stále ešte 103 nmol/l.

Rôzne polyfenolové extrakty kakaa boli testované *in vitro* na ich antioxidačnú aktivitu, pričom sa potvrdilo, že dokážu vychytávať voľné radikály (superoxid, hypochlorid, peroxynitrit). Súčasne polyfenoly v úlohe chelátorov iónov kovov zabraňujú aj peroxidácii lipidov. Bolo tiež dokázané, že kakaové flavonoidy znižujú peroxidáciu lipidov aterogénnych LDL častíc a miera ich antioxidačného účinku je priamo úmerná dávke flavonoidov. Spojitosť medzi dávkou čokolády a antioxidačným účinkom sa potvrdila aj pri meraní ďalších markerov OS. Napríklad pri stanovení celkovej antioxidačnej kapacity krvi sa ukázalo, že kým 2 a 6 hodín po konzumácii bežného jedla (chlieb) celková antioxidačná kapacita krvi klesá, po pridaní čokolády (27 g) ostala nezmenená, alebo sa zvyšovala s narastajúcou dávkou čokolády (53 g a 80 g). Zvyšovanie peroxidácie lipidov stanovené pomocou TBARS testu bolo zastavené pri nižších dávkach čokolády (27 g a 53 g), ale po konzumácii 80 g čokolády bol pozorovaný zreteľný pokles peroxidácie lipidov. V tej istej štúdií boli merané aj hladiny 8-izoprostánu v plazme, na ktorého koncentrácie však nemal príjem potravy bez a s čokoládou žiaden vplyv. V dlhodobej štúdií, v ktorej sa sledoval vplyv diéty s každodennou konzumáciou 22 g kakaového prášku a 16 g tmavej čokolády počas 4 týždňov, bola tiež zaznamenaná mierne zvýšená antioxidačná aktivita. Príjem kakaa a čokolády viedol k nárastu celkovej antioxidačnej kapacity plazmy a poklesu hladín prostaglandínu PGF_{1α} v moči, kým zníženie oxidácie LDL častíc nebolo jednoznačne dokázané (bola zaznamenaná iba predĺžená „lag fáza“ (oneskorenie) oxidácie LDL častíc). Napriek zvýšenému príjmu kalórií v diéte nedošlo v skupine konzumujúcej kakao a čokoládu k nárastu telesnej hmotnosti, ani zhoršeniu lipidového profilu v krvi, naopak u týchto ľudí boli zaznamenané zvýšené hladiny HDL cholesterolu.

Okrem flavonoidov obsahuje tmavá čokoláda aj kofeín a ďalšie metylxantíny, ktorých obsah závisí od druhu kávy a čokolády. Čím viac kakaa čokoláda obsahuje, tým je obsah metylxantínov vyšší. Jedna šálka espressa obsahuje asi 80 mg kofeínu, čo je rovnaké množstvo, ktoré sa nachádza v 100 g 85% tmavej čokolády. Výsledný antioxidačný účinok v čokoláde treba preto pripísať nielen flavonoidom, ale aj metylxantínom. Možno teda zhrnúť, že podľa výsledkov štúdií, ktoré sú dnes k dispozícii, konzumácia niekoľkých desiatok gramov kvalitnej tmavej čokolády eliminuje negatívne dopady oxidačného stresu.

5.3.3 NIKOTÍN A CIGARETOVÝ DYM VO VZŤAHU K OXIDAČNÉMU STRESU

Nikotín je rastlinný alkaloid a ligand nikotínových receptorov vegetatívneho nervového systému, pre ktoré je fyziologickým ligandom acetylcholín. V malých dávkach pôsobí nikotín v centrálnom nervovom systéme stimulačne, zvyšuje koncentráciu a má anxiolytický efekt, kým jeho vyššie dávky sú letálne. U chronických fajčiarov však bola preukázaná tolerancia na nikotín, takže dávky, ktoré by boli pre nefajčiarov letálne môžu byť u chronických fajčiarov bežnými dennými dávkami nikotínu. V ostatných rokoch sa experimentálny výskum sústredil na vplyv podávania nikotínu ako liečiva pri chorobách centrálneho nervového systému (Alzheimerova a Parkinsonova choroba, depresia, schizofrénia). Nikotín bol podávaný pacientom s týmito ochoreniami v niekoľkých klinických štúdiách, no jeho použitie v uvedených indikáciách zatiaľ nie je schválené žiadnou štátnou autoritou. V súčasnosti sa nikotín využíva iba pri odvykacej terapii pri závislosti na fajčení cigariet, a to vo forme náplastí, ktoré postupne uvoľňujú malé dávky nikotínu, čím majú postupne znižovať potrebu nikotínu prijímaného fajčením cigariet. Nevýhodou náplastí je, že neliečia aj pridruženú psychickú závislosť, a tak často odvykacia terapia náplastami zlyháva, pretože nerieši komplexný problém závislosti. Fajčenie cigariet je nebezpečná závislosť, ktorá zvyšuje riziko pľúcnych ochorení, ako sú chronická bronchitída, emfyzém, pneumónia a karcinóm pľúc. Zvýšené riziko nádorov pri fajčení sa však týka aj ďalších orgánov dýchacieho systému (larynx, pharynx), močového systému (obličky, močové cesty), tráviaceho systému (ústna dutina, pažerák, pankreas, pečeň, žalúdok, črevo). Fajčenie navyše narúša cievny endotel, podporuje agregáciu trombocytov a vazokonstrikciu, čo vedie k poškodeniu ciev a závažným následkom,

ktoré sa manifestujú najčastejšie ochoreniami kardiovaskulárneho systému (ateroskleróza, hypertenzia). Za uvedené škodlivé následky fajčenia nezodpovedá primárne nikotín obsiahnutý v cigaretách, ale skôr spôsob, akým sa dostáva do organizmu – vdychovaním cigaretového dymu. Cigaretový dym obsahuje viac ako 4000 zlúčenín, z ktorých sú mnohé kancerogény a voľné radikály, alebo produkciu voľných radikálov stimulujú. Prehľad vybraných zložiek cigaretového dymu uvádza tabuľka 7.

Tabuľka 7. Hlavné zložky cigaretového dymu

Fáza	Hlavné chemické komponenty
Plyn	dusík, amoniak, oxidy dusíka a uhlíka (NO, NO ₂ , CO, CO ₂), sulfán, metán, prchavé aldehydy (etanal, akrolein, formaldehyd, krotónaldehyd), benzén, toluén, acetón, vinylchlorid, nenasýtené uhľovodíky, metylamín, nitropropán
Častice	decht, nikotín, ióny kovov (kadmium, olovo, hliník, nikel, železo, mangán, chróm, arzén), fenoly, chinóny, semichinóny, kancerogénne uhľovodíky (benzpyrén, benzantracén, chryzén), nitrozamíny, mastné kyseliny

Jeden vdych cigaretového dymu obsahuje až 10^{14} molekúl voľných radikálov, predovšetkým superoxidový radikál a oxidy dusíka v plynnej fáze a hydrochinóny a semichinóny v pevnom podiele, ktorý predstavujú častice. Hydrochinóny sú mimoriadne agresívne, nakoľko sa dostávajú priamo do jadra buniek, kde oxidujú molekuly DNA a spôsobujú ich mutácie. Decht, ktorý vzniká tepelným rozkladom organických zlúčenín bez prístupu vzduchu, obsahuje veľké množstvo iónov kovov (kadmium, arzén, nikel, meď, ...), ktoré urýchľujú oxidačné procesy. Tento efekt je podporovaný viacerými druhmi voľných radikálov z cigaretového dymu, ktoré zvyšujú hladiny iónov železa tak, že ho uvoľňujú z feritínu. Vo všeobecnosti dochádza pri fajčení k redukcii celkovej antioxidačnej intra- a extracelulárnej kapacity, pretože sa vyčerpávajú zásoby antioxidantov (vitamín C, kyselina močová, α -tokoferol či β -karotén). U fajčiarov sú preto potrebné vyššie dávky vitamínov, než u nefajčiarov. Najmä hladiny vitamínu C sú u fajčiarov pomerne nízke, preto by ich denné dávky mali byť vyššie. Podobne „zrýchlený“ je aj metabolizmus α -tokoferolu, ktorý je dôležitý pre ochranu pred peroxidáciou lipidov. Jeho znížené hladiny u fajčiarov sa dokážu normalizovať aj zvýšenými dávkami vitamínu C, avšak štúdie ukázali, že ani zvýšenie hladín α -tokoferolu u fajčiarov nevedlo k zníženiu markerov peroxidácie lipidov. Pri chronickom fajčení sa zistili adaptačné mechanizmy na zvýšený oxidačný stres, indikované zvýšenými hladinami glutatiónu a antioxidačných enzýmov (superoxid dismutáza, kataláza, glutatión peroxidáza). Tieto mechanizmy ale nestačia na to, aby pokryli potrebnú antioxidačnú obranu pri vyčerpaní iných antioxidantov pri zvýšenom nápore OS a zabránili postupnému odumieraniu alveolárnych buniek. Z hľadiska mechanizmov, ktorými škodlivé látky v cigaretách prispievajú k patogenéze chorôb, hrá oxidačný stres jednu z hlavných úloh, aj keď to neplatí explicitne pre všetky zlúčeniny v cigaretovom dyme (niektoré nemajú žiaden vplyv na OS). Základné mechanizmy, ktorými voľné radikály cigaretového dymu zasahujú do fyziologických funkcií organizmu, možno definovať nasledovne:

1. Peroxylové radikály a radikály dusíka priamo oxidujú proteíny, lipidy a DNA, čo bolo potvrdené zvýšenými markermi ich oxidačného poškodenia v krvi, v moči a vdychovanom vzduchu fajčiarov.
2. Aldehydy, predovšetkým akroleín, nenasýtené aldehydy, acetaldehyd a formaldehyd, rozkladajú tiolové skupiny a aminoskupiny, znižujúc tak hladiny dostupného glutatiónu.
3. Hydrochinóny a chinóny generujú semichinóny, pričom súčasne vzniká superoxidový radikál a peroxid vodíka.
4. Zápalové procesy, ktoré vdychovanie dráždivého cigaretového dymu vyvoláva, sú spojené so zvýšenou aktivitou alveolárnych makrofágov produkujúcich voľné radikály. Pri zápale do pľúc rýchlo infiltrujú aj neutrofilové bunky, ktoré sú zdrojom hypochlórovej kyseliny.
5. Voľné radikály generované pri fajčení deaktivujú surfaktanty a inhibítory α_1 -proteinázy, ktorého nízke hladiny nedokážu regulovať množstvo elastázy uvoľnenej z makrofágov a neutrofilov. Uvedený mechanizmus a zvýšená prozápalová aktivita elastázy deštruuje alveolárne bunky, čo môže byť príči-

nou pľúcneho emfyzému.

6. Nízky príjem antioxidantov v diéte u fajčiarov v kombinácii s vyčerpaním fyziologických antioxidantov vedie k nedostatočnej antioxidantnej obrane organizmu, čo prehľbuje oxidačné zaťaženie organizmu.

Voľné radikály z cigaretového dymu v konečnom dôsledku poškadzujú proteíny, lipidy aj nukleové kyseliny, dokonca už po jednorazovom vdychovaní cigaretového dymu. V rôznych štúdiách sa preto testovali markery OS vo vydychovanom vzduchu, v krvi a v bronchoalveolárnej tekutine po vyfajčení jednej cigarety. U fajčiarov bol v týchto výskumoch zaznamenaný nárast hladín 8-izoprostánov a peroxidu vodíka vo vydychovanom vzduchu a superoxidového radikálu v bronchoalveolárnej tekutine. Animálne modely a *in vitro* experimenty zase poukázali na zníženie hladín glutatiónu, zvýšené hladiny peroxidu vodíka a superoxidových radikálov, ako aj na nárast hladín oxidu dusnatého. V štúdiách na ľuďoch a zvieratách boli zvýšené predovšetkým markery peroxidácie lipidov, kým *in vitro* sa ich primárna oxidácia nepotvrdila. U chronických fajčiarov sa organizmus snaží vyrovnáť s každodennou záťažou OS aj adaptačnými mechanizmami. ROS vo vdychovanom dyme zvyšujú expresiu transkripčného faktora AP-1, ktorý stimuluje tvorbu ochranné pôsobiaceho mucínu v dýchacích cestách a zároveň zvyšuje hladiny enzýmu γ -glutamylcystein syntázy, rýchlosť udávajúceho enzýmu pri tvorbe glutatiónu. U fajčiarov bol v pľúcach zaznamenaný aj nárast expresie génov glutatión peroxidázy 2 a 3, glutatión reduktázy, tioredoxín reduktázy a glutatión-S-transferázy. Poškodenie DNA je minimalizované zvýšenou aktivitou jej reparačných enzýmov, čo však, ako vypovedajú epidemiologické štúdie, nie je dostačujúce na to, aby sa zabránilo rozvoju nádorových ochorení.

Fajčenie ako také sa netýka len aktívnych fajčiarov, ale aj ľudí, ktorí sú donútení vdychovať v prítomnosti fajčiarov dym z cigariet a zároveň nimi vydychovaný vzduch. Pasívni fajčiari dýchajú dym s obsahom voľných radikálov a sú vystavení riziku rovnakých ochorení, aké sa vyskytujú u chronických aktívnych fajčiarov (rôzne pľúcne ochorenia, nádory, choroby kardiovaskulárneho systému,...). Mnohé štúdie potvrdili zvýšený výskyt uvedených ochorení u detí, ktoré žijú v domácnosti s rodičmi fajčiarmi. Okrem iného, u týchto detí stúpa trojnásobne riziko, že sa u nich niekedy v budúcnosti vyskytne nádorové ochorenie.

5.4 ZNEČISTENÉ OVZDUŠIE A OXIDAČNÝ STRES

Zamorené ovzdušie je celosvetovým problémom, ktorý sa týka čoraz väčšej časti ľudskej populácie. K miernemu zlepšeniu kvality ovzdušia vo vyspelých štátoch prispel v posledných rokoch vytrvalý nátlak ekologických aktivistov a prísnejšie zákony, ktoré znížili povolené limity koncentrácie niektorých toxínov v ovzduší. Pretože nie všetky štáty pristupujú k otázke riešenia ekologických problémov s rovnakou zodpovednosťou a nezavádzajú opatrenia, ktoré by viedli k zlepšeniu súčasného stavu, v globálnom ponímaní sa kvalita ovzdušia nezlepšuje. Následkom vysokej koncentrácie toxínov v ovzduší tak dochádza k porušeniu rovnováhy v ekosystémoch a závažným klimatickým zmenám na celej planéte. Toxické látky, ktoré sa nachádzajú vo vzduchu a denne ich dýchame, môžu tiež vážne poškodiť zdravie, dokonca až zapríčiniť smrť. Epidemiologické štúdie už dokázali spojitost medzi vysokým stupňom znečistenia životného prostredia a výskytom kardiovaskulárnych ochorení či ochorení dýchacieho systému. Reakčné mechanizmy, ktoré zodpovedajú za škodlivé účinky toxínov, sú rôznorodé a časť z nich je sprostredkovaná aj voľnými radikálmi. Oxidačný stres vyvolávajú voľné radikály, ktoré sa nachádzajú vo vdychovanom vzduchu alebo vznikajú až neskôr v organizme pri reakciách toxínov neradikálovej povahy (ióny ťažkých kovov, organické polycyklické aromáty, endotoxín,...) s biomolekulami. Znečistené ovzdušie je preto jednoznačne jedným z hlavných faktorov, ktoré ovplyvňujú výsledný oxidačný status v organizme.

Ozón, ktorý je súčasťou ozonosféry má v podstate antioxidantný účinok, pretože chráni pred UV žiarením, ktoré je potenciálnym generátorom voľných radikálov. V atmosfére je však prítomnosť vysokých koncentrácií ozónu nežiaduca a škodlivá. Do atmosféry sa ozón dostáva únikom zo stratosféry, radiáciou, alebo fotochemickými reakciami s organickými výparmi. Koncentrácie ozónu v interiéroch

zvyšuje časté používanie fotokopíriek, laserových tlačiarňí, či elektrostatických čističiek vzduchu. Pri dýchaní vzduchu s vysokým množstvom ozónu je zabezpečená jeho eliminácia antioxidantmi, ktoré sa nachádzajú v kvapaline pokrývajúcej dýchací trakt. Hlavným antioxidantom v tejto kvapaline je glutatión a podpornú úlohu má aj askorbát a kyselina močová. Od miery antioxidantnej ochrany v kvapaline pokrývajúcej dýchací trakt závisí miera oxidačného stresu, ktorý ozón vyvolá tvorbou sekundárnych voľných radikálov. Ak sa totiž ozón vyhne antioxidantnej bariére, rýchlo reaguje s tiolovými skupinami lipidovo-proteínovej dvojvrstvy buniek lemujúcich dýchací trakt. S nenasýtenými masťnými kyselinami tvorí ozón ozonidy, ktoré sa ďalej rozpadajú na toxické aldehydy. Ozón tiež stimuluje tvorbu vysoko reaktívnych superoxidových a hydroxylových radikálov. Následkom oxidačného stresu, ktorý vzniká v pľúcach vdychovaním ozónu, dochádza k aktivácii prozápalových mediátorov, čo z dlhodobého hľadiska vedie k trvalému poškodeniu pľúcneho epitelu. Či dodatočný príjem antioxidantov – najmä vitamínu C a vitamínu E – dokáže potlačiť OS vyvolaný ozónom nie je jednoznačné, pretože výsledky štúdií sa v tomto bode rozchádzajú. Ukázalo sa však, že vystavovanie zvierat ozónu vedie k adaptačnej reakcii organizmu na vyššiu záťaž OS.

V oblastiach s vysokou hustotou dopravy je dominantným toxínom v ovzduší **oxid dusičitý**, ktorý sa uvoľňuje pri spaľovaní pohonných látok v automobiloch. V interiéroch stúpajú koncentrácie oxidu dusičitého najmä v zafajčených priestoroch zásluhou cigaretového dymu. Reakciou medzi kyslíkom a atmosférickým dusíkom vzniká v atmosfére oxid dusnatý, ktorý môže byť oxidovaný na oxid dusičitý. Ďalšia oxidácia, často spôsobená atmosférickým ozónom je zakončená tvorbou nitrátového radikálu. Vysoko reaktívny oxid dusičitý reaguje v pľúcach najmä s lipidmi a proteínmi, ktoré sa nachádzajú v kvapaline lemujúcej dýchací trakt, kým nitrátový radikál vyvoláva najčastejšie peroxidáciu polynenasýtených masťných kyselín.

Dráždivo pôsobia na horné dýchacie cesty aj vysoké koncentrácie plynného **oxidu siričitého**, ktorý sa dostáva do atmosféry spaľovaním organických látok s obsahom síry. V dýchacom trakte vyvoláva tento plyn bronchokonstrikciu, čo môže byť mimoriadne nebezpečné pre pacientov s astmou. V pľúcach sa oxid siričitý, ktorý nemá povahu radikálu, rozpušťa na sulfity a bisulfity. Ich oxidáciou vznikajú príslušné radikály a ako ďalšie produkty oxidačných reakcií sa uvoľňujú superoxidový radikál a peroxid vodíka, čím sa potencuje rozvoj OS.

V ovzduší sa nachádzajú aj ďalšie zlúčeniny, ktoré sú vysoko reaktívne a na ľudský organizmus pôsobia toxicky. Pri vdychovaní toxínov sú vystavené ich škodlivým účinkom v prvom rade bunky dýchacieho traktu a tekutina, ktorá ich pokrýva. Účinnosť antioxidantov, ktoré sa nachádzajú v týchto kompartmentoch preto rozhoduje o tom, aké množstvo voľných radikálov sa dostane do organizmu. V pľúcach spúšťajú voľné radikály zápalovú odpoveď sprevádzanú infiltráciou protizápalových buniek (makrofágy, neutrofilny), ktoré sú tiež producentmi voľných radikálov, čím sa OS umocňuje. U ľudí, ktorí trávajú veľa času na miestach so zamoreným ovzduším, sa tieto mechanizmy neustále cyklicky opakujú a zvyšuje sa tak u nich riziko výskytu chorôb dýchacieho systému. Antioxidanty podávané ľuďom žijúcim v znečistenom ovzduší nemajú podľa štúdií dokázateľný pozitívny vplyv na zníženie hladín biomarkerov oxidačne poškodených molekúl či úpravu funkcie pľúc narušenej OS.

Spôsob akým žijeme, teda náš životný štýl ovplyvňuje do veľkej miery oxidačné zaťaženie, ktorému sme vystavení. V tejto kapitole sú uvedené len niektoré vybrané faktory životného štýlu a ich vplyv na oxidačný stres, v skutočnosti je ich však nespočetné množstvo. Okrem životného prostredia a zloženia stravy je napríklad dôležitá aj psychická kondícia, pretože nedostatok spánku, hluk či psychický stres potencujú OS. Voľba takého životného štýlu, ktorý je spojený s čo najmenším vystavením organizmu voľným radikálom je zároveň aj dobrou profylaxiou voči ochoreniam, ktorých patofyziológia súvisí s nadmerným oxidačným zaťažením.

5.5 LITERATÚRA

Andújar I, Recio MC, Giner RM, JL Ríos. Cocoa polyphenols and their potential benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;906252.

- Aoshiba K, Nagai A. Oxidative Stress, Cell Death, and Other Damage to Alveolar Epithelial Cells Induced by Cigarette Smoke. *Tobacco induced diseases* 2003; Vol. 1, No.3:219-226.
- Ceriello A, Bortolotti N, Motz E, Lizzio S, Catone B, Assaloni R, Tonutti L, Taboga C. Red wine protects diabetic patients from meal-induced oxidative stress and thrombosis activation: a pleasant approach to the prevention of cardiovascular disease in diabetes. *Eur. J. Clin. Investig.*, 2001; 31:322–328.
- Fisher-Wellman K, Bloomer RJ. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dynamic Medicine* 2009; 8(1):1.
- Joyner MJ, Green DJ. Exercise protects the cardiovascular system: effects beyond traditional risk factors. *J Physiol.* 2009 December 1; 587(Pt 23):5551–5558.
- Kelly FJ. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occup Environ Med* 2003; 60:612-616.
- Kondo K, Hirano R, Matsumoto A, Igarashi O, Itakura H. Inhibition of LDL oxidation by cocoa. *Lancet* 1996; 348:1514.
- Kriško A, Kveder M, Pifat G. Effect of caffeine on oxidation susceptibility of human plasma low density lipoproteins. *Clinica Chimica Acta* 2005 May; Vol.355(1–2):47–53.
- Lee C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clinica Chimica Acta* 2000; 295:141–154.
- Lim S, Won H, Kim Y, Jang M, Jyothi KR, Kim Y, Dandona P, Ha J, Kim SS. Antioxidant enzymes induced by repeated intake of excess energy in the form of high-fat, high-carbohydrate meals are not sufficient to block oxidative stress in healthy lean individuals. *British Journal of Nutrition* 2011; 106:1544–1551.
- Mohanty P, Hamouda W, Garg R, Aljada A, Ghanim H, Dandona P. Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2970-2973.
- Nehlig A. Coffee, tea, chocolate, and the brain. Edited by Astrid Nehling. CRC Press, 2004.
- Nikolic J, Bjelakovic G, Stojanovic I. Effect of caffeine on metabolism of L-arginine in the brain. *Mol Cell Biochem.* 2003 Feb; 244(1-2):125-8.
- Pasaoglu H, Ofluoglu Demir FE, Yilmaz Demirtas C, Hussein A, Pasaoglu OT. The effect of caffeine on oxidative stress in liver and heart tissues of rats. *Turk J Med Sci* 2011; 41(4): 665-671.
- Powledge TM. Nicotine as therapy. *PLoS Biol.* 2004 November; 2(11): e404.
- Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, Dietary and Postprandial Oxidative Stress. *J. Nutr.* 2005; 135:969–972.
- Van der Vaart H, Postma DS, Timens W, Ten Hacken NHT. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax* 2004; 59:713–721.
- Vineis P, Airoidi L, Veglia F, Olgiati L, Pastorelli R, Autrup H, Dunning A, Garte S, Gormally E, Hainaut P, Malaveille C, Matullo G, Peluso M, Overvad K, Tjonneland A, Clavel-Chapelon F, Boeing H, Krogh V, Palli D, Panico S, Tumino R, Bueno-De-Mesquita B, Peeters P, Berglund G, Hallmans G, Sarracci R, Riboli E. Environmental tobacco smoke and risk of respiratory cancer and chronic obstructive pulmonary disease in former smokers and never smokers in the EPIC prospective study. *BMJ* 2005; 330: 277.
- Wang JF, Schramm DD, Holt RR, et al. A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. *J Nutr* 2000; 130:2115S–9S.
- Yang W, Omaye ST. Air pollutants, oxidative stress and human health. *Mutation Research/Genetic*

Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2009 March; Vol 674, Issues 1–2:45–54.

Zeidán-Chuliá F, Gelain DP, Kolling EA, Rybarczyk-Filho JL, Ambrosi P, Terra SR, Pires AS, Teixeira da Rocha JB, Behr GA, Moreira JCF. Major components of energy drinks (caffeine, taurine and guarana) exert cytotoxic effects on human neuronal SH-SY5Y cells by decreasing reactive oxygen species production. *Oxid Med Cell Longev*. 2013: 791-795.

ÚLOHA OXIDAČNÉHO STRESU PRI VZNIKU A ROZVOJI VYBRANÝCH OCHORENÍ

Ľudský organizmus je denne konfrontovaný s veľkým množstvom voľných radikálov, ktoré sa dostávajú do organizmu z vonkajšieho prostredia, alebo vznikajú pri metabolických reakciách zabezpečujúcich základné fyziologické funkcie. Úlohou antioxidantných systémov je zabezpečiť elimináciu voľných radikálov v takej miere, aby bola dosiahnutá pôvodná oxidačno-redukčná rovnováha, ktorú pre eukaryotické bunky charakterizuje mierny stav redukcie. Isté množstvo voľných radikálov je však v organizme potrebné - nielenže ich účasť je nutná v rôznych biochemických procesoch (imunitný systém, signálna transdukcia, vazokonstrikcia, génová expresia,...), ale podieľajú sa aj na udržiavaní oxidačno-redukčnej rovnováhy s cieľom zachovať bazálnu aktivitu systémov antioxidantnej obrany. A pretože kyslík nie je rovnomerne distribuovaný vo všetkých tkanivách a bunkách, na niektorých miestach vzniká užitočný, fyziologický oxidačný stres. Pri súčasnom životnom štýle ľudí v rozvinutých krajinách (pohyb na miestach s vysokou hustotou dopravy, konzumácia nezdravej stravy, radiačné zaťaženie,...) je však oxidačné zaťaženie natolko vysoké, že rastie aj pravdepodobnosť rozvoja nežiaduceho, patologického OS.

Pozitívne a negatívne účinky voľných radikálov sú teda vymedzené hranicou ich koncentrácie, ktorá sa stanovuje nepriamo, markermi oxidačného poškodenia makromolekúl. Výskumy v ostatných rokoch ukázali, že v podstate väčšina ochorení je sprevádzaná vzostupom vybraných markerov OS, čo podnietilo diskusie o úlohe OS v patogenéze a progresii narastajúceho počtu ochorení. Je známe, že pri OS voľné radikály poškodzujú biomakromolekuly, ktoré tak nie sú schopné zabezpečiť biologické procesy, na ktorých sa podieľajú. Na základe týchto výsledkov vychádzajúcich prevažne z experimentálneho výskumu sa uskutočnili klinické štúdie, v ktorých boli podávané antioxidanty s cieľom prevencie, alebo doplnkovej liečby sledovaných ochorení. Závery týchto klinických štúdií sú však väčšinou kontroverzné a len veľmi malá časť z nich poskytla jednoznačný dôkaz o tom, že OS je primárnym patogenetickým faktorom študovaného ochorenia. Za zmienku stojí fakt, že doposiaľ sa nepodarilo vyliečiť ani jedno ochorenie výlučne s použitím antioxidantnej terapie a z výsledkov klinických štúdií skôr vyplýva, že úloha OS sa pri väčšine ochorení preceňuje. Ako možné dôvody sa uvádzajú „falošne pozitívne dôkazy“ stanovenia markerov OS, nedostatočné vedomosti o molekulárnych mechanizmoch OS v jednotlivých tkanivách a OS vyvolaný farmakoterapiou. V neposlednom rade netreba zabúdať na to, že dodnes nie sú k dispozícii ani uspokojivé metodiky pre stanovenie OS. Preto kauzalita medzi OS ako patogenetickým činiteľom a konkrétnym patologickým stavom bola dokázaná len pri veľmi malom počte ochorení. Medzi tieto patria:

1. **Chronický nedostatok vitamínov alebo minerálov v potrave.** Tento stav môže byť spôsobený napríklad podvýživou alebo poruchami vstrebávania tukov v čreve, čo znemožňuje aj vstrebávanie v tukoch rozpustných vitamínov.
2. **Narušená homeostáza iónov kovov** - ich kumulácia v organizme podporuje oxidačné reakcie (Wilsonova choroba – kumulácia medi, talasémia – kumulácia železa).
3. **Zvýšená oxidačná záťaž spôsobená voľnými radikálmi v životnom prostredí** (znečistené ovzdu-

šie, žiarenie (radiačné, UV),...).

Pri ochoreniach, u ktorých sa zatiaľ len uvažuje o možnosti, že OS hrá kľúčovú úlohu v ich patogenéze, musia byť najskôr identifikované mechanizmy, ktorými voľné radikály spúšťajú príslušné ochorenia. To je veľmi komplikovaná úloha, pretože o OS ako primárnom patogenetickom činiteľovi sa uvažuje najčastejšie u takých ochorení, pri ktorých dochádza k sekundárnej produkcii voľných radikálov s centrálnym postavením v progresii ochorenia. A tak nastáva cyklus, v ktorom voľné radikály podnecujú patologické mechanizmy s výslednou produkciou ďalších voľných radikálov. V ostatných rokoch aj napriek tomu enormne stúplo množstvo relevantných dôkazov o kľúčovej úlohe OS v patogenéze veľkého množstva ochorení. Podnetom pre takýto výskum bolo zavedenie presnejších metodík stanovenia biomarkerov OS, spolu s potrebou nových terapeutických prístupov, a to najmä u ochorení s neznámou etiopatogenézou a doposiaľ len symptomatickou liečbou.

V nasledujúcej časti textu sú popísané najznámejšie ochorenia, ktoré úzko súvisia s OS. U mnohých z nich už boli popísané na molekulárnej úrovni aj konkrétne mechanizmy, ktorými voľné radikály prispievajú k vzniku týchto ochorení.

6.1 OXIDAČNÝ STRES AKO RIZIKOVÝ FAKTOR METABOLICKÉHO SYNDRÓMU

Súbor nezávislých kardiometabolických rizikových faktorov, ktoré zvyšujú pravdepodobnosť rozvoja aterosklerotického kardiovaskulárneho ochorenia, sa označuje ako metabolický syndróm (MSy). Kardiovaskulárne ochorenia sú hlavnou príčinou smrti v USA, Európe, krajinách Blízkeho východu, Indii a Singapure a postupne preberajú prvenstvo v rebríčkoch úmrtnosti aj v ďalších častiach sveta. Je známe, že na rozvoji aterosklerózy sa voľné radikály podieľajú oxidáciou lipidov (najmä LDL častíc) v bunkách cievneho endotelu a v makrofágoch pri vzniku penových buniek už v úvodných fázach aterosklerózy (3.6 Paraoxonázy). Druhy voľných radikálov, ktoré oxidujú LDL častice, nie je možné presne definovať. Rôzne štúdie uvádzajú, že na oxidácii LDL častíc sa zúčastňujú voľné radikály kyslíka, dusíka a chlóru. Oxidáciu LDL častíc podporujú tiež zvýšené koncentrácie iónov kovov (železo, meď,...), tak ako aj nárast aktivity lipoxygenáz, ktoré oxidujú mastné kyseliny za vzniku hydroperoxidov. Oxidované LDL častice majú chemotaktický účinok na T-bunky a monocyty, pôsobia ako mitogény cievnych svalových buniek a makrofágov a zvyšujú produkciu adhézných molekúl v svalových bunkách ciev. Makrofágy vycytávajú oxidované LDL častice, ktoré rozpoznávajú pomocou špecifických receptorov. Pohltie oxidovaných LDL častíc v makrofágoch u nich stimuluje kumuláciu esterov cholesterolu a premenu na penové bunky. Tieto produkujú prozápalové cytokíny a lipoxygenázy, ktoré ďalej prispievajú k rozvoju OS. Makrofágy pri oxidačnom preťažení podliehajú apoptóze a tvoria nekrotické centrum aterosklerotického plaku. V ďalších fázach aterosklerózy vznikajú fibrózne plaky, ktoré tvoria z väčšej časti bunky hladkých svalov a spojivové tkanivo (kolagén, elastín, proteoglykány). Nakoniec dochádza v plakoch k ich kalcifikácii, nekróze buniek, prípadne k ich ruptúre. Lúmen ciev v mieste aterosklerotického ložiska sa postupne zužuje a hrozí až úplné upchatie cievy vytvorením trombu.

Prevenia ochorení MSy je základným predpokladom pre zníženie výskytu kardiovaskulárnych ochorení. V súčasnosti však prevalencia MSy dosiahla v USA a Európe cca 20-30% a má stúpajúcu tendenciu. Vo všeobecnosti výskyt MSy stúpa s vekom, ale v ostatných rokoch ním stále častejšie trpia aj mladiství a deti. Napriek tomu, že nie sú stanovené jednoznačné kritéria pre diagnostiku MSy, tento syndróm sa definuje na základe obezity, inzulínovej rezistencie alebo diabetes mellitus 2. typu, dyslipidémie (zvýšené hladiny triacylglycerolov a LDL cholesterolu a znížené hladiny HDL cholesterolu) a hypertenzie. S MSy sa spája aj zápal a zvýšená zrážanlivosť krvi. Spoločným sprievodným znakom všetkých ochorení MSy je zvýšený OS. Pre pacientov s MSy sú charakteristické znížené hladiny vitamínu C a α -tokoferolu, znížená aktivita SOD, zvýšená peroxidácia lipidov, zvýšená aktivita xantín oxidázy a zvýšená tvorba proteínových karbonylov. Akú úlohu zohráva OS vznikajúci následkom jed-

notlivých rizikových faktorov MSy pri rozvoji aterosklerotických kardiovaskulárnych ochorení nie je dodnes celkom jasné. Krátke zhrnutie výsledkov štúdií, ktoré sa zaoberali touto témou je popísané v nasledujúcom texte.

6.1.1 OXIDAČNÝ STRES A DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus (DM) sprevádza zvýšená produkcia voľných radikálov, no úloha OS pri vzniku ochorenia je diskutabilná. Pre diabetických pacientov je typické zvýšenie peroxidovaných lipidov a F_2 izoprostánov v plazme, oxidovaných DNA báz v leukocytoch a 8-hydroxydeoxyguanozínu v moči. V plazme boli tiež zaznamenané znížené koncentrácie vitamínu C. Existuje viacero hypotéz, ktoré vysvetľujú mechanizmy zvýšenej produkcie voľných radikálov v DM:

1. Zvýšené hladiny lipidov v plazme zvyšujú pravdepodobnosť ich oxidácie.
2. Nadbytok glukózy vyúsťuje do zvýšenej produkcie NADH spojenej s preťažením dýchacieho reťazca, čím dochádza k zvýšenému úniku elektrónov pri ich transporte v membráne mitochondrií.
3. K zvýšeným hladinám NADH a úniku elektrónov prispieva aj oxidácia nadmerného množstva mastných kyselín v mitochondriách.
4. Stimulácia proteínkinázy C vedie k aktivácii endotelálnej NADPH oxidázy.
5. Produkciu voľných radikálov podporuje aj zvýšená aktivita cytosolovej laktát dehydrogenázy.

Typickým markerom hyperglykémie pri DM sú vysoké hladiny glykovaného hemoglobínu. Glykácia proteínov prebieha za fyziologických podmienok aj spontánne otvorením cyklu glukózy a prechodom do lineárneho aldehydu. Pri zvýšení koncentrácie glukózy v plazme rastie súčasne podiel jej aldehydovej formy a glykácia postihuje väčšie množstvo proteínov, čím ich často vyraduje z funkcie. Glykovaný je napríklad aj enzým CuZnSOD v erytrocytoch, či enzýmy dýchacieho reťazca v mitochondriách. Narušenie enzýmových funkcií antioxidantných enzýmov prispieva k ďalšiemu zvýšeniu hladín voľných radikálov. Glykované molekuly navyše ľahšie podliehajú oxidácii za vzniku koncových produktov pokročilej glykácie. Glykácia apolipoproteínu B a lipidov v LDL časticách preto urýchľuje ich oxidáciu. U pacientov s DM sa koncové produkty pokročilej glykácie nachádzajú vo vysokej koncentrácii takmer vo všetkých tkanivách. Alternatívnou cestou tvorby koncových produktov pokročilej glykácie je priama oxidácia glukózy, pričom vzniká peroxid vodíka, hydroxylový a superoxidový radikál spolu s toxickými karbonylmi, ktoré potom ďalej reagujú s inými biomolekulami.

Vo viacerých štúdiách boli hodnotené účinky antioxidantov u pacientov s DM. Kým podávanie α -tokoferolu nemalo žiaden pozitívny účinok, kyselina α -lipoová zlepšila funkcie cievneho endotelu. Kyselina α -lipoová ale zároveň neredukovala hladiny voľných radikálov. Predpokladá sa teda, že jej účinok je založený na inom než antioxidantnom mechanizme. Zaujímavé, ale prekvapujúce výsledky priniesli štúdie, v ktorých pacientom s DM podávali vitamín C. Napriek tomu, že jeho hladiny sú pri DM dlhodobo znížené, v skupine pacientov, ktorá dostávala vitamín C, boli zaznamenané častejšie komplikácie DM. Dôvodom takéhoto výsledku sú pravdepodobne glykačné účinky vitamínu C.

Nakoľko produkcia voľných radikálov pri DM je spojená najmä s hyperglykémiou, najlepším spôsobom ako bojovať s OS je obmedziť príjem glukózy v strave.

6.1.2 OXIDAČNÝ STRES A OBEZITA

Obezita je ústredným komponentom pre rozvoj MSy, pretože môže viesť k rozvoju všetkých ostatných rizikových faktorov MSy a zároveň podporuje rozvoj OS. Bolo dokázané, že množstvo podkožného tuku a obvod pásu pozitívne korelujú s endotelálnou dysfunkciou vyvolanou OS, aktivitou CAT, hladinami 8-isoPGF 2α , oxidovanými LDL časticami, TBARS a ďalšími markermi OS. Pri MSy dokonca hladiny 8-isoPGF 2α vykazujú najvyšší stupeň korelácie s množstvom viscerálneho tuku. Pri znížení

telesnej hmotnosti pacientov s MSy o 10 % pomocou redukčnej diéty a aeróbného cvičenia bol zaznamenaný pokles OS. Zaujímavé je, že v inej štúdií, v ktorej obéznych pacientov podrobili diéte a pravidelnej športovej aktivite, bol tiež zaznamenaný pokles markerov OS, a to ešte predtým, než dosiahli významný úbytok hmotnosti. Pokles OS mohol byť teda v oboch prípadoch spôsobený zlepšením endotelových funkcií, vzostupom $\cdot\text{NO}$, alebo zvýšením antioxidantnej obrany, ku ktorým dochádza na základe úpravy stravy a cvičenia.

Jeden z mechanizmov, ktoré by u obéznych ľudí mohli spôsobovať dodatočné oxidačné zaťaženie, je zvýšená produkcia prozápalových cytokínov vo viscerálnom tukovom tkanive. V experimentoch na obéznych myšiach sa podarilo produkciu voľných radikálov v tukovom tkanive zredukovať aj bez zníženia tukových zásob inhibíciou NAD(P)H oxidázy. Jej inhibícia sa prejavila nielen zníženou produkciou voľných radikálov, ale aj zlepšením metabolizmu glukózy a lipidov.

6.1.3 OXIDAČNÝ STRES A DYSLIPIDÉMIE

Typickým obrazom dyslipidemií u pacientov s MSy sú zvýšené hladiny triacylglycerolov a LDL častíc, kým protektívne HDL častice sú zastúpené v menšom množstve než u zdravých jedincov. Súčasne bola u ľudí aj zvierat popísaná korelácia medzi vyššie uvedenými zmenami hladín lipidových parametrov a OS. Napríklad u geneticky modifikovaných myší s chýbajúcim LDL receptorom sa podávanie stravy bohatej na cholesterol odzrkadlilo vo zvýšených hladinách LDL častíc, pričom sa následne vyvinul aj OS, ktorý priamo vzniká v dôsledku oxidácie LDL.

6.1.4 OXIDAČNÝ STRES A HYPERTENZIA

Vyvážená oxidačno-redukčná rovnováha je jedným z fyziologických regulátorov krvného tlaku. Antioxidanty poskytujú ochranu pred vaskulárnym OS neutralizáciou voľných radikálov, pričom dôležité je zachovať potrebné koncentrácie $\cdot\text{NO}$, ktorý nielen zabezpečuje vazodilatáciu, ale má protektívny účinok aj na ďalšie funkcie ciev. Úloha OS pri hypertenzii bola študovaná viacerými výskumnými skupinami, no jednoznačné závery stále chýbajú. Kým v jednej štúdií neboli zistené rozdiely v markeroch OS medzi normotenznou a hypertenznou skupinou, iné výskumy zvýšenie OS stresu u hypertenzných subjektov dokázali. Podávanie antioxidantov však v dvoch štúdiách (vitamín C a α -tokoferol) viedlo k zníženiu krvného tlaku, tuhosti artérií a zlepšeniu endotelových funkcií. Hypertenzia je multifaktoriálne ochorenie s pomerne širokým spektrom etiologických komponentov. Ukázalo sa, že zvýšenie OS pri sekundárnej hypertenzii pravdepodobne súvisí aj s jej dominantným etiologickým komponentom (ktorý je u každého pacienta individuálny), čo by vysvetľovalo nekonzistentné výsledky nezávislých štúdií.

6.2 AUTOIMUNITNÉ OCHORENIA A OS

Spoločným znakom všetkých autoimunitných ochorení (AO) je intolerancia imunitného systému (IS) voči proteínom vlastného organizmu. Mechanizmus vzniku AO je neznámy a ako o možných príčinách zmeny aktivity IS sa uvažuje predovšetkým o genetických predispozíciách, zvýšenej aktivite B-lymfocytov a skríženej reaktivite medzi cudzími a vlastnými antigénmi. Spúšťačom produkcie cudzích antigénov vo vlastnom organizme môže byť mnoho faktorov, medzi nimi infekcie, zápal, či užívanie niektorých liekov. Jedna z hypotéz považuje za primárnu príčinu vzniku AO modifikáciu vlastných antigénov organizmu voľnými radikálmi, ktoré IS následne nedokáže rozpoznať a snaží sa ich zneškodniť. Preto reakcie voľných radikálov, ktoré vedú k poškodeniu mnohých proteínov tvorbou stabilných produktov (napríklad 3-chlórtyrozín, alebo 3-nitrotyrozín), ovplyvňujú nielen ich biologické funkcie (blokádou fosforylácie tyrozínu), ale zároveň menia aj ich antigénny profil, čím veľmi významne narušujú imunitnú odpoveď. Či je možné OS ako taký považovať vo všeobecnosti za primárnu príčinu AO nie je zatiaľ jasné, ale je to málo pravdepodobné, keďže každé AO má svoje špecifiká. Nakoľko pri všetkých AO je stimulovaný IS a zápalová odpoveď, sú sprevádzané zvýšenými hladinami

voľných radikálov, čo komplikuje overenie vyššie uvedenej hypotézy. V ostatných rokoch sa však voľným radikálom venuje veľká pozornosť v súvislosti s tvorbou autoimunitných protilátok. Jednotlivé AO sú sprevádzané výskytom charakteristických protilátok, ktoré zároveň umožňujú ich diagnostiku. Antigény, proti ktorým sa tieto protilátky tvoria, sú priamo spojené s patogenézou len u niektorých AO, kým u iných ostáva ich vzťah k AO nejasný. U chronických zápalových AO, ako je reumatoidná artritída (RA), alebo systémový lupus erythematosus (SLE), sa v tkanivách typicky ukladajú komplexy DNA s anti-DNA protilátkami, ktoré stimulujú zápal, infiltráciu fagocytov do tkaniva a opätovnú produkciu voľných radikálov týmito bunkami. Anti-DNA protilátky u pacientov so SLE sa viažu na DNA poškodenú voľnými radikálmi s oveľa vyššou afinitou, než na intaktnú DNA. Ukázalo sa, že voľnými radikálmi experimentálne modifikovaná DNA je vysoko imunogénna a indukuje tvorbu protilátok, ktoré sa viažu s rôznou afinitou aj na intaktnú DNA. Vysoké hladiny markerov oxidačného poškodenia DNA (8-oxodG) u jedincov so SLE preto podporujú domnienky o zapojení sa OS do etiológie tohto ochorenia.

6.2.1 REUMATOIDNÁ ARTRITÍDA

Reumatoidná artritída je autoimunitné chronické polyartikulárne zápalové ochorenie, ktorého typický klinický obraz sa vyznačuje stuhnutosťou a opuchmi kĺbov s ich postupnou deformáciou a stratou funkcie. RA je sprevádzaná zvýšeným oxidačným statusom, ktorý sa prejavuje vzostupom aktivity oxidačných enzýmov a poklesom hladín antioxidantov v sére aj synoviálnej tekutine. U pacientov s RA potvrdili viaceré štúdie výskyt oxidačne poškodenej DNA a jej reparačných systémov, čo vedie k vzniku mnohých mutácií. Zvýšené hladiny markerov oxidačného poškodenia DNA, predovšetkým 8-oxo-7-hydro-deoxyguanozínu, boli zaznamenané v leukocytoch a sére. Pre vznik RA by mohla byť kľúčová mutácia génu, ktorý zodpovedá za expresiu p53 tumor supresorového proteínu. Tento proteín ovplyvňuje reparácie DNA prostredníctvom rast regulujúcich génov, inhibíciou G1 fázy bunkového cyklu, interakciou s DNA reparačnými mechanizmami a zásahom do apoptózy. V plazme a synoviálnej tekutine pacientov s RA boli zaznamenané aj zvýšené extracelulárne hladiny mitochondriálnej DNA. Experimenty na myšiach ukázali, že oxidovaná mitochondriálna DNA dokáže vyvolať u zvierat artritídu, potenciálne ide teda o molekulu, ktorá by mohla priamo spájať negatívne účinky voľných radikálov s patogenézou RA. Mitochondriálna DNA je veľmi citlivá na oxidáciu, pričom na rozdiel od jadra majú mitochondrie k dispozícii len niekoľko DNA reparačných systémov. Aj malé množstvá voľných radikálov teda ľahko vyvolávajú oxidácie mitochondriálnej DNA, čo vedie k strate jej funkcie, zastaveniu rastu bunky a apoptóze.

Vo zvýšenej miere podliehajú oxidácii pri RA aj mastné kyseliny, ktoré pochádzajú zo systémovej lipolýzy stimulovanej kontinuálnou produkciou prozápalových cytokínov. Oxidácia lipidov je zároveň rizikovým faktorom pre rozvoj pridruženej aterosklerózy u RA pacientov. Voľné radikály v synovii oxidujú LDL častice, čím je potencovaná lokálna zápalová odpoveď a infiltrácia adhézných molekúl a chemokínov. Monocyty pohlcujúce oxidované LDL častice sa menia na penové bunky, ktoré sa ukladajú priamo v synovii, kde z nich vznikajú aterosklerotické plaky. Ukázalo sa, že stupeň peroxidácie lipidov koreluje aj s degradáciou extracelulárneho matrixu synoviálneho tkaniva stimulovanými metaloproteázami. Podávanie vitamínu E dokázalo tento proces potlačiť.

Dôležitý podiel voľných radikálov na deštrukcii kĺbov deklarujú v synoviálnom tkanive markery oxidačne poškodených foriem kyseliny hyalurónovej, lipidov a LDL častíc, ako aj veľké množstvá karbonylov pochádzajúcich z oxidácie proteínov. Ukázalo sa, že OS ovplyvňuje syntézu, ale aj rozklad spojivového tkaniva kĺbov (chrupky). Voľné radikály pôsobia inhibične v procesoch syntézy zložiek synoviálneho tkaniva, vrátane kolagénu, proteoglykánov a chondrocytov. Rozklad komponentov chrupky je vyvolaný buď priamou oxidáciou makromolekúl, alebo nepriamymi mechanizmami. Jedným z nich je degradácia extracelulárnej matrixu prostredníctvom aktivácie metaloproteáz, čím sa narušuje funkcia chondrocytov a podporuje ich apoptóza.

Tak ako u iných zápalových ochorení, aj u RA je pozorovateľná korelácia medzi intenzitou systémovej

zápalovej odpovede a tvorbou glyoxylovaných imunoglobulínov, ktoré patria medzi koncové produkty pokročilej glykácie. Výlučne u pacientov s RA však boli detegované aj protilátky proti glyoxylovaným imunoglobulínom, čo podporuje úvahy o účasti OS v etiopatogenéze tohto ochorenia. Ďalšia z teórií vzniku RA, týkajúca sa OS, vychádza z výsledkov štúdií, podľa ktorých je synovitída, zápal synoviálneho tkaniva, založený na cyklicky sa opakujúcej hypoxii a reoxidácii. Synoviálna tekutina sa vyznačuje kyslým pH, hypoxiou, nízkymi hladinami glukózy a vysokými hladinami laktátu, čo poukazuje na prevládajúci anaeróbný typ metabolizmu. Nízke hladiny kyslíka priamo namerané v synoviálnom tkanive potvrdili, že pri synovitíde je chronická hypoxia kompenzovaná anaeróbnym metabolizmom. Je známe, že v anaeróbných podmienkach dochádza v rámci adaptácie metabolických dejov k aktivácii rôznych génov, pričom kľúčovú úlohu pri expresii týchto génov má transkripčný faktor HIF-1 α (hypoxiou indukovaný faktor 1 α). Týmto mechanizmom sa bunkám umožňuje získavanie energie z anaeróbného metabolizmu, stimulujú sa alternatívne cesty príjmu kyslíka (napr. angiogenéza) a inhibuje sa apoptóza. Niektoré štúdie sa zaoberali vplyvom OS na HIF-1 α , ale ich výsledky sú protichodné. Podľa jednej z hypotéz voľné radikály produkované NADPH oxidázou riadia funkciu HIF-1 α tým, že inhibujú jeho aktiváciu. Preto v stave hypoxie, keď je produkcia voľných radikálov nízka, je HIF-1 α aktivovaný. Podľa inej hypotézy je však úlohou voľných radikálov produkovaných v mitochondriách aj v stave hypoxie stabilizovať HIF-1 α a podporovať expresiu génov, ktoré riadi. Obe hypotézy sú podporené výsledkami experimentov a nevyklučuje sa, že rozdiely v regulácii HIF-1 α voľnými radikálmi vyplývajú z intenzity a dĺžky hypoxie, ako aj typu buniek, v ktorých k hypoxii dochádza.

Zo záverov epidemiologických štúdií vyplýva, že medzi príjmom antioxidantov v diéte a výskytom RA existuje inverzná korelácia. Tak ako u iných ochorení, aj pri RA deklarujú mnohé štúdie pozitívne účinky podávania rôznych antioxidantov. Napríklad polyfenoly obsiahnuté v zelenom čaji s vysokým obsahom epigalokatechín-3-galátu dokázali zabrániť experimentálne vyvolanej artritíde. Uvedený katechín inhiboval zápalové reakcie sprostredkované IL-1 β , vrátane produkcie \cdot NO v chondrocytoch. V štúdiách, kde boli pacientom podávané vitamíny A, E a C boli síce zaznamenané zvýšené množstvá antioxidantov v plazme a pokles markerov OS, no nedošlo k zlepšeniu klinického stavu RA.

6.2.2 SYSTÉMOVÝ LUPUS ERYTHEMATOSUS

Systémový lupus erythematosus je multifaktoriálne autoimunitné ochorenie, ktoré sa vyskytuje prevažne u žien (70-90%). Klinické prejavy SLE zahŕňajú opuchy a bolesti kĺbov, únavu, vypadávanie vlasov, citlivosť na slnečné žiarenie, opuchy lymfatických uzlín a typické vyrážky v tvare motýľa na tvári. Pri ťažších formách ochorenia zasahuje SLE aj iné orgány, najmä srdce, pľúca, obličky a nervovú sústavu. Etiológia ochorenia je neznáma, doterajší výskum predpokladá účasť genetických, hormonálnych a enviromentálnych faktorov, no molekulárne mechanizmy spojené so vznikom SLE sú známe len z malej časti. V uplynulých rokoch sa v patogenéze SLE stále častejšie zvažovala úloha voľných radikálov, k čomu viedli poznatky o zvýšenom OS u pacientov so SLE. Výsledky viacerých štúdií, v ktorých bola u zvierat inhibovaná aktivita induktibilnej \cdot NO syntázy, sa zhodujú, že aktivita tohto enzýmu zohráva úlohu v patogenéze AO. U SLE koreluje postupne narastajúca aktivita induktibilnej NO syntázy a \cdot NO s progresiou ochorenia. \cdot NO vytvára v prítomnosti superoxidového radikálu peroxynitrit, silné nitračné činidlo, ktoré modifikuje proteíny a mení ich antigénne vlastnosti, čo vedie k stimulácii autoimunitných reakcií. Pre pacientov so SLE sú tiež typické vysoké hladiny protilátok proti imunogénnym aduktom proteínov s aldehydmi, ktoré vznikajú oxidáciu lipidov. Zvýšený výskyt týchto protilátok naznačuje, že zvýšená peroxidácia lipidov má priamy vzťah k patogenéze alebo progresii SLE.

6.2.3 CROHNOVA CHOROBA

Crohnova choroba (CD) je chronické zápalové ochorenie, ktoré sa vyznačuje opakovanými ulceráciami vo všetkých častiach gastrointestinálneho traktu. Klinicky sa CD prejavuje diareou, zvýšenou teplotou, stratou hmotnosti a bolesťami brucha v príslušnej oblasti. Počas CD dochádza v gastrointestinálnom trakte ku kaskáde imunologických reakcií, ktoré sú stimulované uvoľnením prozápalo-

vách cytokínov v postihnutom mieste. Imunitný systém odpovedá na signalizovaný zápal aktiváciou T-buniek a infiltráciou zápalových neutrofilov do mukóznej vrstvy čreva. Neutrofilý produkujú veľké množstvo voľných radikálov, ktorých vysoká lokálna koncentrácia poškodzuje bunky črevnej mukózy. Neustála produkcia voľných radikálov v čreve vedie k vyčerpaniu zásob antioxidantných enzýmov, ako aj nízkomolekulových antioxidantov, čo potvrdili štúdie u pacientov s CD na lokálnej (črevná mukóza), ale aj systémovej úrovni. Postupne sa tak u pacientov s CD vyvíja OS. Kým voľné radikály jednoznačne podporujú progresiu CD, ich účasť na vzniku ochorenia je zatiaľ len hypotetická, pretože výsledky štúdií sú v tomto smere kontroverzné.

6.2.4 CELIAKIA

Permanentná intolerancia gluténu charakterizuje celiakiu, chronické autoimunitné zápalové ochorenie čreva, u ktorého bola preukázaná aj genetická predispozícia. Glutén je zmes zásobných proteínov prítomných v potravinách vyrábaných z pšenice. Imunogénnou zložkou gluténu je gliadín, v ktorého štruktúre na nachádzajú špecifické sekvencie zodpovedné za imunomodulačné alebo cytotoxické účinky. Vysoké percentá prolínu a glutamínu v primárnej štruktúre gliadínu sú dôvodom, prečo proteázy v čreve nedokážu gliadín rozložiť až na jednotlivé aminokyseliny. Oligopeptidy, ktoré pri rozklade gliadínu vznikajú, môžu pôsobiť u jedincov s genetickou predispozíciou toxicky, pričom väčšina z ich účinkov je sprostredkovaná stimuláciou tvorby voľných radikálov a zvýšeným OS. Následkom týchto zmien sa narušuje permeabilita epitelovej bariéry enterocytov a oligopeptidy gliadínu prenikajú do buniek. Oligopeptidy s imunomodulačnými účinkami sa viažu na antigén prezentujúce bunky, čo stimuluje imunitnú odpoveď.

V experimentoch s bunkovými kultúrami gliadín stimuloval oxidáciu lipidov a glutatiónu, kým naopak množstvo voľných tiolových skupín v bunkách kleslo. Na molekulárnej úrovni gliadíny spúšťajú OS aktiváciou cyklooxygenázy, NO syntázy a zvýšením expresie transkripčného faktora NF- κ B, ktorý stimuluje transkripciu prozápalových cytokínov.

Pôvod OS je teda pri celiakii spätý s cytotoxickou a imunomodulačnou aktivitou rozkladových produktov gliadínu, ale jeho úloha v patogenéze ochorenia nie je zatiaľ potvrdená.

6.2.5 VITILIGO

Nedostatočná antioxidantná obrana a zvýšené hladiny voľných radikálov sú pravdepodobne súčasťou patologických mechanizmov autoimunitných kožných ochorení.

Vitiligo je strata pigmentácie kože, ktorá vzniká následkom selektívnej deštrukcie melanocytov. Progresia ochorenia je spojená s narušenou funkciou dýchacieho reťazca v mitochondriách, vývinom autoimunitných reakcií, ako aj vzostupom OS, ale jej jednoznačná etiopatogenéza nie je známa. Uvažuje sa, že vitiligo vzniká ako následok postupne narastajúceho OS v melanocytoch, čo je spôsobené pomalými mechanizmami obnovy melanocytov a ich kontinuálnym vystavením environmentálnemu stresu. Zvýšené riziko tvorby voľných radikálov v melanocytoch je dané aj biosyntézou melanínu, špecifickou pre tento typ buniek. Za istých okolností môže melanogenéza vyvolať silný OS a narušiť oxidačno-redukčnú rovnováhu. Je pozoruhodné, že podobné mechanizmy zlyhávania antioxidantnej obrany a akumulácia toxických produktov v prítomnosti neuromelanínu sa skúmajú ako potenciálne patogenetické faktory Parkinsonovej choroby a ďalších neurodegeneratívnych ochorení. Napriek tomu, že v melanocytoch dochádza k neustálej produkcii voľných radikálov a na génovej úrovni je stimulovaná expresia antioxidantných enzýmov, hladiny ich proteínov ostávajú paradoxne nízke. Prehlbujúci OS vyvoláva zápal, preto je u pacientov s vitiligom v postihnutých léziách kože stimulovaná expresia prozápalových cytokínov TNF α a IL-1.

Nárast OS je pri vitiligo pozorovaný lokálne, kde sa v epidermálnej vrstve postihnutej časti kože akumuluje peroxid vodíka, ale aj na systémovej úrovni. Nedávno publikované výsledky klinickej štúdie

prvýkrát dokázali, že použitím enzýmu pseudokatalázy sa dá dosiahnuť úplná repigmentácia kože. Podobné výsledky sa dosiahli aj pri strate vlasového pigmentu, teda šedivejúcich vlasoch. Pseudokataláza je modifikovaná kataláza, ktorá rozkladá peroxid vodíka, je však aktivovaná UVB žiarením.

6.3 NEURODEGENERATÍVNE OCHORENIA A OXIDAČNÝ STRES

Centrálny nervový systém (CNS) človeka spotrebuje v pokojovom stave asi 20 % z celkového množstva kyslíka v organizme. Preto je CNS vysoko citlivý na nízke množstvá antioxidantov, vysoké koncentrácie polynenasýtených mastných kyselín a kovových iónov, teda faktory, ktoré podporujú tvorbu voľných radikálov a všeobecne oxidáciu. Nie je teda prekvapujúce, že OS je diskutovaný ako jeden z možných primárnych mechanizmov rozvoja neurodegeneratívnych a zápalových chorôb CNS.

Neurodegeneratívne ochorenia sú progresívne ochorenia charakterizované stratou určitých neuronových populácií a kumuláciou proteínových agregátov. Ich spoločným sprievodným znakom je tiež oxidačný stres, ktorý podporuje degeneratívne procesy. Z tohto poznatku sa odvíja množstvo experimentálnych a klinických štúdií, ktoré skúmajú mechanizmy neurodegenerácie vyvolanej voľnými radikálmi, ako aj možnosti využitia antioxidantov v terapii týchto ochorení.

Jedným z dominantných rizikových faktorov neurodegeneratívnych ochorení je narastajúci vek. So zvyšujúcim vekom zároveň stúpa množstvo kovových iónov (najmä medi a železa) v mozgu. Predpokladá sa, že kumulácia týchto kovov v mozgu pôsobí toxicky a vyvoláva neurodegeneratívne procesy. Pretože ióny kovov sú dobrými katalyzátormi reakcií, v ktorých vznikajú voľné radikály, výskum OS v patogenéze ochorení CNS má svoje opodstatnenie.

6.3.1 ALZHEIMEROVA CHOROBA

Alzheimerova choroba (AD) je progresívne neurodegeneratívne ochorenie, pri ktorom dochádza v mozgu k postupnému ubúdaniu cholinergických neurónov a synapsií. Charakteristickým znakom AD je strata kognitívnych funkcií, ktoré klesajú priamo úmerne so znižujúcim sa množstvom dostupného acetylcholínu. Príčina AD nie je dodnes známa, existuje niekoľko hypotéz, z ktorých však ani jedna nebola doposiaľ potvrdená. Jedno z možných vysvetlení vzniku AD je toxicita amyloidných plakov ktoré sa kumulujú v mozgu. Ich hlavnou zložkou je amyloidný- β -peptid ($A\beta$), ktorý vzniká štiepením membránového amyloidného prekursorového proteínu s doposiaľ neznámou funkciou. Toxicita amyloidných plakov by mohla spočívať v tom, že sa v nich hromadia veľké množstvá kovových iónov, predovšetkým zinku, medi a železa. *In vitro* bolo dokázané, že všetky tieto ióny vo zvýšených koncentráciách podporujú agregáciu $A\beta$ a tým aj tvorbu amyloidných plakov. Koncentrácia týchto iónov ako aj ich väzbových proteínov je v neurónoch AD pacientov 3-5-krát vyššia v porovnaní so zdravými ľuďmi. Práve vysoké koncentrácie iónov železa a medi naviazaných na $A\beta$ by mohli byť hlavnými generátormi voľných radikálov a OS, ktorý je príčinou deštrukcie neurónov. $A\beta$ sú schopné prostredníctvom troch histidínových reziduí koordinačne viazať meďnaté a železité ióny, pričom dochádza k redukcii oboch iónov a súčasnej oxidácii kyslíka za vzniku peroxidu vodíka. Redukované ióny medi a železa v blízkosti vznikajúceho peroxidu vodíka vytvárajú ďalej ideálne podmienky pre Fentonovu reakciu, ktorej výsledný produkt – hydroxylový radikál – je vysoko neurotoxický. Okrem histidínových reziduí bolo na $A\beta$ identifikovaných niekoľko ďalších miest s nižšou väzbovou afinitou pre ióny kovov, z ktorých minimálne jedno je redoxne aktívne a mohlo by prispievať k produkcii voľných radikálov.

Reakciou medzi meďnatými iónmi a $A\beta$ dochádza tiež k oxidácii síry na rezidue metionínu (Met35) a vytvoreniu krížovej väzby, čo vedie k vzniku solubilných oligomérov $A\beta$. Oxidačná modifikácia $A\beta$ zvyšuje ich solubilitu a podporuje ich uvoľňovanie z membrány. Tieto solubilné formy $A\beta$ korelujú u AD pacientov s pridruženou demenciou.

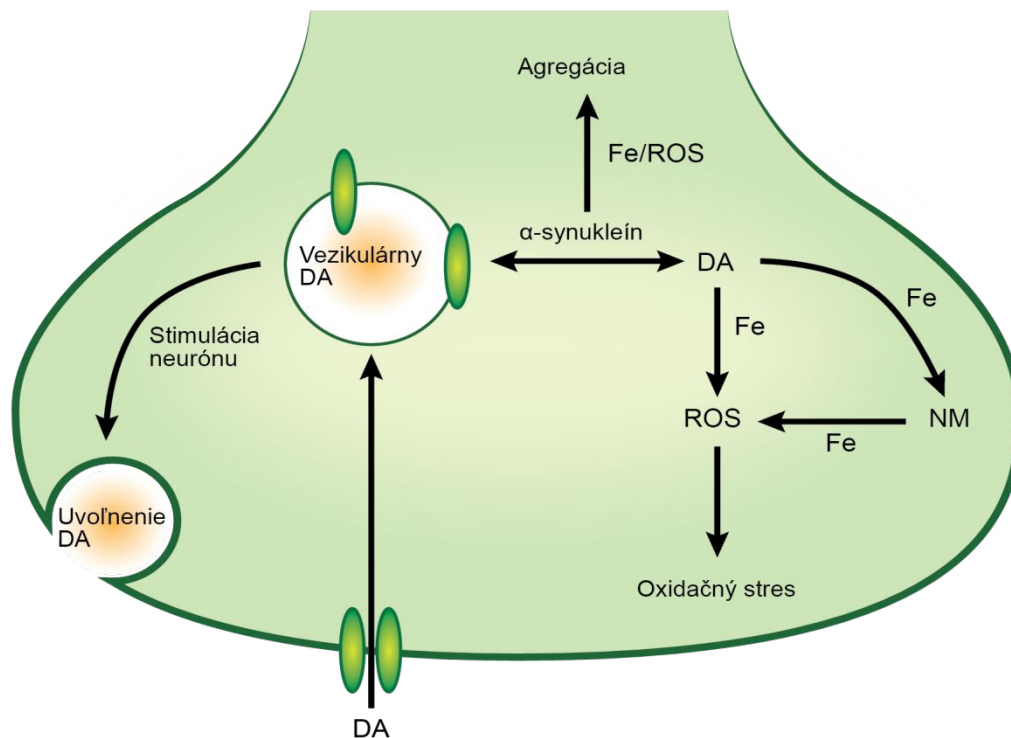
6.3.2 PARKINSONOVA CHOROBA

Parkinsonova choroba (PD) je progresívne neurodegeneratívne ochorenie, ktoré charakterizuje strata dopaminergných neurónov v *substantia nigra* a intracelulárna kumulácia Lewyho teliesok, ktorých hlavnou zložkou je proteín α -synukleín. Jednou z fyziologických úloh α -synukleínu je udržiavanie vysokého distribučného pomeru dopamínu medzi vezikulami a cytoplazmou neurónov. Genetická mutácia tohto proteínu je príčinou familiárne sa vyskytujúcej PD. Jej následkom dochádza k väzbe α -synukleínu na transportný proteín dopamínu v intracelulárnych vezikulách, čo zabraňuje vstúpiť dopamínu do vezikúl a pri nervovom vzruchu tak nemôže byť transportovaný do nervovej synapsy. Redoxne aktívny dopamín sa tak hromadí v cytoplazme a stáva sa ľahko prístupný pre chelatáciu kovových iónov. Pri ich prechode do koordinačnej väzby sa ióny kovov redukujú, súčasne dochádza k oxidácii kyslíka za vzniku peroxidu vodíka, ktorý podlieha Fentonovej reakcii. Touto cestou sa zvyšuje produkcia voľných radikálov, pričom s vekom sa zvyšujúce koncentrácie kovových iónov v mozgu uvedený proces urýchľujú. Zmutovaný α -synukleín na rozdiel od nezmutovanej formy tiež nedokáže inhibovať syntézu dopamínu a jeho koncentrácie v cytoplazme sa o to viac zvyšujú. Fyziologická úloha α -synukleínu nie je celkom známa, ale výsledky popísaných experimentov nasvedčujú, že tento proteín riadi metabolizmus a distribúciu dopamínu na viacerých úrovniach. Ukázalo sa, že u zdravých ľudí prítomnosť vysokej koncentrácie kovových iónov v cytoplazme neurónov podporuje agregáciu α -synukleínu, ktorý tak stráca svoju aktivitu a narušená homeostáza dopamínu môže smerovať až k vzniku PD.

U pacientov s PD bol v *substantia nigra* zaznamenaný aj úbytok buniek s tmavohnedým pigmentom neuromelanínom, u ktorého bolo popísaných niekoľko afinitných miest pre väzbu iónov železa. Množstvo neuromelanínu u zdravých ľudí stúpa s narastajúcim vekom, čo nasvedčuje tomu, že tento pigment má za úlohu viazať redoxne aktívne železo a ióny iných kovov, ktoré podporujú oxidačné reakcie. Ukázalo sa však, že antioxidantný účinok neuromelanínov zrejme závisí od množstva iónov kovov, ktoré viažu. Kým neuromelaníny s nízkym množstvom naviazaných iónov železa pôsobia anti-oxidačne, vysoké množstvá naviazaného železa v neuromelanínoch sú spájané s prooxidačnou aktivitou. Naviac, keď koncentrácie kovových iónov presiahnu väzbovú kapacitu neuromelanínu, pigment stráca aj svoju ochrannú antioxidantnú funkciu, dochádza k zvýšenej tvorbe voľných radikálov a vyvíja sa OS. Zvýšenie OS podporuje oxidačnú degradáciu neuromelanínu, uvoľňujú sa na ňom naviazané ióny kovov a neuromelanín sa stáva pre bunky v konečnom dôsledku cytotoxickým.

Neuromelanín je polymér s nie celkom jednoznačne charakterizovanou štruktúrou, ale je známe, že pozostáva z medziproduktov syntézy dopamínu. Ukázalo sa, že ak α -synukleín stráca svoju funkciu a dopamín sa kumuluje v cytoplazme, reakciou medzi týmto neurotransmitterom a iónmi železa dochádza aj k syntéze neuromelanínu. Predpokladá sa, že pri strate funkcie α -synukleínu sa bunky touto cestou bránia neurotoxickým účinkom dopamínu.

OS spojený s PD vyplýva teda z narušenia fyziologických funkcií α -synukleínu, dopamínu, a neuromelanínu v *substantia nigra*, ktoré zapríčiňuje najmä kumulácia kovových iónov.



Obrázok 21. Oxidačný stres pri Parkinsonovej chorobe

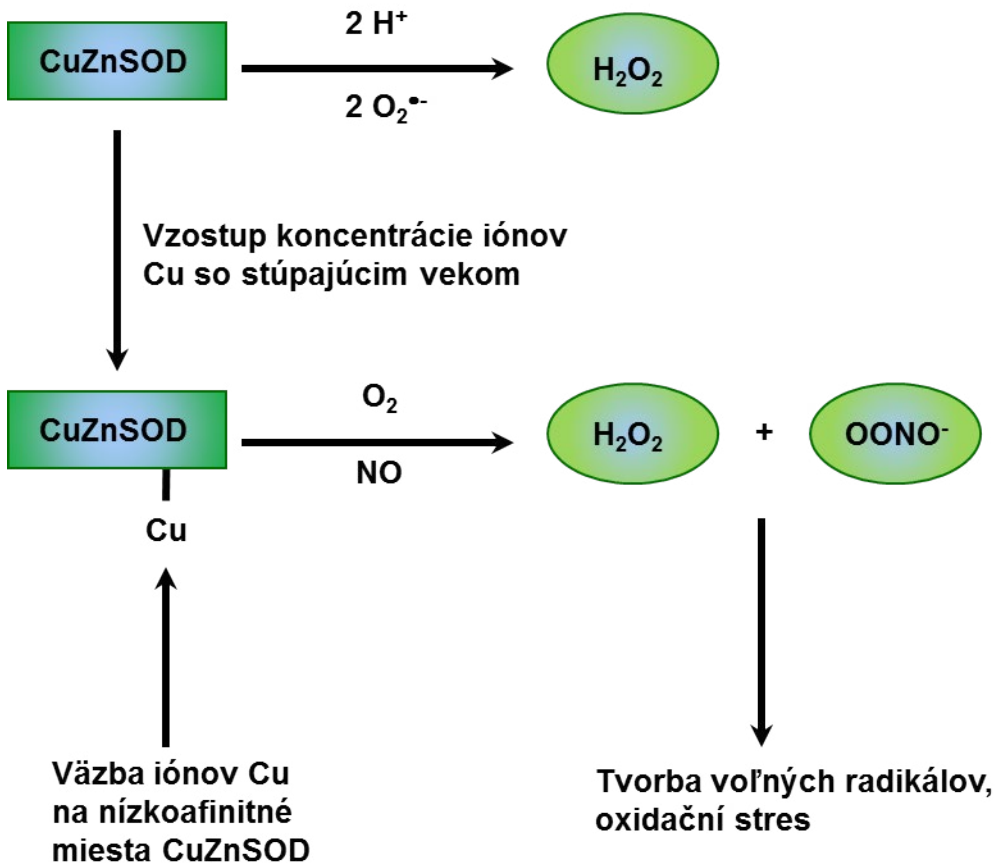
Neurotransmitter dopamín (DA) je skladovaný v nervových zakončeniach synáps vo vezikulách, kde nepodlieha redoxným reakciám. Po uvoľnení do cytoplazmy je dopamín schopný koordinačne viazať ióny kovov a podlieha redoxným reakciám, ktorých výsledkom je tvorba voľných radikálov a neuro-melanínu (NM). Tak ako DA, aj NM tiež viaže ióny kovov a jeho zvýšené koncentrácie zodpovedajú za zvýšenú produkciu voľných radikálov. Skladovanie dopamínu vo vezikulách nervových zakončení riadi proteín α -synukleín, ktorého mutácie zabraňujú vstupu DA do vezikúl, čím stúpa jeho podiel v cytoplazme. Mutácie α -synukleínu sú spojené tiež s tvorbou agregátov a stratou funkcie.

6.3.3 AMYOTROFICKÁ LATERÁLNA SKLERÓZA

Amyotrofická laterálna skleróza (ALS) je ochorenie vyplývajúce zo straty motorických neurónov v mieche a mozgovej kôre. Familiárna forma ALS je spojená s početnými mutáciami enzýmu CuZn-superoxid dismutázy (CuZnSOD), ktorého modifikované formy nadobúdajú toxické účinky. Toxicita zmutovaných enzýmov CuZnSOD nie je presne definovaná. Podľa niektorých hypotéz by mohla vyplývať zo zmenenej priestorovej štruktúry enzýmu s následnou tvorbou agregátov, alebo súvisí s nadobudnutím nových prooxidačných vlastností CuZnSOD, ktoré vedú k produkcii voľných radikálov. V experimentoch na bunkových kultúrach a myšiach dokázali chelátory iónov medi spomaliť priebeh ALS, avšak ďalšie experimenty vylúčili možnosť, že vznik ochorenia je spojený s kumuláciou medi, ktorá je viazaná v aktívnom centre enzýmu. Preto boli na CuZnSOD identifikované iné redoxné centrá, ktoré viažu ióny kovov a mohli by zodpovedať za jej prooxidačnú aktivitu. Pri jednej z mutácií CuZnSOD (H46R) bolo identifikované rezíduum cysteínu, ktoré má schopnosť koordinačne viazať redoxne aktívne mednaté kationy. V porovnaní s aktívnym centrom CuZnSOD je síce afinita tohto cysteínu k mednatým kationom nižšia, ale jedna z teórií vzniku ALS predpokladá, že so stúpajúcim vekom a kumuláciou medi dochádza k postupnému obsadeniu nízkoafinitných cysteínov na CuZnSOD a tak aj k zmene jej aktivity na prooxidačnú (Obrázok 22).

Na bunkových kultúrach sa podávanie antioxidantov ukázalo ako nádejná podporná terapia v prevencii a liečbe neurodegeneratívnych ochorení. Výsledky klinických experimentov však nepotvrdili všetky pozitívne účinky antioxidantov, ktoré boli pozorované na bunkových kultúrach. α -tokoferol bol podávaný pacientom s AD ako aj PD. U PD nemal žiaden účinok, u pacientov s AD jeho podávanie predĺžilo fázu pred nevyhnutnou hospitalizáciou a dobu prežívania o 230 dní. α -tokoferol ale nezlepšil kognitívne funkcie pacientov.

Pri neurodegeneratívnych ochoreniach sa na obrane nervových buniek veľmi významne podieľajú neurotrofíny. Sú to proteíny, ktoré regulujú prežívanie neurónov, axonálny rast a neurotransmisiu. Ukázalo sa, že ich neuroprotektívna aktivita je spojená s výrazným znížením OS, čo znižuje neurotoxický účinok voľných radikálov. V súčasnosti sa hľadajú spôsoby ako dosiahnuť, aby syntetické neurotrofíny prestupovali hematoencefalickou bariérou a dosiahli cieľové miesto pôsobenia. Alternatívne sa uvažuje aj nad ovplyvnením mechanizmov, ktoré vedú k zvýšeniu aktivity, alebo produkcie neurotrofínov v CNS. Pri týchto výskumoch sa ukázalo, že zvýšenie neurotrofického faktoru odvodeného z mozgového tkaniva sa dá dosiahnuť jednoduchým obmedzením príjmu kalórií v diéte. Zníženie kalórií spôsobí v CNS mierny OS, čo vyvolá antistresovú odpoveď, ktorá je v CNS zabezpečená aj zvýšenou produkciou neurotrofínov. Ďalším prístupom pri hľadaní nových farmakoterapeutických možností liečby neurodegeneratívnych ochorení je syntéza proteínov, ktoré by vychytávali voľné ióny kovov, čím by sa predchádzalo ich naviazaniu na iné proteíny v CNS a ich toxickým efektom. Tieto látky sa nazvali ako „metal-protein attenuating compounds“ (MPAC, kov-proteín oslabujúce zlúčeniny) a ich úlohou na rozdiel od klasických chelátorov kovov je degradovať väzby medzi kovovými iónmi a biologicky aktívnymi proteínmi. Prototyp tejto skupiny – cliochinol podávaný transgénym myšiam s AD u nich viedol zníženiu $A\beta$ až o 49 %, pričom nespôsobil systémový pokles kovových iónov. Zlúčeniny zo skupiny MPAC sú momentálne testované v klinických štúdiách na ľuďoch, nielen v indikácii AD, ale aj PD. U AD pacientov výrazne redukujú progresívne kognitívne poškodenie a množstvo $A\beta$ v porovnaní s placebo skupinou.



Obrázok 22. Hypotéza vzniku oxidačného stresu pri amiotrofickej laterálnej skleróze

Za fyziologických podmienok katalyzuje CuZnSOD reakciou, v ktorej dochádza k zneškodneniu superoxidových radikálov za vzniku peroxidu vodíka. Pri ALS nadobúda CuZnSOD prooxidačné vlastnosti, čo súvisí s kumuláciou iónov medi v organizme. Vysoká koncentrácia iónov medi spôsobuje, že sa viažu na povrchové miesta enzýmu, ktoré majú za fyziologických podmienok len veľmi nízku afinitu voči kovovým iónom, no po ich naviazaní tvoria nové redoxné centrá. Tvorba nových redoxných centier vedie k narušeniu funkcie CuZnSOD a zmene redoxného stavu, čo súvisí so zvýšenou produkciou voľných radikálov a tvorbou oxidačného stresu.

6.3.4 SKLERÓZA MULTIPLEX

Skleróza multiplex (SM) je autoimunitné zápalové ochorenie vedúce k demyelinizácii nervov centrálného nervového systému. Kým v minulosti sa výskum etiológie SM zameriaval na zápalové procesy, existuje stále viac dôkazov, že proces demyelinizácie je iniciovaný voľnými radikálmi a OS, ktorých pôvod nesúvisí so zápalom.

U pacientov so SM boli zaznamenané zvýšené hodnoty väčšiny markerov OS, ktoré vypovedajú o oxidačnom poškodení lipidov, proteínov aj DNA. Antioxidačná kapacita v sére pacientov so SM je znížená, kým v cerebrospinálnom moku stúpa. Korelácie boli zaznamenané medzi množstvom nitritov a nitrátov v cerebrospinálnom moku a stupňom poškodenia hematoencefalickej bariéry a koncentráciou 8-izoprostánov v cerebrospinálnom moku a stupňom závažnosti ochorenia. Zvýšené markery OS pri SM nie sú dôkazom o etiopatológii tohto ochorenia. Navyše je zrejmé, že voľné radikály vznikajú následkom zápalových procesov, ktoré sú podstatou SM. Výsledky experimentov však potvrdili, že voľné radikály vznikajú pri SM aj mechanizmami nezávislými od zápalu. Tieto mechanizmy sú spojené s abnormálnou funkciou mitochondrií, excitotoxicitou glutamátu a narušením homeostázy metabolizmu železa. Odhliadnuc od pôvodu voľných radikálov, dôležitý je poznatok, že zohrávajú významnú úlohu pri progresii SM.

V rámci výskumu OS boli u pacientov so SM zaznamenané rôzne abnormality vo funkcii mitochondrií, ktoré sa prejavujú mutáciami mitochondriálnej DNA (mtDNA), poruchami génovej expresie v mitochondriách, narušením DNA-reparačných mechanizmov, štruktúrnymi zmenami mitochondrií, zmenami aktivity mitochondriálnych enzýmov a zvýšenou produkciou voľných radikálov. Ako jedna z mutácií mtDNA bola popísaná mutácia génu pre odpájajúci proteín 2 (UCP2, uncoupling protein 2), ktorý umožňuje transfer aniónov z vnútornej strany mitochondriálnej membrány na vonkajšiu a prenos protónov opačným smerom. Polymorfizmus tohto génu je jedným z predispozičných faktorov SM. Podobne aj mutácie génov pre komplexy I, III a IV, ktoré sú súčasťou dýchacieho reťazca mitochondrií môžu ovplyvniť zápalovú odpoveď v CNS a môžu byť príčinou SM. Narušená aktivita komplexov dýchacieho reťazca vedie k vzniku voľných radikálov, ktoré poškodzujú mtDNA a tým sa opäť produkujú nové voľné radikály. Ide o cyklický mechanizmus, ktorý by mal byť zastavený reparačnými mechanizmami. mtDNA je oveľa citlivejšia na voľné radikály ako jadrová DNA, pretože je menej chránená histónmi a mitochondrie tiež nedisponujú takým spektrom reparačných mechanizmov ako je to u jadrovej DNA. mtDNA reparačné mechanizmy závisia aj od typu buniek. Kým napríklad v asteroch je zmutovaná mtDNA rýchlo odstránená glykozylázami, v iných gliových bunkách a neurónoch je jej aktivita nízka. Ukázalo sa, že cielene zvýšená expresia reparačného enzýmu DNA glykozylázy 1 (hOGG1) v mitochondriálnych oligodendrocytoch redukuje množstvo poškodenej mtDNA a predchádza tak apoptickej signalizácii. Stimulácia reparačných mechanizmov mtDNA preto predstavuje novú stratégiu pre liečbu SM. Ďalším cieľom súčasného farmakoterapeutického výskumu SM sú póry na membráne mitochondrií. Ich kľúčovým regulátorom je cyklofilín D, ktorý má zároveň dôležitú úlohu pri bunkovej smrti indukovanej OS. Myši, u ktorých bol odstránený gén pre cyklofilín D odolávali v experimentálnom modeli SM oveľa lepšie OS, než skupina bez genetickej modifikácie. Predpokladá sa, že patologická aktivácia mitochondriálnych pórov vedie k uvoľneniu veľkého množstva voľných radikálov do bunky, čo stimuluje OS a apoptózu.

Nemenej zaujímavé sú aj výsledky štúdií, ktoré skúmajú excitotoxicitu ako jeden z možných etiopatolo-

genetických faktorov SM. Excitotoxicita vyvoláva bunkovú smrť po nadmernom dráždení CNS. Vzniká v dôsledku narušenia rovnováhy medzi excitačnými procesmi mediovanými glutamátom a inhibičnými procesmi mediovanými glycinom a γ -aminobutyrovou kyselinou (GABA). Zvýšenie hladín extracelulárneho glutamátu vedie k akumulácii vysokých koncentrácií vápenatých iónov v nervových bunkách. Extrémne množstvá vápenatých iónov vyvolávajú kaskádu procesov na membráne, v cytoplazme a jadre, ktoré podmieňujú toxicitu v oligodendrocytoch a neurónoch. Medziiným dochádza k extrémnej aktivácii veľkého množstva enzýmov, ktoré vedú k tvorbe voľných radikálov (fosfolipáza A, NO-syntáza). Zvýšené množstvá extracelulárneho glutamátu boli potvrdené v cerebrospínálnej tekutine SM pacientov a bolo identifikovaných niekoľko mechanizmov, ktoré vedú k tomuto stavu (uvoľňovanie glutamátu prozápalovými leukocytami, blokáda membránových transportérov voľných radikálov). Podnetom pre výskum excitotoxicity, jej indukcie a toxických mechanizmov boli experimenty, pri ktorých podávanie blokátorov glutamátových receptorov dokázalo zredukovať poškodenie oligodendrocytov a axónov v modeli SM. Ďalšie výskumy ukázali, že blokáda glutamátových receptorov predchádza strate až 60 % oligodendrocytov v porovnaní s kontrolnou skupinou bez experimentálnej terapie a excitotoxicita je hlavnou príčinou bunkovej smrti oligodendrocytov, pričom jej kľúčovým mechanizmom je vyvolanie OS.

Podobne ako u iných neurodegeneratívnych ochorení aj u pacientov so SM boli v CNS pozorované vysoké hladiny iónov kovov, najmä železa. Depozity iónov železa sú prítomné v neurónoch a oligodendrocytoch, pričom intracelulárne sú lokalizované prednostne v mitochondriách. Bolo dokázané, že agregáciu iónov železa v mitochondriách podporujú prozápalové cytokíny TNF α a IL-1. Pôvodom vysokých hladín železa v CNS je deštrukcia buniek (oligodendrocytov) a ich proteínov, ktoré viažu železo. K narušeniu homeostázy metabolizmu železa prispievajú aj zmenené funkcie metaloproteínov. Koncentrácia redoxne aktívnych iónov železa v CNS koreluje s množstvom produkovaných voľných radikálov, pričom oxidácia prítomných katecholov vedie k vzniku mimoriadne toxických chinónov a semichinónov. V experimentoch sa ukázalo, že akumulácii železa v mitochondriách astrocytov predchádza zvýšená expresia hém oxygenázy 1 (HO-1), ktorú zrejme indukujú prozápalové faktory (voľné radikály, cytokíny). Po inhibícii HO-1 bunky stimulované rovnakými prozápalovými faktormi ióny železa neakumulujú, teda zvýšená aktivita HO-1 má podiel na vzniku OS pri SM.

Nedávno bolo dokázané, že SM je spojená s chronickou žilovou cerebrospínálnou nedostatočnosťou, ktorá vedie k tvorbe kolaterál v cerebrospínálnej cirkulácii. Podľa tejto hypotézy sú zmenené hemodynamické pomery príčinou zvýšeného extravaskulárneho prieniku erytrocytov a stávajú sa hlavným zdrojom akumulovaného železa v CNS.

Znížená aktivita antioxidantnej obrany u pacientov so SM bola dôvodom pre realizáciu experimentov, ktoré sa zaoberali vplyvom antioxidantov na priebeh a zlepšenie klinického stavu pacientov so SM. Výsledky použitia niektorých antioxidantov v experimentálnej liečbe sú síce veľmi pozitívne, no existuje len málo klinických štúdií, ktoré by ich mohli potvrdiť. V jednej štúdií bol podávaný inozín, prekursor kyseliny močovej, ktorá je dobrým fyziologickým antioxidantom. U relaps-remitujúcich pacientov so SM sa po dvojročnom podávaní vyvinula asymptomatická hyperurikémia, pričom nebolo zaznamenané zlepšenie priebehu ochorenia v porovnaní s klasickou liečbou interferónom β . Dobré výsledky pri eliminácii OS sa dosiahli pri podávaní N-acetylcysteínu a jeho analógu N-acetylcysteínamidu, ktorý oveľa ľahšie preniká hematoencefalickou bariérou. Tieto látky oslabili klinické symptómy experimentálnej SM, redukovali infiltráciu mononukleárných buniek do CNS, inhibovali syntézu prozápalových cytokínov a NO-syntázu v CNS. N-acetylcysteín tiež inhibuje peroxidáciu, zvyšuje hladiny glutatiónu a má chelatačné schopnosti. N-acetylcysteínamid dokonca úplne dokázal zabrániť u zvierat rozvoju experimentálne evokovanej SM. Podobné výsledky boli zaznamenané aj po podávaní tymochinónu, ktorého antioxidantná aktivita sa prejavila aj zvýšením hladín glutatiónu a zníženou expresiou NF- κ B. Sľubné výsledky sa dosiahli u zvierat aj liečbou bilirubínom, ktorý chráni integritu hematoencefalickej bariéry pred poškodením voľnými radikálmi. Tento mechanizmus zabraňuje infiltrácii prozápalových buniek do CNS ešte pred vyvinutím SM, ale u zvierat s už indukovanou SM zápal v CNS eliminovať nedokáže. Napriek tomu, podávanie bilirubínu výrazne znižuje oxidačné poškodenie CNS, čo je dôležité pre progresiu SM. Bilirubín má aj imunomodulačné účinky, pri SM potláča imunitnú odpoveď

polyklonálnych buniek a špecifických T-lymfocytov. O dôležitosti antioxidačného účinku bilirubínu vypovedajú jeho nízke koncentrácie v sére pacientov so SM. Pri výskume SM sa zistilo, že znížená expresia niektorých antioxidačných enzýmov je spôsobená inhibíciou transkripčného faktora Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2). U SM pacientov peroxynitrit inhibuje Nrf2, ktorý je transkripčným faktorom aj pre enzýmy syntézy GSH, preto sú ich hladiny znížené. V súčasnosti je v klinickom skúšaní látka, ktorá účinkuje podobne ako Nrf2. Doposiaľ získané výsledky klinickej štúdie potvrdili, že stimulácia antioxidačných responzívnych elementov, na ktoré sa proteín Nrf2 viaže, vedie k potlačeniu zápalovej odpovede a aktivácii neuroprotektívnych mechanizmov.

Náhodne bol objavený aj neuroprotektívny účinok naloxonu, antagonistu opioidných receptorov. Jeho účinok bol dokázaný na neurogliových bunkových kultúrach, u ktorých inhiboval produkciu TNF α , IL-1 β , *NO a superoxidového radikálu. Mechanizmus pôsobenia naloxonu je zatiaľ neobjasnený, ale je už známe, že nie je sprostredkovaný antagonizmom opioidných receptorov.

6.4 NÁDOROVÉ OCHORENIA A OXIDAČNÝ STRES

Potenciál vyvolať nádorové ochorenie vyplýva z oxidačných reakcií voľných radikálov, ktoré poškodzujú DNA za vzniku rôznych typov mutácií. Mnohé štúdie potvrdili zvýšenie hladín vysoko mutagénneho 8OHdG (8-hydroxydeoxyguanozínu) v tumoroch. Faktom ale zostáva, že tento marker sa vyskytuje aj pri iných, ako nádorových ochoreniach. Navyše k mutáciám, ktoré vyvoláva 8OHdG, dochádza aj pri replikácii DNA, alebo pôsobením iných kancerogénov. Aj tumory samé o sebe produkujú veľké množstvá voľných radikálov, a to bez ohľadu na typ kancerogénu, ktorý ich vznik evokoval. Iba na základe prítomnosti markerov poškodenej DNA v tumoroch preto nie je možné s istotou konštatovať, že OS je pôvodcom nádorových ochorení. Podiel OS na vzniku nádorových ochorení však podporili aj experimenty, v ktorých bol u myši, bez génov pre CuZnSOD, GPx1 a 2 a peroxiredoxíny zaznamenaný vyšší výskyt nádorových ochorení.

Priama oxidácia DNA a vznik mutácii nie sú jedinou možnou cestou, ktorou voľné radikály zasahujú do karcinogenézy. Predovšetkým karcinogenéza je niekoľkostupňový proces transformácie zdravej bunky na abnormálnu, ktorý je ovplyvnený mnohými faktormi a jediná mutácia DNA nestačí na to, aby vznikol nádor. Karcinogenéza začína iniciačnou fázou, v ktorej dochádza k poškodeniu DNA (napríklad reakciou s voľnými radikálmi) a vyžaduje si minimálne jednu replikáciu DNA nasledovanú proliferáciou, aby reparačné mechanizmy nedokázali mutáciu odstrániť a stala sa ireverzibilnou. Druhá fáza je označovaná ako promócia. Mnohé karcinogény sú zároveň aj promótoary tumorov, ale často sú promótoarmi aj látky, ktoré sami o sebe karcinogézu nedokážu iniciovať. Promótoary stimulujú expresiu latentného fenotypu iniciovaných buniek tak, že stimulujú ich proliferáciu, alebo zabraňujú ich apoptóze. Odstránenie promótoara z bunky môže viesť až k návratu tkaniva do pôvodného stavu (aj keď mutácia DNA už ostáva zachovaná a prítomnosť promótoara môže opäť spustiť karcinogézu). V poslednej, progresívnej fáze sa zo zdravých buniek stávajú definitívne bunky malígne, DNA podstupuje dodatočné mutácie, bunky rýchlo a agresívne rastú a metastázujú. Progresívna fáza je na rozdiel od promócie ireverzibilná.

6.4.1 OXIDAČNÝ STRES V PROCESCH KARCINOGENÉZY

Voľné radikály sa zúčastňujú takmer na všetkých procesoch súvisiacich s karcinogézou, jedná sa predovšetkým o bunkovú proliferáciu, programovanú smrť bunky, metastázovanie a angiogézu. Každý z týchto procesov je riadený prostredníctvom celého súboru molekúl (signálne molekuly, transkripčné faktory,...), pričom len niektoré z nich sú pre daný proces kľúčové a riadia ho. Ak voľné radikály poškodzujú gény, ktoré exprimujú tieto kľúčové molekuly, stúpa aj riziko rozvoja nádorového ochorenia.

Proliferáciu buniek ovplyvňuje OS na úrovni viacerých signálnych proteínov, akými sú Nrf2, Keap1 (inhibitor Nrf2), Ras, Raf a mnohé MAP-kinázy - ERK1/2, MEK, p38, JNK, c-myc, p53, proteínkiná-

za C. Nrf2 je považovaný zároveň za hlavný regulačný faktor antioxidantnej odpovede a jeho mutácie preto ovplyvňujú (zvyšujú) aj OS. Ďalší proteín zodpovedný za kontrolu mechanizmov proliferácie je p38 α , ktorý potláča karcinogézu blokovaním proliferácie a urýchlením apoptózy. Proliferácia buniek je bezpochyby najintenzívnejšie regulovaná proteínom p53. Keďže ide zároveň aj o najznámejší tumor-supresívny gén, jeho úloha pri karcinogéze bude popísaná nižšie.

Na to, aby mohli bunky metastázovať, musia prejsť procesom epiteliálno-mezenchymálnej tranzície (EMT), v rámci ktorého podstupujú biologicko-chemické zmeny umožňujúce vznik agresívnejšieho mezenchymového fenotypu. EMT je spojená s aktiváciou špecifických ECM proteínov (proteíny extracelulárnej matrix), ktoré podporujú migračnú schopnosť buniek a ich transport krvným riečiskom. K aktivácii mnohých z ECM proteínov dochádza často po stimulácii voľnými radikálmi. V jednej z prvých štúdií, ktoré potvrdili účasť OS na EMT procesoch bol popísaný vzostup TGF- β (transformujúci rastový faktor β) po stimulácii voľnými radikálmi. Voľné radikály stimulujú aj MMP-3 (matrixová metaloproteináza 3), ktorá uľahčuje migráciu buniek rozkladom extracelulárnej matrix a jej zvýšené hladiny sú typické pre nádory prsníka.

Tumory a metastázy sú schopné existencie na základe prívodu dostatočného množstva živín, ktoré sú privádzané novovzniknutými cievami, vytvorenými už z preexistujúcich ciev. Tento proces sa označuje ako angiogenéza. Tumory preto produkujú veľa proangiogénnych faktorov ako VEGF (vaskulárny endotelový rastový faktor) a jeho receptor VEGFR, MMP (matrixové metaloproteinázy), FGF (fibroblastový rastový faktor), IL-8, PDGF (rastový faktor odvodený od trombocytov) a TGF- β . VEGF, ktorý je vysoko exprimovaný takmer u všetkých nádorových ochorení je rýchlosť udávajúcim faktorom angiogenézy. Bolo dokázané, že okrem stavu hypoxie, cytokínov a rastových faktorov zvyšujú jeho hladiny aj voľné radikály. Pri rýchlo rastúcich tumoroch tvorba ciev zaostáva a preto sa v nádorových bunkách vyvíja hypoxia. Z faktorov, ktoré zabezpečujú adaptáciu buniek na hypoxiu je stimulovaný voľnými radikálmi najmä HIF-1 α . Voľné radikály tak paradoxne podporujú prežitie tumoru.

6.4.2 OXIDAČNÝ STRES, ONKOGENY, TUMOR-SUPRESOROVÉ A STABILIZAČNÉ GÉNY

Ako už bolo uvedené, vznik nádorov je postupný niekoľkofázový proces. DNA buniek je denne vystavená veľkému mutačnému tlaku, či už pôsobením kancerogénov, alebo chybami v jej replikácii. Bunky práve preto disponujú obrovským množstvom kontrolných a reparačných mechanizmov, ktoré sú zodpovedné za to, aby mutácie DNA opravili. Prípadne, ak kontrolné mechanizmy odhalia, že bunka vykazuje známky abnormality, musí podstúpiť kontrolovanú smrť – apoptózu. Na to, aby sa mutácie DNA prejavili vo forme nádoru musí prísť aj k poškodeniu kontrolných mechanizmov, teda mutáciám viacerých typov génov. Vo väčšine nádorových ochorení sú zmutované onkogény, tumor-supresorové gény a stabilizačné gény. Ako proto-onkogény sú označované gény, ktoré exprimujú proteíny podieľajúce sa na bunkovom raste a diferenciácii, prípadne ich kontrolných mechanizmov (gény pre rastové faktory, signálne molekuly, gény riadiace apoptózu,...). Z proto-onkogénov vznikajú mutáciami, alebo kontinuálnou expresiou onkogény. Aktivácia proto-onkogénov prebieha pri karcinogéze nepretržite, kým u zdravých buniek sú proto-onkogény pod prísnu kontrolou tumor-supresorových génov, ktoré môžu aktiváciu proto-onkogénov zastaviť a zabrániť nekontrolovateľnému raste. Pri mutáciách tumor-supresorových génov je však táto kontrola „vypnutá“, bunky naďalej rastú a delia sa. Úlohou proteínov, ktoré sú kódované stabilizačnými génmi, je udržiavať DNA v nepoškodenom stave. Tieto proteíny sa podieľajú na opravách poškodenej DNA a tiež zabezpečujú dohľad nad správnu segregáciou chromozómov a bunkovým delením. Keď sú stabilizačné gény zmutované, oveľa ľahšie podliehajú mutáciám aj proto-onkogény a tumor-supresorové gény. Pri dedičnom recesívnom ochorení *xeroderma pigmentosum* sú narušené mechanizmy pre opravu DNA poškodenej UV žiarením. U ľudí trpiacich týmto ochorením je vysoké riziko vzniku nádorového ochorenia kože pri vystavovaní sa slnečnému žiareniu.

Zmutované proto-onkogény sa nachádzajú vo väčšine nádorov, predovšetkým mutácie *ras* génu sú

veľmi časté. *Ras* gén exprimuje Ras proteín s GTPázovou aktivitou, ktorá je pri mutácii potlačená. Hladiny GTP v bunke stúpajú a podporujú sa len signálne dráhy, ktoré vyžadujú fosforylačný mod. Medzi ďalšie proto-onkogény u ľudí patria gény kináz (*src*, *abl*, *erb-B*, *raf*), zložky transkripčných faktorov (*fos*, *jun*), či gén transkripčného faktoru *myc*.

Najznámejší gén, ktorý sa nazýva aj „strážca genómu“ je *p53*. Exprimuje transkripčný faktor, ktorý zastavuje bunkové delenie. Proteín *p53* je aktivovaný fosforyláciou pri akomkoľvek poškodení DNA (napr. voľnými radikálmi), alebo ak bunka registruje abnormálne rastové signály. *p53* tiež stimuluje expresiu génov, ktoré riadia jeho vlastnú deštrukciu, čiže sám reguluje svoje hladiny. Ak sú hladiny proteínu *p53* v bunke nízke, podieľajú sa na udržiavaní oxidačno-redukčnej rovnováhy tým, že riadia expresiu niektorých antioxidantných enzýmov. Zvýšené hladiny proteínu *p53* naopak stimulujú hladiny voľných radikálov, čím dochádza aj k sekundárnej aktivácii *p53* a umocneniu jeho cytostatických a proapoptických účinkov. Strata funkcie *p53* spôsobuje, že bunky s poškodenou DNA môžu vstúpiť do ďalšieho bunkového cyklu. U ľudí sa pri nádorových ochoreniach objavuje mutácia génu *p53* veľmi často. Aj v pokusoch na myšiach, ktorým chýba *p53* gén, sa potvrdilo, že u týchto zvierat sa rýchlo vyvíja nádorové ochorenie. Aj keď najčastejšie je zmutovaný pri nádorovom ochorení priamo gén *p53*, jeho funkcia môže byť porušená aj pri mutáciách génov, ktoré riadia jeho expresiu. Jedným z nich je *mdm2*, ktorý riadi deštrukciu *p53* proteínu. Preto, ak dochádza k nadexpresii *mdm2*, proteín *p53* nedokáže zastaviť delenie buniek s poškodenou DNA.

6.4.3 VOĽNÉ RADIKÁLY V NÁDOROVÝCH OCHORENIACH

Zrýchlený metabolizmus nádorových buniek je sprevádzaný aj väčšou produkciou voľných radikálov, ktorá však nádorové bunky neohrozuje tak, ako je to u zdravých buniek. Dôvodom je vysoká adaptačná schopnosť nádorových buniek. Pri zvýšených hladinách voľných radikálov dokážu napríklad indukovať vznik novej redoxnej rovnováhy, vyúsťujúcej k bunkovej proliferácii a adaptácii. Adaptačná schopnosť nádorových buniek na zvýšený OS je jedným z najdôležitejších adaptačných mechanizmov, ktorý im umožňuje odolávať tlaku voľných radikálov.

Mutácie génov v nádorových bunkách súvisia s priamou a nepriamou reguláciou voľných radikálov. Na genetickej úrovni je produkcia voľných radikálov pod prísnu kontrolou *Nrf2* a jeho inhibítora *Keap1*. U niektorých nádorov sú gény pre uvedené faktory zmutované. Pri nádoroch prsníka je zmutovaný aj supresorový gén pre rakovinu prsníka 1 (*BRCA1*), ktorý zodpovedá za reparácie DNA a kontroluje antioxidantnú odpoveď prostredníctvom *Nrf2* a *Nf-κB*. Takéto mutácie nesúvisia teda len s rozvojom nádorových ochorení, ale aj s poruchami v regulácii OS. Ďalším génom, ktorý podlieha bodovým mutáciám asi v 30 % nádorových ochorení, je *ras*. Zmutovaný *ras* zvyšuje prostredníctvom aktivácie NADPH oxidázy (Nox) produkciu voľných radikálov, ktoré potom oxidujú DNA a prispievajú k transformácii buniek na nádorové. Zistilo sa, že vo všeobecnosti je expresia prooxidačných enzýmov, napríklad aj uvedených NADPH oxidáz (Nox1-Nox5) v nádorových ochoreniach zvýšená. Nadexpresia Nox1 je typická pre nádory prostaty a čreva, dochádza pri nej k stimulácii tvorby peroxidu vodíka, čo vedie následne k zvýšeným hladinám VEGF a angiogenéze.

6.5 LITERATÚRA

Ahsan H, Ali A, Ali R. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. Clin Exp Immunol 2003; 131:398–404.

Al-Wasiti EA, Al-Tammimy SM, Al-Rubayee WT. The Role of Oxidative Stress in Vitiligo and Alopecia Areata. Iraqi J. Comm. Med., Oct. 2010.

Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. Nat Rev Drug Discov. 2004 March; 3(3):205–214.

Bellei B, Pitisci A, Ottaviani M, Ludovici M, Cota C, Luzi F, Dell'Anna ML, Picardo M. Vitiligo: A po-

ssible model of degenerative diseases. PLoS ONE 2013; 8(3):e59782.

Ferretti G, Bacchetti T, Masciangelo S, Saturni L. Celiac Disease, Inflammation and Oxidative Damage: A Nutrigenetic Approach. *Nutrients* 2012; 4:243-257.

Giustarini D, Dalle-Donne I, Tsikas D, Rossi R. Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science*, 2009; 46(5-6):241–281.

Hitchon CA a El-Gabalawy HS. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2004; 6:265-278.

Hutcheson R a Rocic P. The Metabolic Syndrome, Oxidative Stress, Environment, and Cardiovascular Disease: The Great Exploration. *Experimental Diabetes Research*, vol. 2012; Article ID 271028, 13 pages. doi:10.1155/2012/271028.

Kostica MS, Rajkovic JS, Potic Floranovic MS, Dimova ID, Pavlovic DD. Multiple Sclerosis and Oxidative Stress – A Clinical Perspective. *Neurochemical Journal* 7 (1), 2013:76–86.

Kurien BT, Hensley K, Bachmann M, Scofield RH. Oxidatively modified autoantigens in autoimmune diseases. *Free Radical Biology & Medicine* 41, 2006:549–556.

Neurodegenerative diseases and oxidative stress, Kevin J. Barnham, Colin L. Masters & Ashley I. Bush, *Nature Reviews Drug Discovery* 3, 205-214 (March 2004), doi:10.1038/nrd1330

Roberts CK a Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences* 84, 2009:705–712.

Schallreuter KU, Salem MAEL, Holtz S, Panske A. Basic evidence for epidermal H₂O₂/ONOO—mediated oxidation/nitration in segmental vitiligo is supported by repigmentation of skin and eyelashes after reduction of epidermal H₂O₂ with topical NB-UVB-activated pseudocatalase PC-KUS. *FASEB J* doi:10.1096/fj.12-226779.

Sosaa V, Molinéa T, Somozaa R, Paciuccib R, Kondohc H, LLeonarta ME. Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Research Reviews* 12, 2013:376–390.

Wang G, Pierangeli SS, Papalardo E, Ansari GAS, Khan MF. Markers of Oxidative and Nitrosative Stress in Systemic Lupus Erythematosus: Correlation with Disease Activity. *Arthritis Rheum.* 2010 July; 62(7): 2064–2072.

ZOZNAM SKRATIEK

3-NT- 3-nitrotyrozín

8-isoPGF₂ α – 8-izoprostán PGF₂ α

8-OH-Ade - 8-hydroxyadenín

8-OH-Gua - 8-hydroxyguanín

8-oxodG – 8-hydroxydeoxyguanozín

AAPH - 2,2'-azobis-(2-amidinopropán) dihydrochlorid

ABTS - 2,2'-azinobis(3-etylbenzotiazolín-6-sulfonát)

AMVN - 2,2'-azobis-(2,4-dimetyl-valeronitril)

A β - amyloidný- β -peptid

AD - Alzheimerova choroba

ADMA - asymetrický N, N-dimetylarginín

Amplex red -N-acetyl-3,7-dihydroxyfenoxazín

AO - autoimunitné ochorenia

AOPP - pokročilé produkty oxidácie proteínov

AP miesto - apurínové/apyrimidínové miesto

Apo-A -apolipoproteín A

ARP - aldehydový reagent pre detekciu AP miest

AUC - obsah plochy pod krivkou

BHT - butylovaný hydroxytoluén

BODIPY581/591 - kyselina 4,4-difluoro-5-(4-fenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacén-3-undekánová

CAT - kataláza

CBA test - krocín bieliaci test

CD - Crohnova choroba

CLA - konjugovaná kyselina linolénová

CNS - centrálny nervový systém

CuZnSOD - CuZn dependentná superoxid dismutáza

- MnSOD - Mn dependentná superoxid dismutáza
- DABCO - difenylbenzofurán
- DEPMPO - 5-dietoxyfosforyl-5-metyl-1-pyrolín-N-oxid
- DHA - dehydroaskorbát
- DHKL - dihydrolipoová kyselina
- DM - diabetes mellitus
- DMPO - 5,5-dimetylpyrolín-N-oxid
- DNA - deoxyribonukleová kyselina
- DNP - 2,4-dinitrofenylhydrazónu
- DPHPC - difytanoyl-fosfatidylcholín
- DPPH - 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl
- DTNB - kyselina 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoová
- ECM - extracelulárny matrix
- EDRF - relaxačný faktor odvodený od endotelu
- ELISA - enzýmová imunoabsorbčná analýza
- eNOS - endotelová syntáza oxidu dusnatého
- EMPO - 5-etoxykarbonyl-5-etyl-1-pyrolín-N-oxid
- EMT - epiteliálno-mezenchymálna tranzícia
- EPR - elektrónová paramagnetická rezonancia
- ESR - elektrónová spinová rezonancia
- FAD - flavínadenín dinukleotid
- FapyG - 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidín
- FGF - fibroblastový rastový faktor
- FRAP - feroredukčná schopnosť plazmy
- GABA - kyselina γ -aminobutyrová
- GC - plynová chromatografia
- GC-MS - plynová chromatografia spojená s hmotnostnou spektrometriou
- GPx - glutatiónperoxidáza
- GS - Gilbertov syndróm
- GSH - glutatión
- GSSG - oxidovaný glutatión (hexapaptid)
- hOGG1 - 8-oxoguanín DNA N-glykozyláza
- HAT - reakcie prenosu vodíka

- HDL - lipoproteíny svysokou hustotou
- HIF-1 α - hypoxiou indukovaný faktor 1 α
- HO-1 - hém-oxygenáza 1
- HO-2 - hém-oxygenáza 2
- HORAC - antioxidačná kapacita pre hydroxylový radikál
- HPLC - vysokotlaková kvapalinová chromatografia
- HPLC-MS - vysokotlaková kvapalinová chromatografia spojená s hmotnostnou spektrometriou
- ICAM - 1 - intercelulárna adhézna molekula 1
- IDL - lipoproteíny intermediárnej hustoty
- IFN γ - interferón γ
- IL-1 - interleukín 1
- IL-1 β - interleukín 1 β
- IL-8 - interleukín 8
- iNOS - induktabilná syntáza oxdu dusnatého
- IS - imunitný systém
- KL - kyselina α -lipoová
- LDL - lipoproteíny s nízkou hustotou
- MeO - AMVN - 2'-azobis-(4-metoxy-2,4-dimetyl-valeronitril)
- MDA - malóndialdehyd
- MMP-3 - matrixová metaloproteináza 3
- MPAC - kov-proteín oslabujúce zlúčeniny
- MS - hmotnostná spektrometria
- MSy - metabolický syndróm
- MSR - metionín sulfoxid reduktáza
- mtDNA - mitochondriálna DNA
- NADH - nikotínamid adenín dinukleotid
- NADPH - nikotínamid adenín dinukleotidfosfát
- nNOS - neuronálna syntáza oxidu dusnatého
- Nox - NADPH oxidáza
- Nrf2 - nukleárny erytroidný faktor typu 2
- NTB - nitrotetrazoliová modrá
- ORAC - absorbčná kapacita pre kyslíkový radikál
- OS - oxidačný stres

- p53 - proteín 53
- p38 - proteín 38
- p38 α - proteín 38 α
- PBN - alfa-fenyl-terc-butylnitrón
- PD - Parkinsonova choroba
- PDGF -rastový faktor odvodený od trombocytov
- Prx - peroxiredoxíny
- RA - reumatoidná artritída
- RMCD - metylovaný β -cyklodextrín
- RNS - reaktívne formy dusíka
- ROS - reaktívne formy kyslíka
- SDA - semidehydroaskorbát
- SET - jednoelektrónový prenos
- SLE - systémový lupus erythematosus
- SM - skleróza multiplex
- SOD - superoxid dismutáza
- TAC - totálna antioxidačná kapacita
- TBA - kyselina tiobarbiturová
- TEAC - antioxidačná kapacita ekvivalentná Troloxu
- TGF- β - transformujúci rastový faktor β
- TNF α - faktor nekrotizujúci tumory α
- TPTZ - 2,4,6-tripyridyltriazín
- TRAP - antioxidačný parameter totálneho záchytu radikálov
- Trolox - kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylchróman-2-karboxylová
- TUNEL - značenie deoxyuridíntrifosfátového konca sprostredkované deoxyribonukleotidyl transferrázou
- UCP2 - odpájajúci proteín 2
- VCAM - 1 - vaskulárna adhézna molekula 1
- VEGF - vaskulárny endotelový rastový faktor
- VEGFR - receptor pre vaskulárny endotelový rastový faktor
- VLDL - lipoproteíny s veľmi nízkou hustotou
- VR - voľné radikály