



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

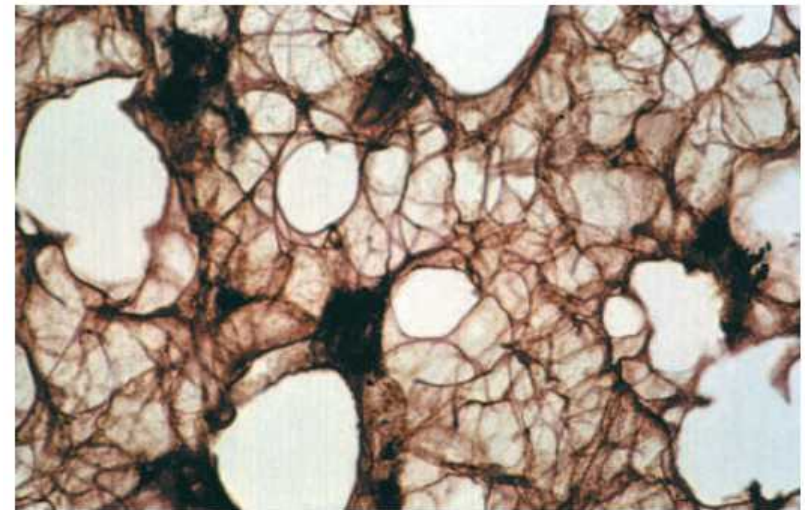
# *Patologické stavy spojené s ROS a RNS - 2.část*

Úloha ROS a RNS při plicních a kardiovaskulárních nemocech, diabetes, karcinogenezi, poškození kůže

**PharmDr. Ján Vančo, Ph.D.**  
**Ústav chemických léčiv, FaF VFU Brno**

# Úloha ROS a RNS u plicních nemocí

- Plíce – jediný vnitřní orgán v kontaktu s vnějším prostředím
- celková plocha 100 m<sup>2</sup>, z toho asi 4 m<sup>2</sup> dýchací cesty
- velká kontaktní plocha činí dýchací ústrojí velmi citlivým ke kyslíku ale také škodlivinám
- nejvýznamnější škodliviny (plyny a pevné látky)
  - cigaretový kouř
  - oxidy síry a dusíku, ozon – vyvolávají zánět
  - azbest, křemík, oxid křemičitý – depozice, karcinogeneze?
  - paraquat, syntetické xenobiotika

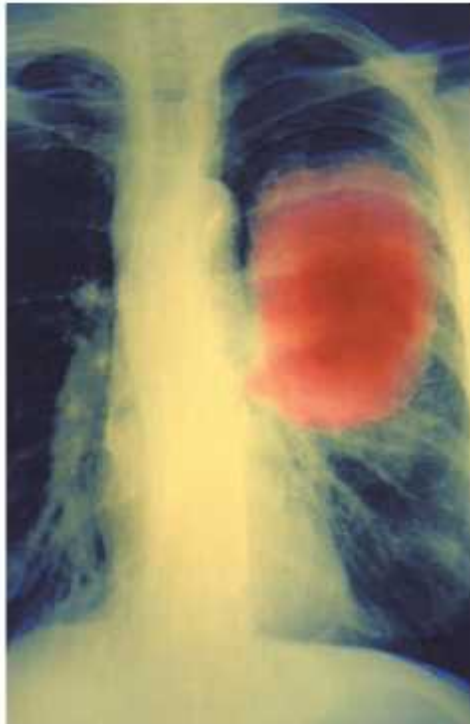


A light micrograph of a human lung containing particles of inspired coal dust (anthracosis). The black masses shown are groups of coal dust particles. (Photograph by Astrid & Hanns-Frieder Michler, Photo Researchers, Inc. Reproduced by permission.)

# Úloha ROS a RNS u plicních nemocí

## Cigaretový kouř

- bylo v něm identifikováno více než 3000 sloučenin, z nichž minimálně 50 je karcinogenních
- jeden vdech cigaretového dýmu obsahuje až  $10^{17}$  ROS
- způsobuje inaktivaci antiproteas, peroxidaci lipidů buněčných membrán, aktivace transkripčních faktorů (NF- $\kappa$ B) a genů, poškozují DNA a vede k buněčné smrti nebo karcinogenezi



An x-ray image showing an oval-shaped carcinoma in the left lung (right of image). (Custom Medical Stock Photo. Reproduced by permission.)



A normal lung (left) and the lung of a cigarette smoker (right). (Photograph by A. Glauberman, Photo Researchers, Inc. Reproduced by permission.)

- v alveolách dochází k zánětu a mikrohemoragiím, které vedou k depozici železa a černé pigmentaci tkáně

# Úloha ROS a RNS u plicních nemocí

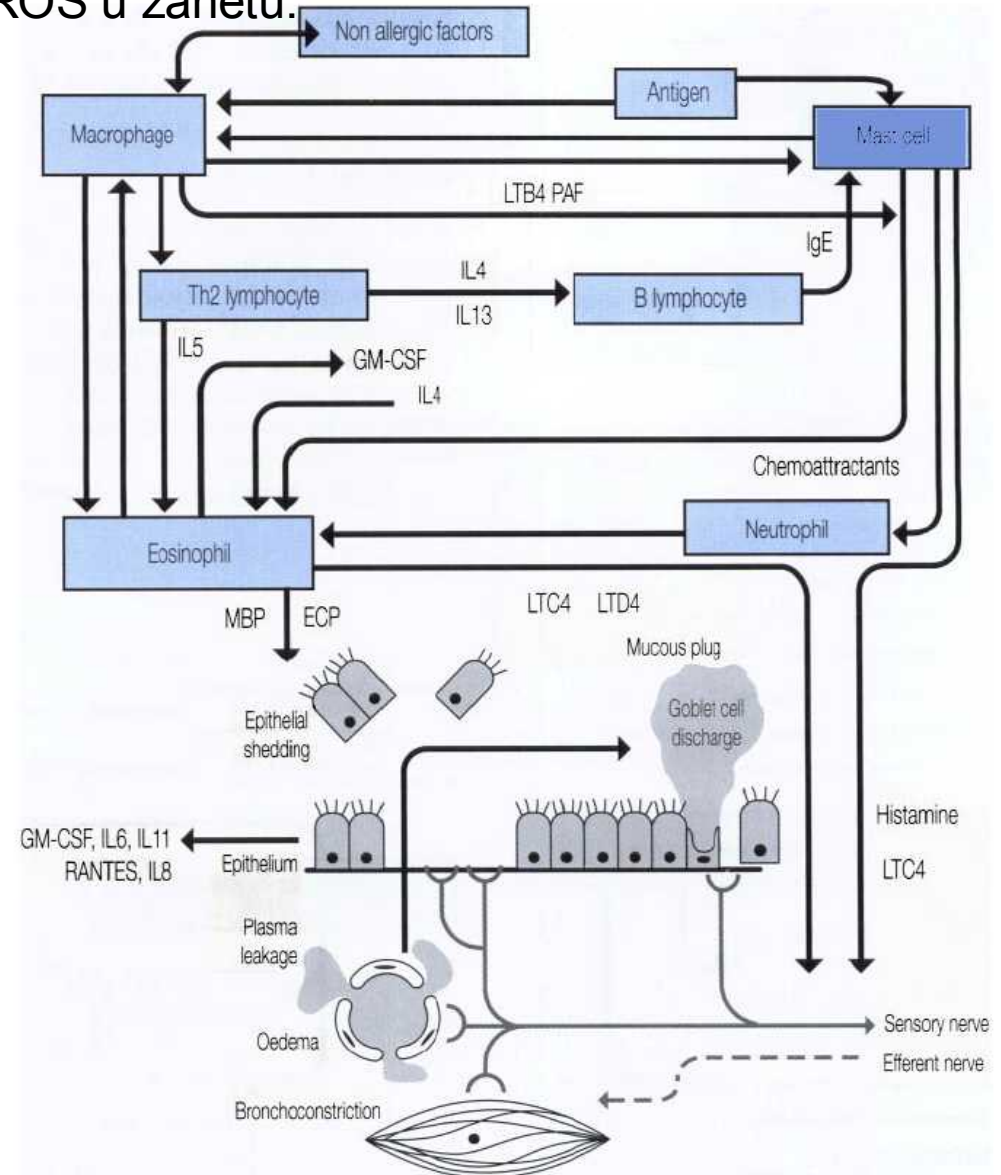
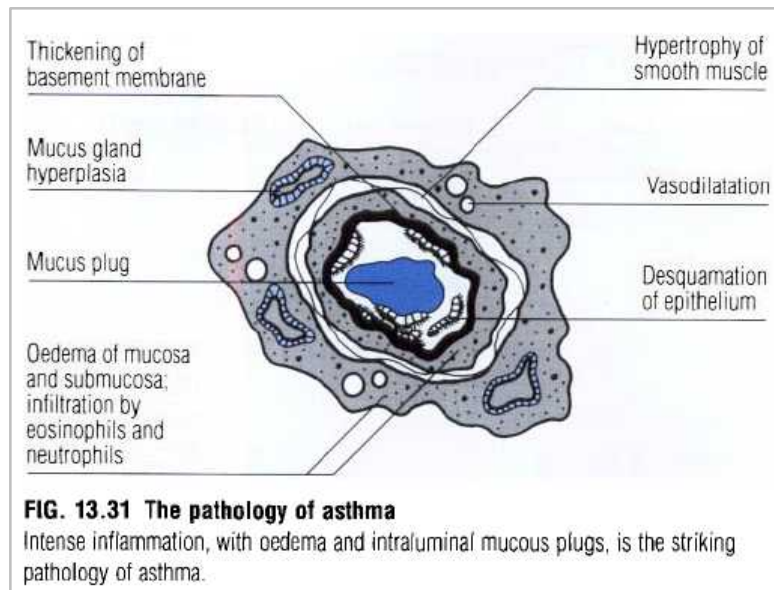
ARDS (adult respiratory distress syndrome)

- akutní selhání plic způsobené edémem
- vzniká z různých příčin: těžký šok, aspirace obsahu žaludku, popáleniny, masivní infekce, traumata, diseminovaná intravaskulární koagulopatie, anafylaxe, působení toxinů, pankreatitida, uremie a jiné
- pneumocyty postižené škodlivinami uvolňují chemokiny – chemotaxe neutrofilů
- aktivované neutrofilů jsou vydatným zdrojem superoxidu a kyseliny chlorné, uvolňují se z nich také proteolytické enzymy kolagenasa a elastasa – tím jsou poškozované kapilární membrány a zvyšuje se jejich permeabilita
- v akutním stadiu ARDS se alveoly plní tekutinou a erytrocyty, neutrofilů, makrofágy a buněčnými fragmenty
- pneumocyty I. typu jsou poškozené a endotelie zduřené – vzniká intersticiální edém
- byla dokázána vyšší koncentrace  $H_2O_2$  v místě poškození

# Úloha ROS a RNS u plicních nemocí

Další patologické stavy spojené s účastí ROS u zánětu:

- CHOPN – chronická obstrukční plicní nemoc,
- CHB – chronická bronchitida
- bronchiální astma
- kryptogenní fibrotizující alveolitida

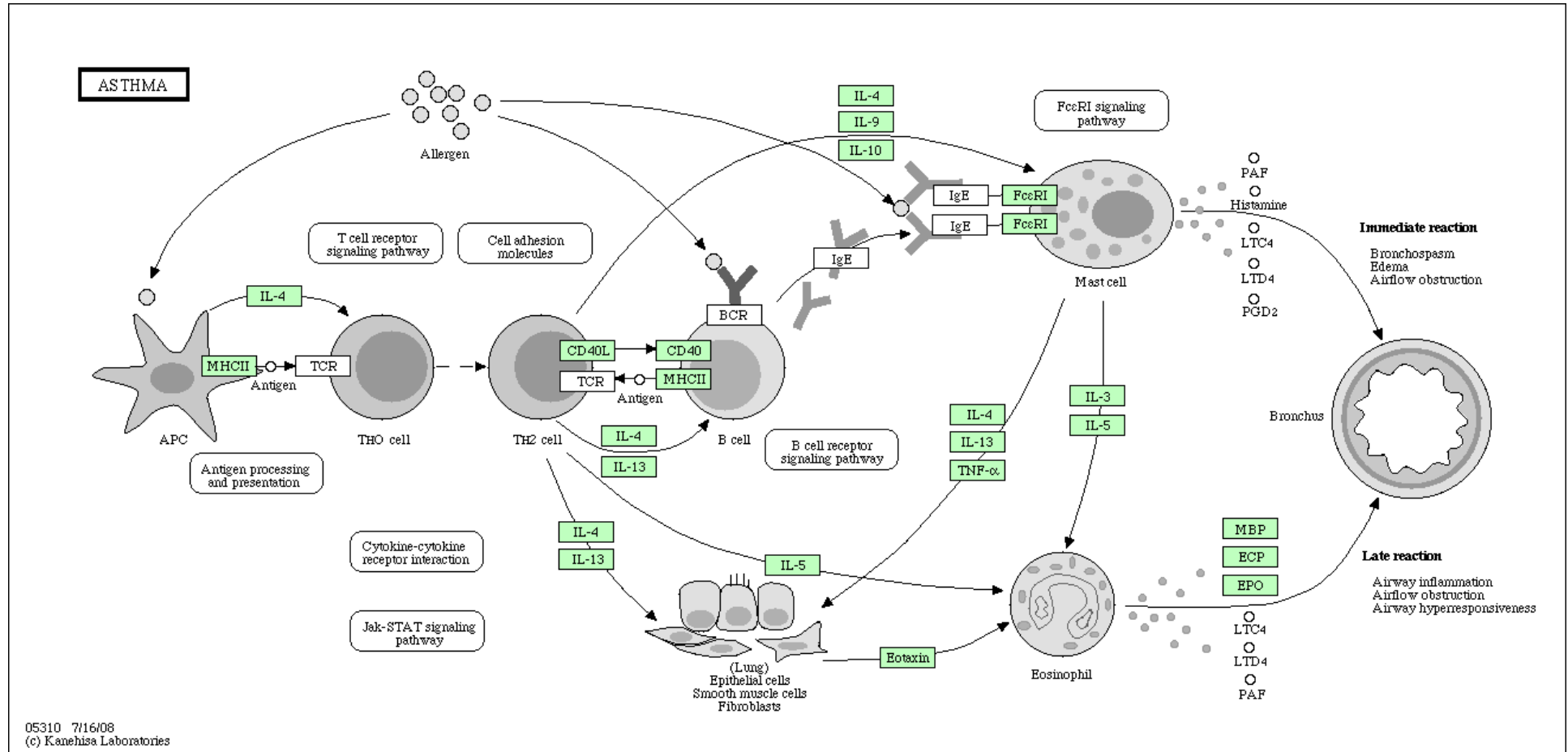


Interaction of inflammatory cells, inflammatory mediators and reflex mechanisms in the airway wall in asthma.



# Úloha ROS a RNS u plicních nemocí

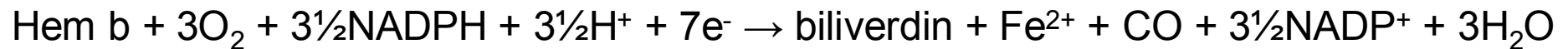
## Interakce imunitních buněk u astmatu



# Úloha ROS a RNS u plicních nemocí

Perspektivy diagnostiky – analýza vydechovaného vzduchu, kondenzátu, resp. sputa

- u astmy – zvýšená koncentrace vydechovaného NO a přítomnost eosinofilů v sputě, zvýšená koncentrace 3-nitrotyrosinu, nitrosothiolů v sputě, zvýšená koncentrace cysteinyl-leukotrienů LTE<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> a 8-isoprostanu v kondenzátu vydechovaného vzduchu
- u kuřáků byla pozorována vyšší koncentrace CO ve vydechovaném vzduchu – souvislost s aktivací hem-oxygenasy 1 (HO-1) aktivované makrofágy



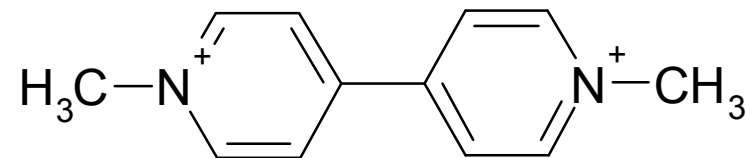
- u všech výše uvedených stavů jsou detekovány zvýšené koncentrace H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a malondialdehydu v kondenzátu
- u kuřáků s COPD – detekovány vyšší koncentrace kovů v kondenzátu (Cd, Pb, Al)

zdroj: Corradi M., Mutti A. Acta Biomed. 2005; 76(Suppl 2): 20–29.

# Úloha ROS a RNS u plicních nemocí

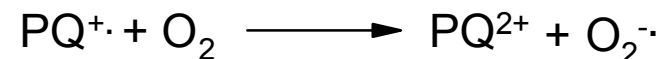
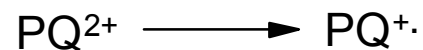
## Pneumotoxické látky

- paraquat – *N,N'*-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichlorid
- herbicid zasahující do elektrontransportního řetězce ve fotosystému I
- patří do skupiny viologenů – radikálové formy jsou zbarveny ( $\lambda_{\max} \approx 600 \text{ nm}$ )



2 Cl<sup>-</sup>

- v lidském organizmu je vychytáván polyamínovým systémem a akumulován v plicích
- je metabolizován na stabilní kation-radikál enzymaticky NADPH-cytochrom P-450 reduktasou (Clejan and Cederbaum, 1989), NADH:ubichinon oxidoreduktasou (complex I) (Fukushima et al., 1993; Yamada and Fukushima, 1993), xantinoxidasou (XO) (Winterbourn, 1981; Kelner et al., 1988; Waintrub et al., 1990; Kitazawa et al., 1991), nebo NO-synthasou (NOS) (Day et al., 1999) a následně s kyslíkem je regenerován na dikationt a superoxid (vytváří se redoxní cyklus)





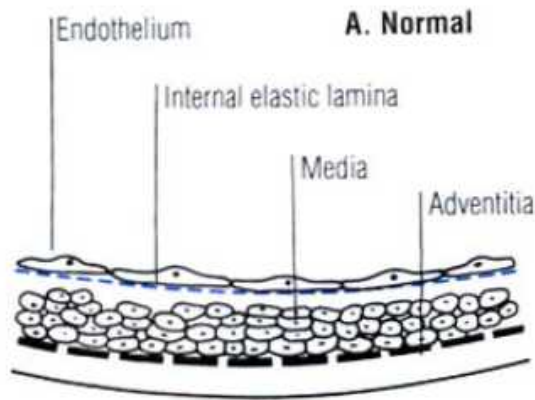
# Úloha ROS a RNS u kardiovaskulárních nemocí

## Rizikové faktory

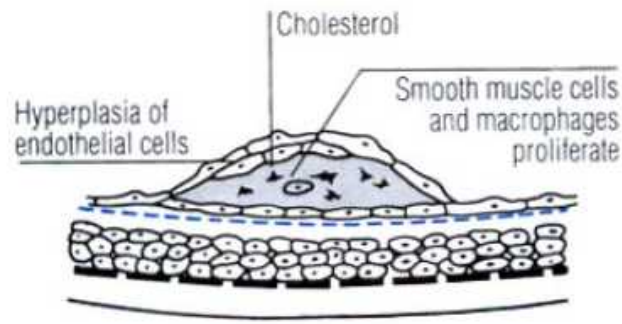
- zvýšené koncentrace celkového cholesterolu (TC), LDL-cholesterolu (LDL-C), snížené koncentrace HDL-cholesterolu (HDL-C), arteriální hypertenze, kouření, diabetes mellitus (DM), oxidační stres

## Patologické stavy

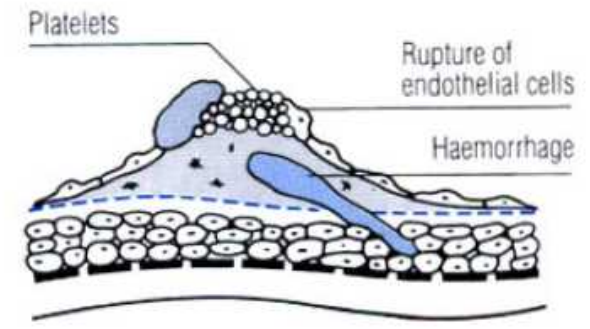
- dysfunkce endotelu a ateroskleróza
- ischemicko-reperfuční syndrom, transplantace srdce, akutní infarkt myokardu, subakutní a chronická ischemická choroba srdeční, reperfuží-indukované arytmie, kongestivní srdeční selhání, srdeční hypertrofie



**B. Atheromatous plaque**



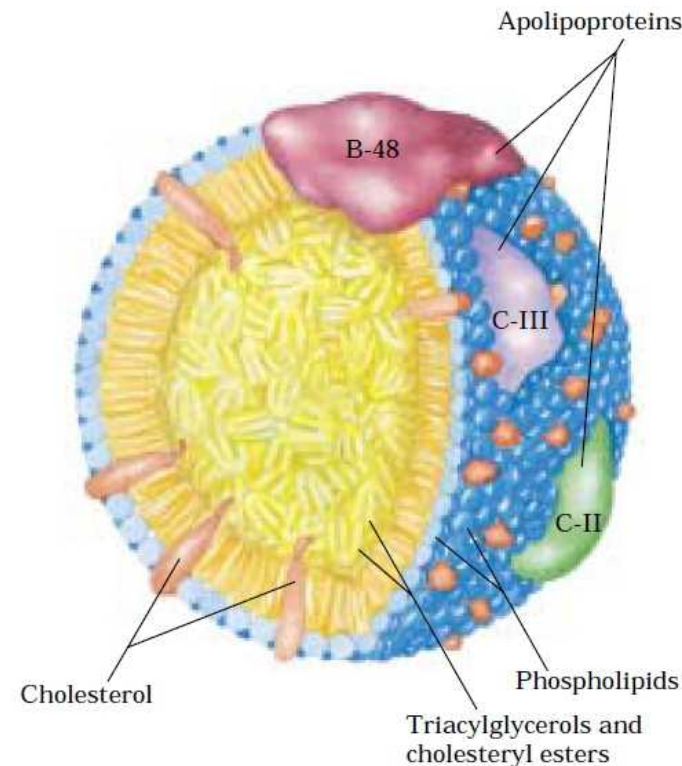
**C. Plaque dissection and acute expansion**



# Úloha ROS a RNS u kardiovaskulárních nemocí

## Ateroskleróza

- významný vplyv na poškození endotelu má poměr koncentrace NO a superoxidu
- NO má antiaterogenní efekt – způsobuje vazodilataci, snižuje adhezi a agregabilitu krevních destiček, snižuje adhezi a migraci leukocytů, snižuje produkci superoxidu, snižuje oxidaci LDL, snižuje syntézu DNA, mitogenezi a proliferaci buněk hladké svaloviny
- při zvýšeném poměru koncentrace superoxidu a NO dochází ke tvorbě ONOO<sup>-</sup> a oxidačnímu poškození endotelu



**FIGURE 17-2 Molecular structure of a chylomicron.** The surface is a layer of phospholipids, with head groups facing the aqueous phase. Triacylglycerols sequestered in the interior (yellow) make up more than 80% of the mass. Several apolipoproteins that protrude from the surface (B-48, C-III, C-II) act as signals in the uptake and metabolism of chylomicron contents. The diameter of chylomicrons ranges from about 100 to 500 nm.

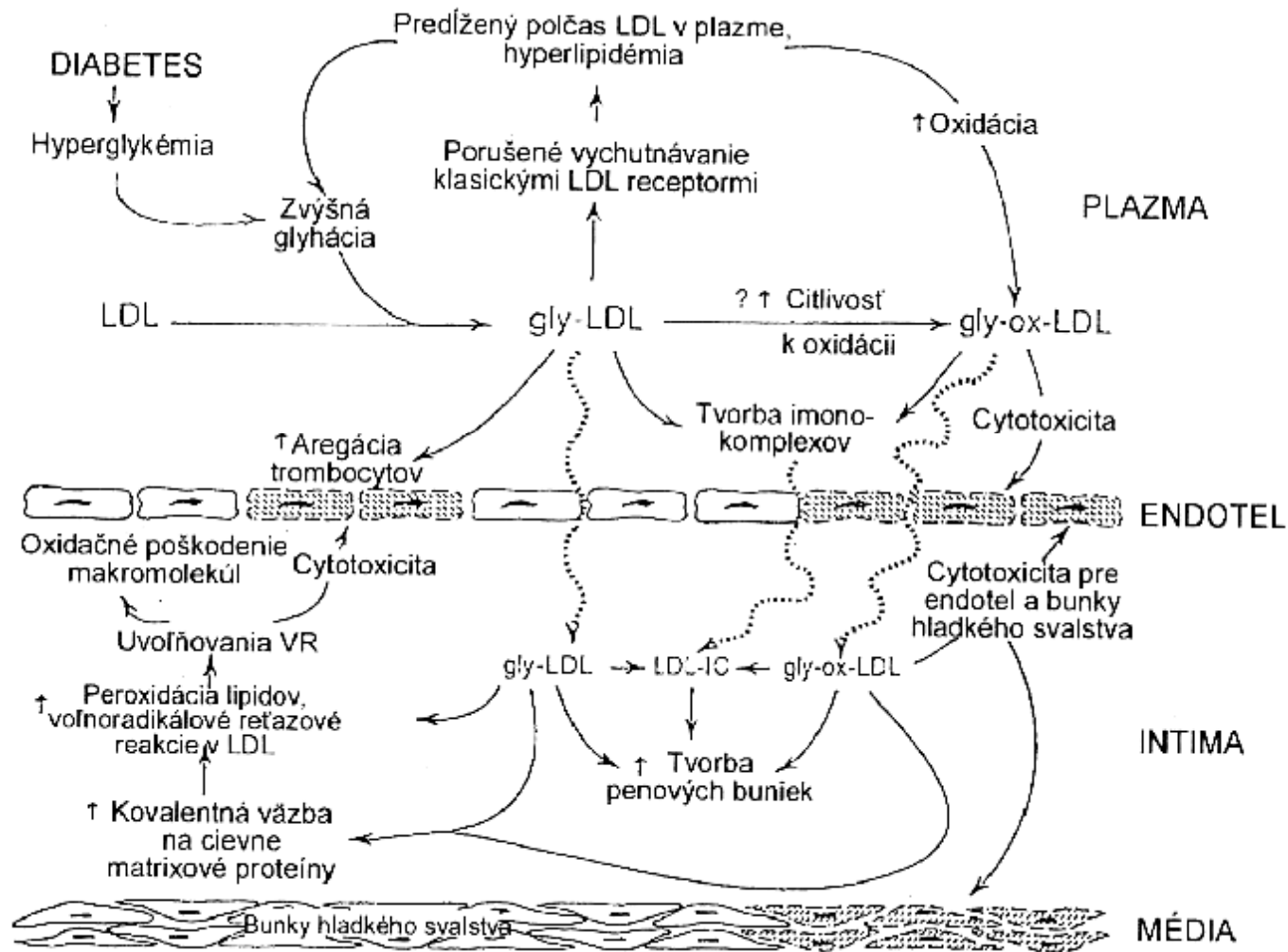
# Úloha ROS a RNS u kardiovaskulárních nemocí

## Low-density lipoprotein (LDL)

- má molekulovou hmotnost asi 2500 kDa, jádro obsahuje asi 1600 molekul esterů cholesterolu a 200 molekul triacylglycerolů; vnější obal je tvořen asi ze 700 molekul fosfolipidů, 600 molekul cholesterolu a apolipoproteinu B-100
- na efektorových buňkách (téměř všechny buňky) – receptor pro LDL, který rozpoznává právě apolipoprotein B-100, jeho molekulová hmotnost je asi 160 kDa
- jsou citlivé ke oxidaci a povrchové modifikaci (glykace, acylace)
- potom nemůžou být rozpoznány LDL-receptorem efektorových buněk, ale cirkulují krevním řečištěm
- poškozením fosfolipidové obálky získávají toxický potenciál pro endotel, jsou schopny pronikat do cévní stěny
- jsou rozpoznatelné pro makrofágy – vznikají pěnové buňky
- působením volných radikálů, produkovaných makrofágy dochází k iniciaci lipoperoxidace
- buňky hladké svaloviny a makrofágy produkují cytokiny a dochází k chemotaxi dalších monocytů

# Úloha ROS a RNS u kardiovaskulárných nemocí

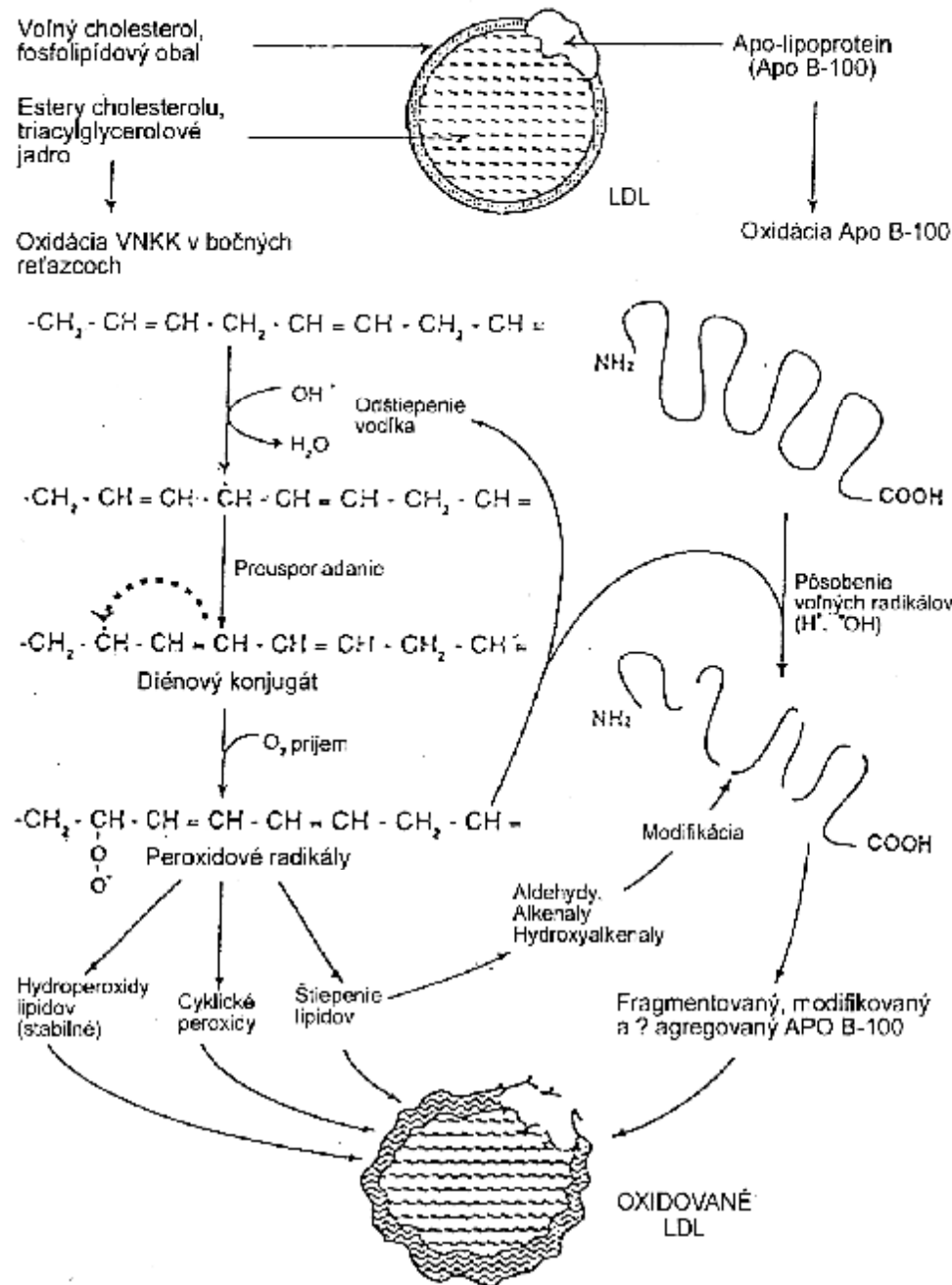
Obr. 5.2. Mechanizmus glykácie a glykooxidácie LDL u pacientov s diabetes mellitus



(podľa Lyons, 1992)

# Úloha ROS a RNS u kardiovaskulárných nemocí

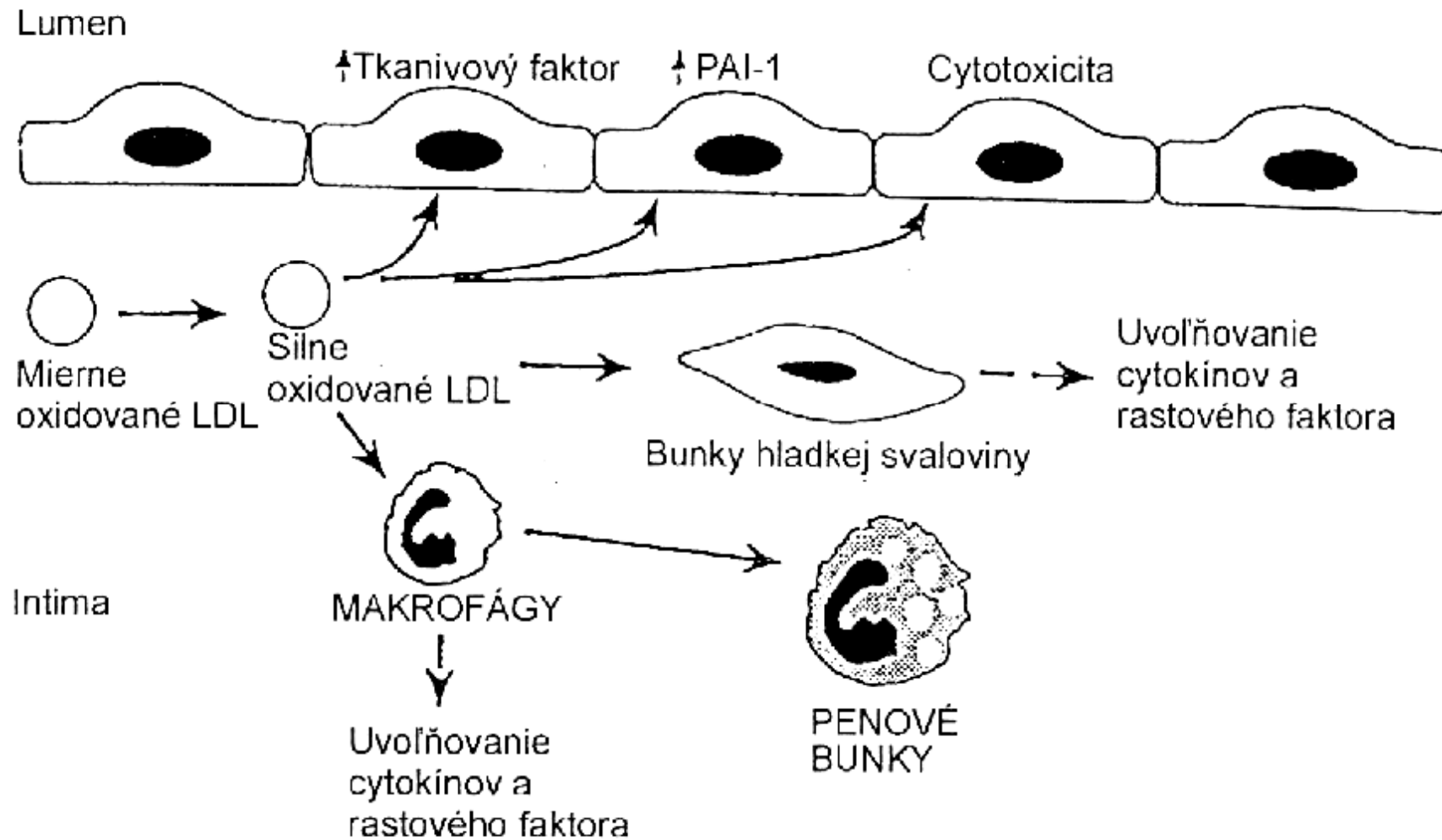
Obr. 5.3. Oxidačné poškodenie LDL – lipidovej aj proteínovej časti



(podľa Lyons, 1991)

# Úloha ROS a RNS u kardiovaskulárných nemocí

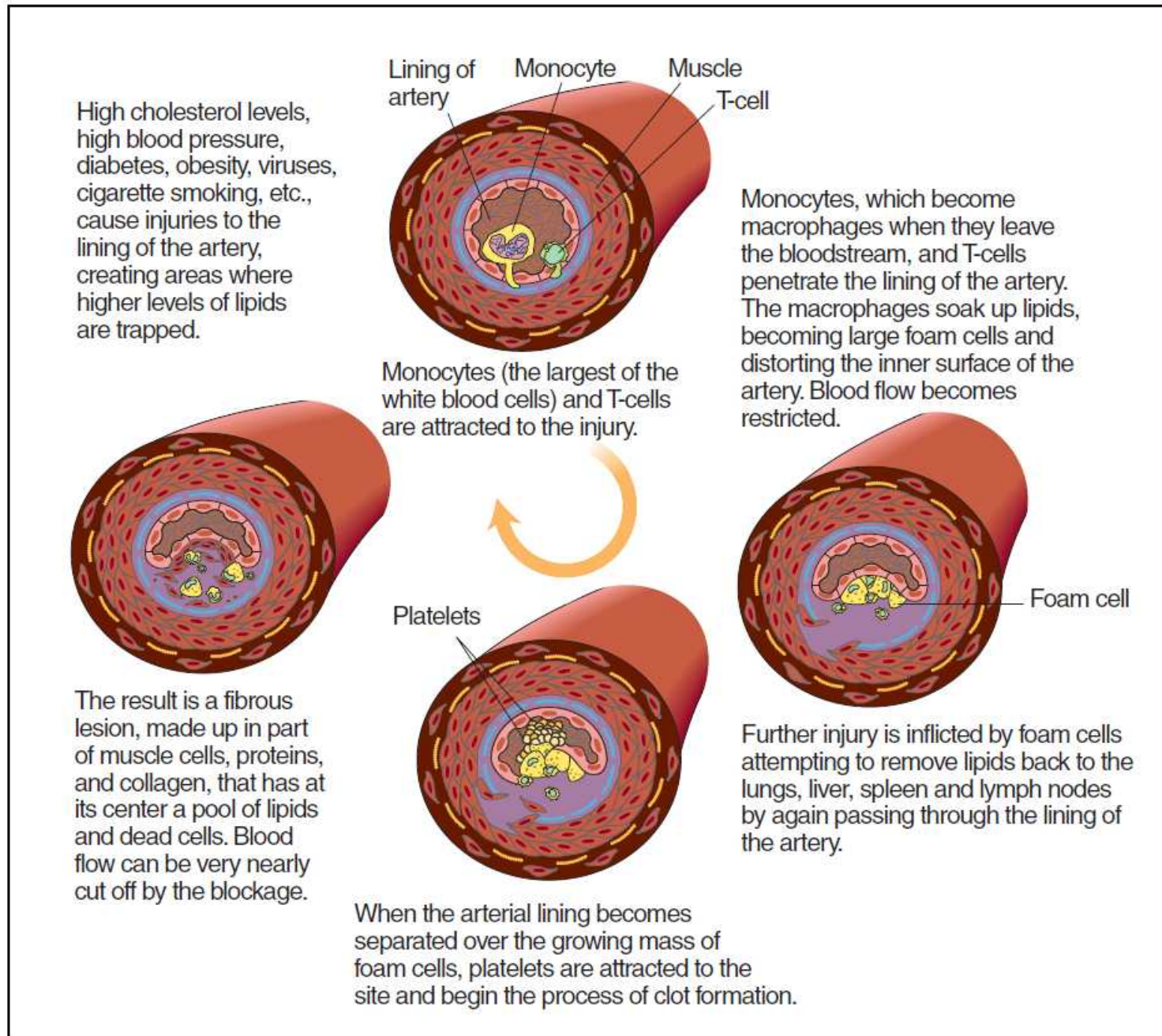
Obr. 5.6. Biologické účinky silne oxidovaných LDL



(podľa O'Brien a Chait, 1994)



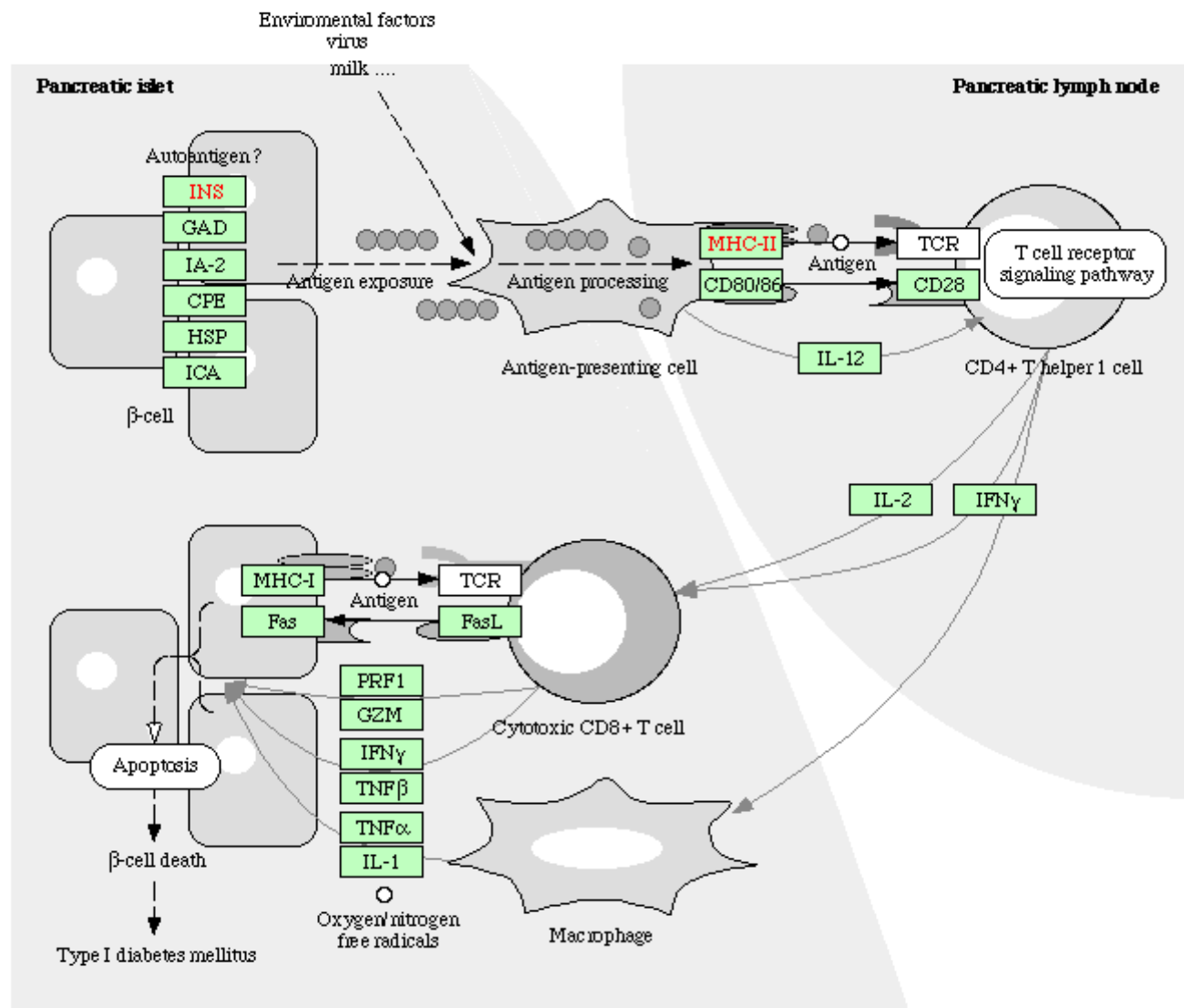
# Úloha ROS a RNS u kardiovaskulárních nemocí



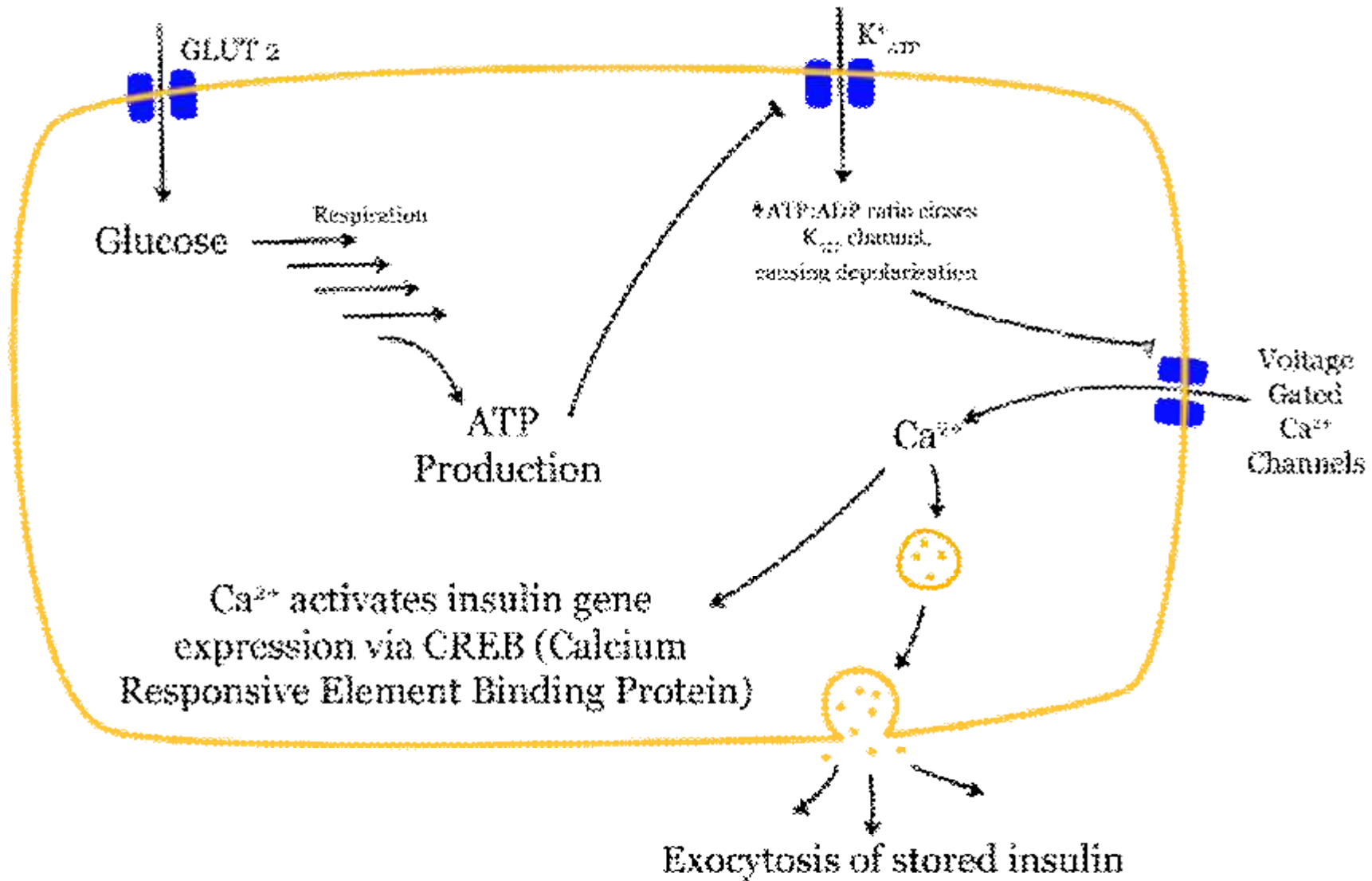


# Úloha ROS a RNS u diabetes mellitus

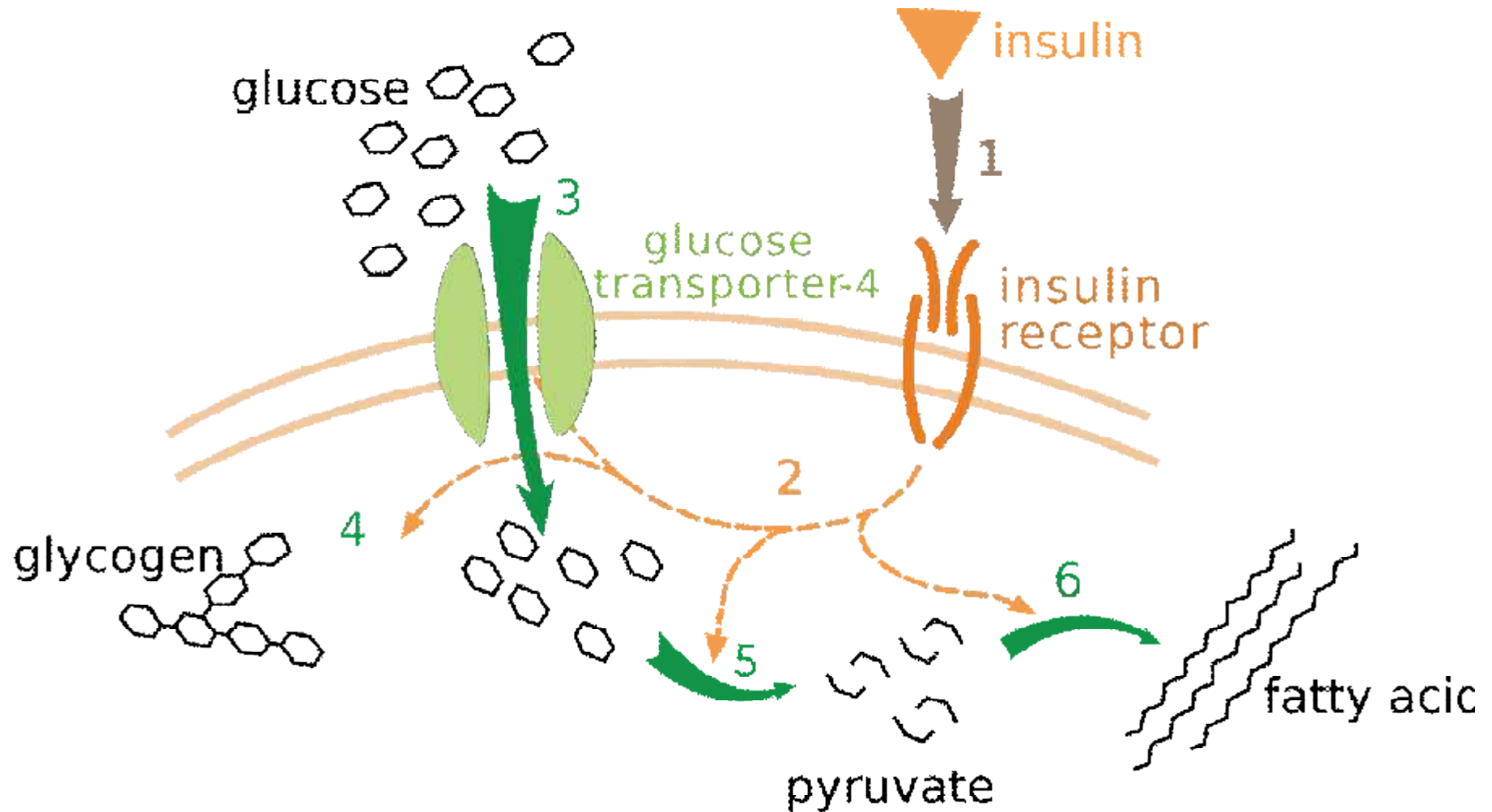
## TYPE I DIABETES MELLITUS



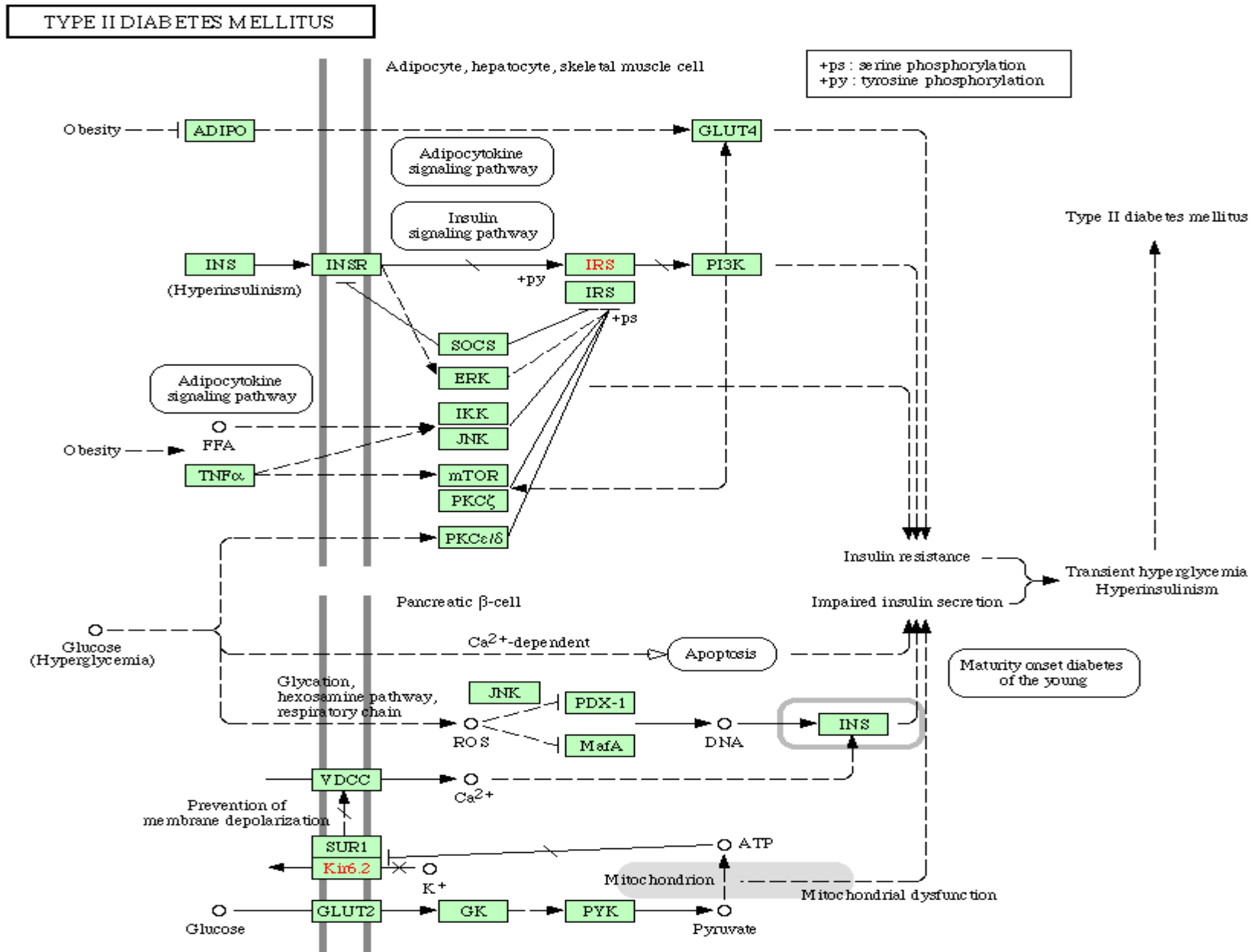
# Úloha ROS a RNS u diabetes mellitus



# Úloha ROS a RNS u diabetes mellitus



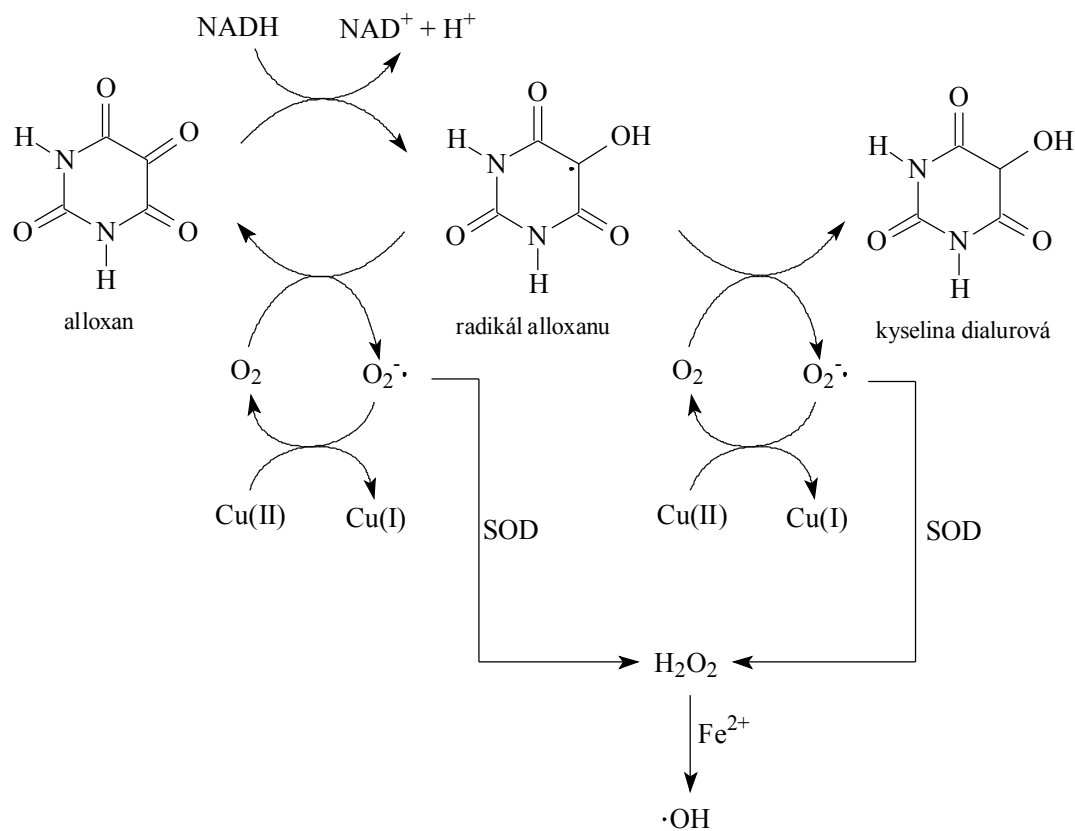
# Úloha ROS a RNS u diabetes mellitus



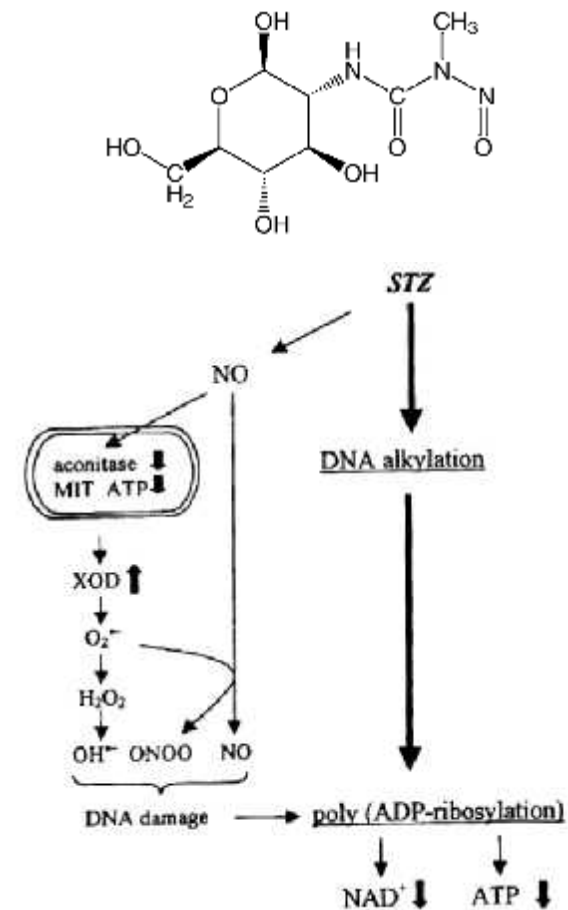
# Úloha ROS a RNS u diabetes mellitus

## Diabetogenní látky

### Alloxan – model DM I



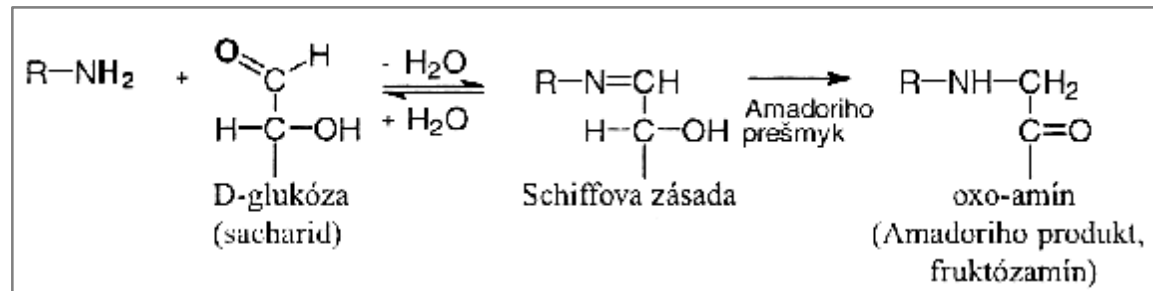
### Streptozotocin – model DM I i DM II



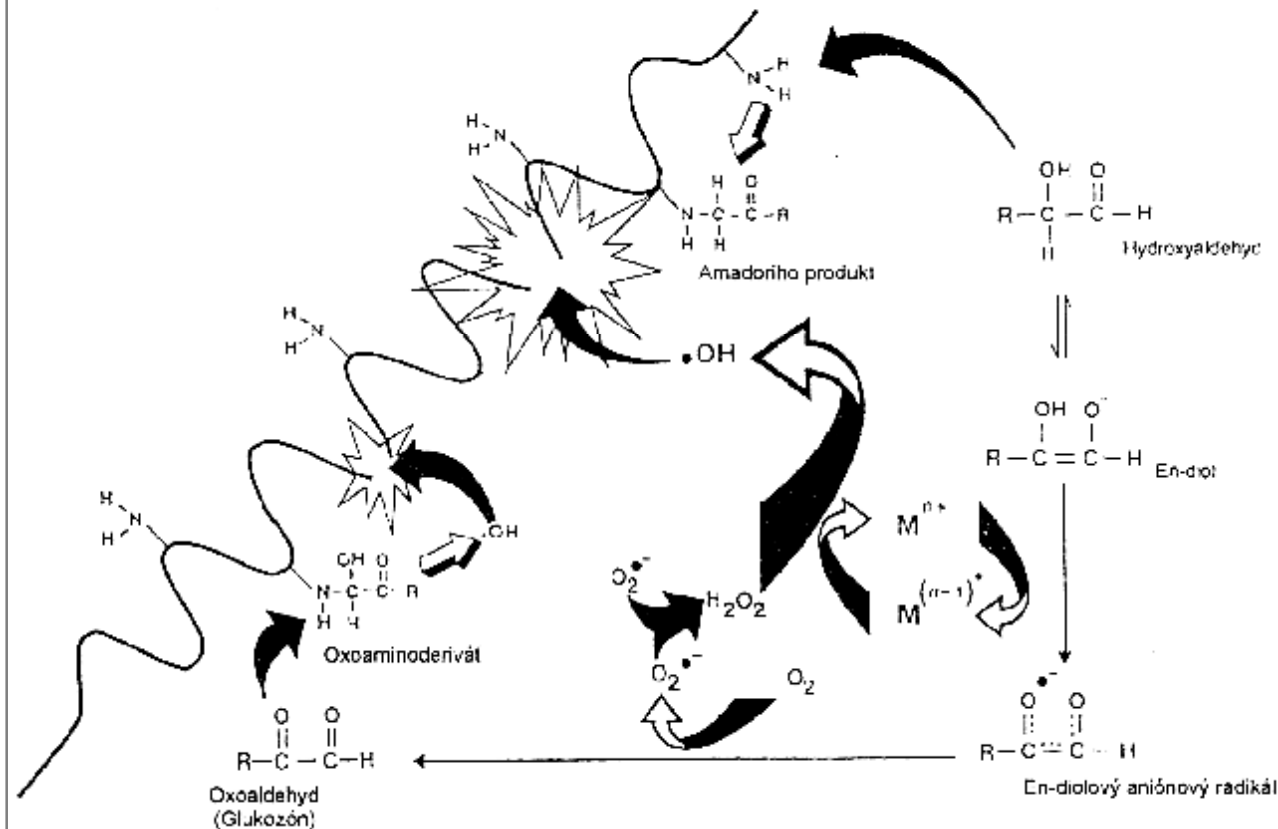
**Fig. 2.** The mechanism of streptozotocin (STZ)-induced toxic events in B cells of rat pancreas. MIT – mitochondria; XOD – xanthine oxidase

# Úloha ROS a RNS u diabetes mellitus

## Maillardova reakce



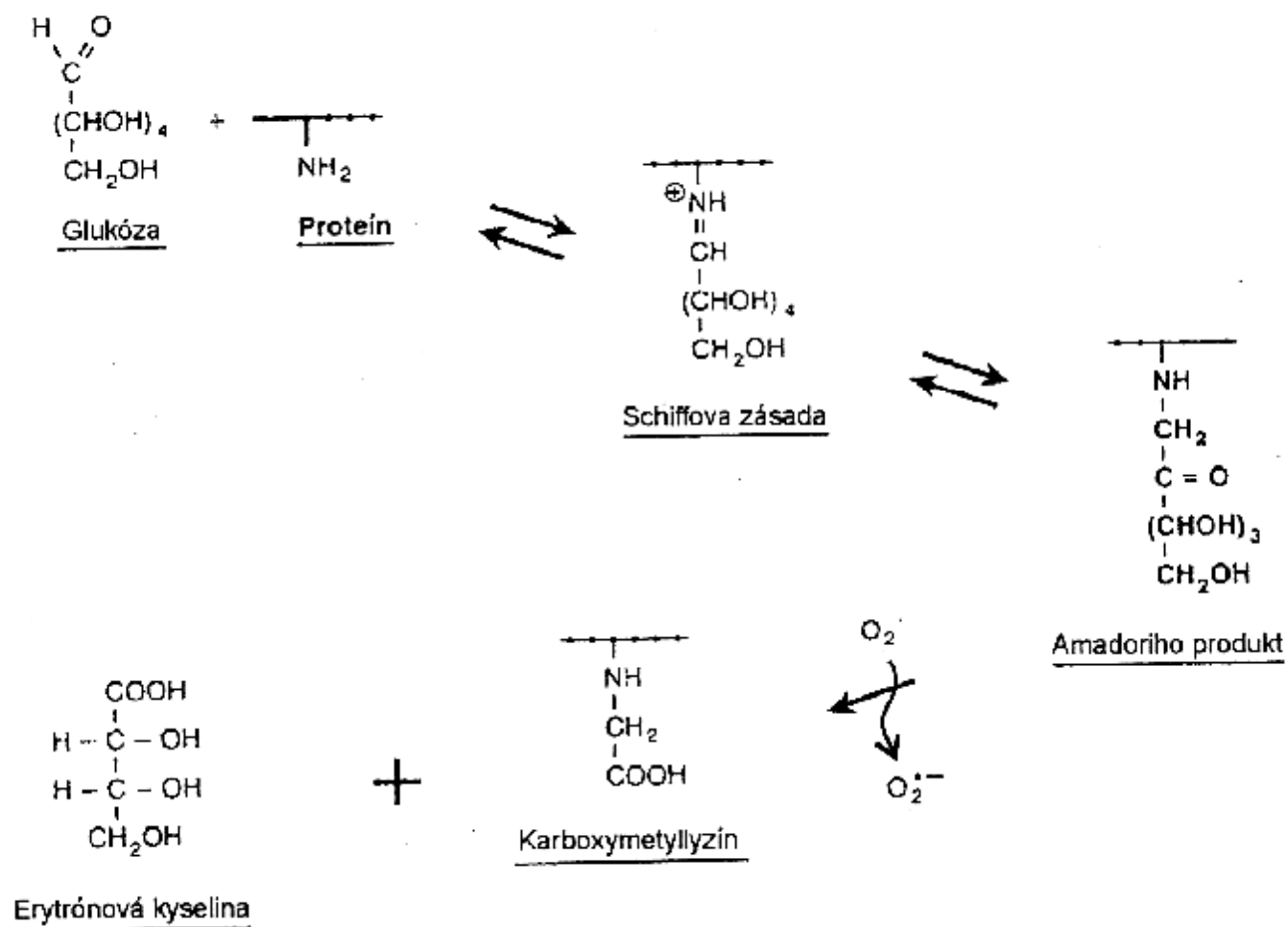
Obr. 6.2. Fragmentácia polypeptidových reťazcov hydroxylovým radikálom vznikajúcim pri autooxidácii redukovaných sacharidov a Amadoriho produktu (Hunt a kol., 1988)



# Úloha ROS a RNS u diabetes mellitus

## Karboxymethyllysin (CML)

Obr. 6.6. Oxidačná degradácia Amadoriho produktu na karboxymetyllyzín (Brownlee, 1989)

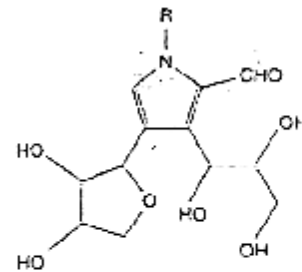




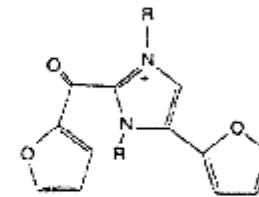
# Úloha ROS a RNS u diabetes mellitus

Obr.6.5. Chemické štruktúry AGEs (Janebová a kol., 1999)

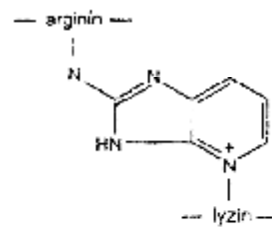
Produkty pokročilé glykace proteinů (AGE)



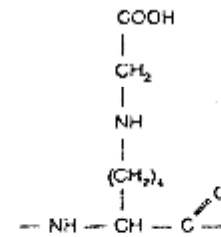
1-alkyl-2-formyl-3,4-diglukozyf-pyrol  
AFPG



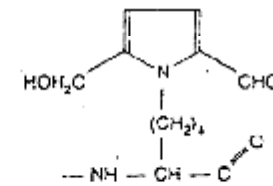
2,2-(furoyl)-4(5)-(2-furanyl)-1H-imidazol  
FFI



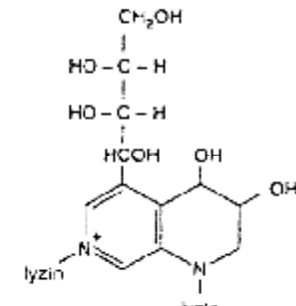
imidazo(4,5-b)pyridinium  
pentozidin



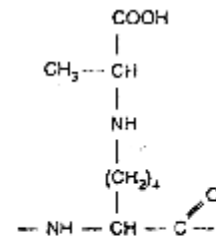
N $\epsilon$ -(karboxymetyl)lyzín  
CML



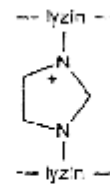
5-hydroxy-metyl-  
1-alkyl-pyrol-2-karbaldehyd  
pyralín



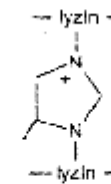
produkt: zosietenia  
crossline



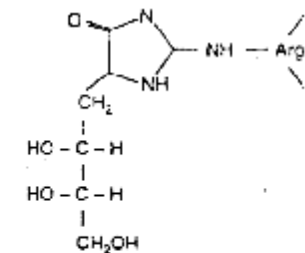
N $\epsilon$  (karboxyetyl)lyzín  
CEL



glyoxál-lyzín dimér  
GOLD



malylglyoxál-lyzín dimér  
MOLD



3-deoxyglukozón-argininimidazolón  
3DG-Arg-imidazolón

# Úloha ROS a RNS u diabetes mellitus

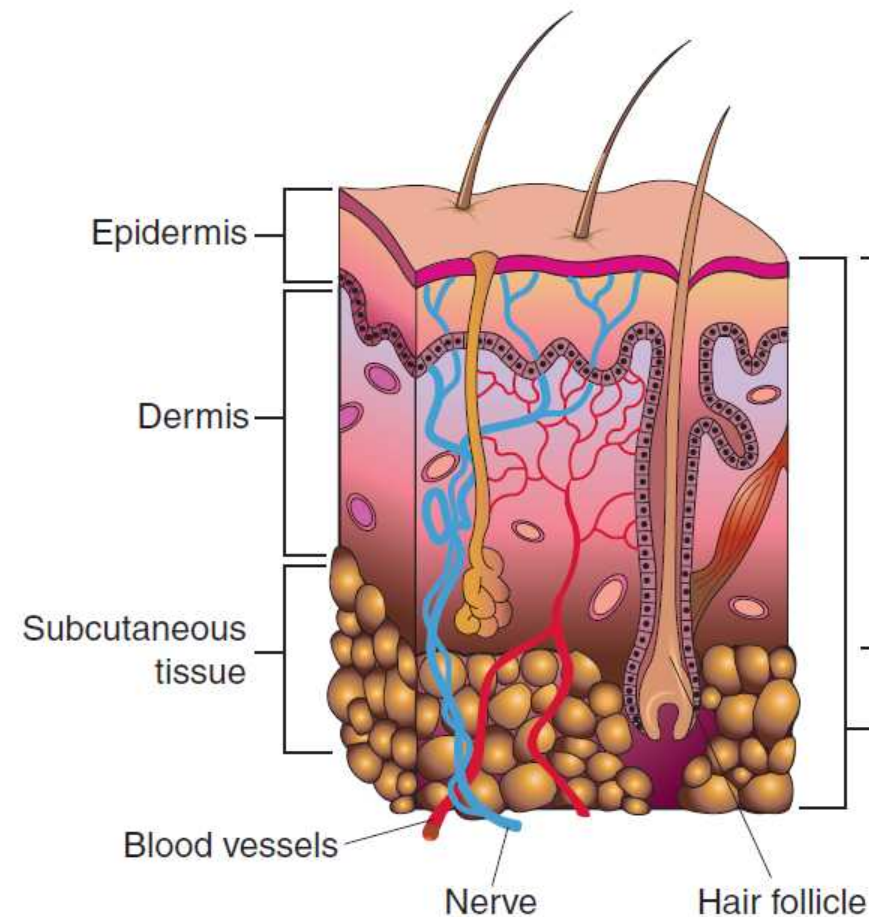
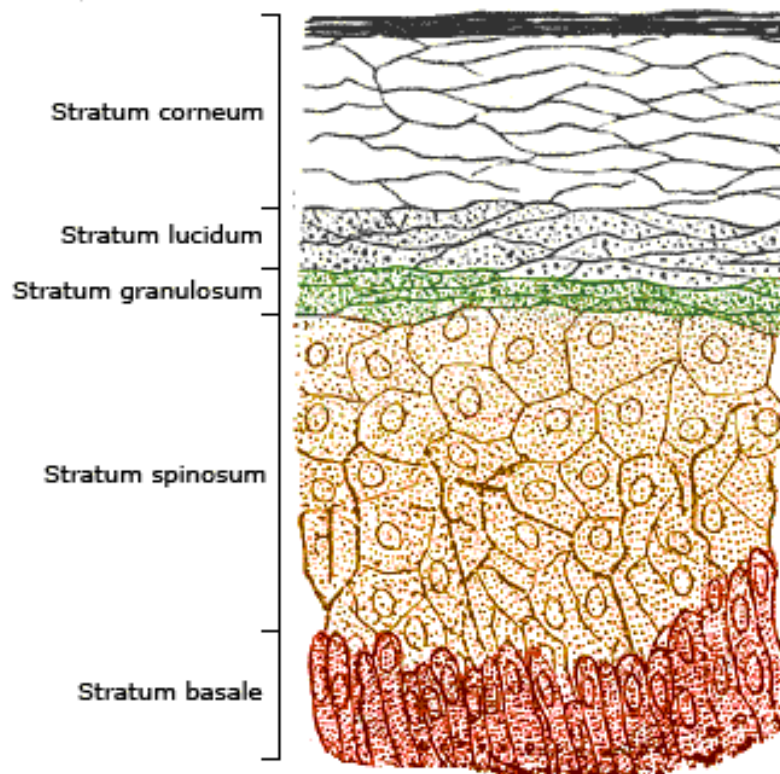
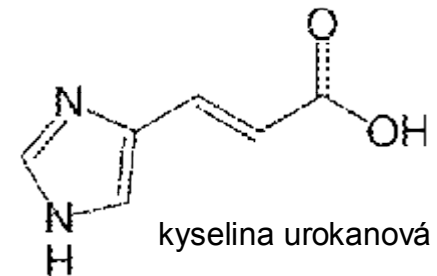
Produkty pokročilé glykace proteinů (AGE)

- jsou schopny samotné tvořit superoxid nebo  $H_2O_2$
- monocyty a makrofágy mají speciální receptory pro AGE, tzv. RAGE
- interakce s nimi vede k imunitní odpovědi, nadprodukcí adhezních molekul a lokálnímu poškození tkání
- AGE-modifikované proteiny mohou aktivovat procesy nadměrné proliferace cév, což se projevuje zejména u diabetické retinopatie
- modifikací metabolismu glukózy a aktivací polyolové cesty se v buňkách mění poměr  $NADPH/NADP^+$  a stoupá poměr  $NADH/NAD^+$ , což je situace podobná hypoxii
- hyperglykemická hypoxie a nadbytek  $NADH$  vede k zvýšené syntéze diacylglycerolu (DAG) a při zvýšené retenci  $Ca^{2+}$  v buňce k aktivaci proteinkinasy C (PKC), zvyšuje syntézu prostaglandinů, endotelinu 1 a snižuje syntézu NO
- tím přispívá ke vazokonstrikci v sítnici a moduluje hemodynamiku v ledvinách

# Úloha ROS a RNS u radiačního poškození kůže

Hlavní chromofory kůže:

- nukleové kyseliny
- aminokyseliny tyrosin a tryptofan
- bílkoviny
- melaniny
- lipidy, zejména obsahující PUFA
- kyselina urokanová



# Úloha ROS a RNS u poškození kůže

Zdroje poškození:

- UV C záření
  - energeticky nejbohatší, pohlcováno ozonovou vrstvou, 200-290 nm, je schopno přímého poškození DNA (zejména tvorba cross-links)
- UV B záření
  - 290-320 nm, způsobuje zejména úžeh, proniká do *stratum corneum*, může poškozovat DNA a proteiny přímým i nepřímým způsobem, podporuje tvorbu ROS, zejména singletového kyslíku, superoxidu, peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu
- UV A záření
  - 320-400 nm je odpovědné za většinu senzibilizačních a fototoxických reakcí, podporuje tvorbu ROS, zejména singletového kyslíku, superoxidu, peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu
- tepelné poškození
- radiace
- trauma

## Úloha ROS a RNS u poškození kůže

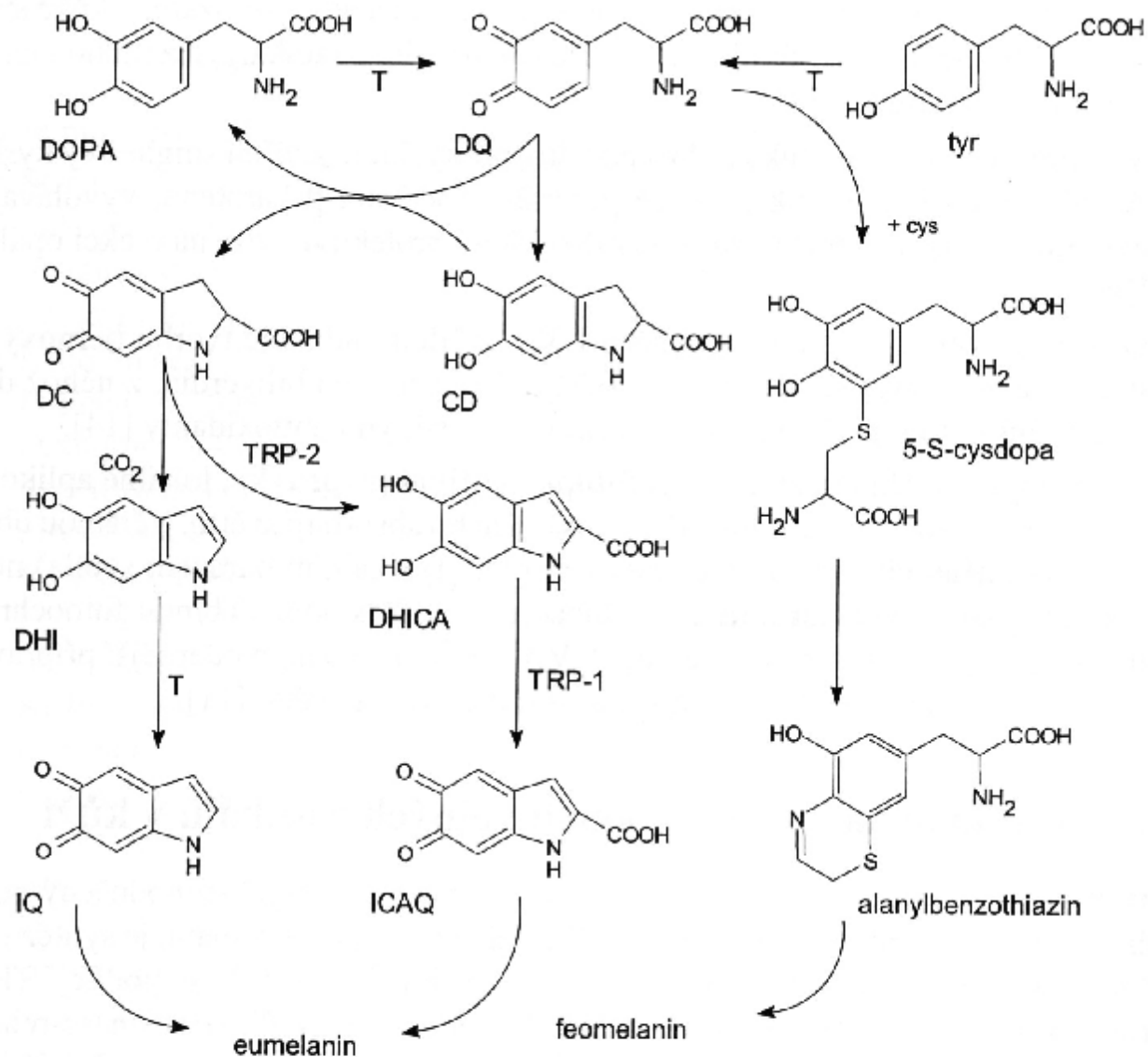
Specifické antioxidační systémy kůže:

- keratinizace
- melaninová pigmentace – absorpce fotonů a proměna na teplo, pseudodizmutázová aktivita
- kyselina *trans*-urokanová
- antioxidační enzymy, zejména SOD, peroxidasa, katalasa, GSH-peroxidasa
- nízkomolekulové antioxidanty – vit. E, GSH, cystein,
- v dermis se hromadí karoteny – výborné zhášecí singletového kyslíku
- ozáření UV A indukuje tvorbu HO-1 a její aktivitou vznikají z hemu biliverdin a bilirubin

**Tab. 10** Mechanismy tvorby volných radikálů fotoreakcemi za účasti melaninu [8]

<i>Přímé fotoreakce</i>	<i>Fotoreakce se senzibilizátorem</i>
$M(\cdot)_n + h\nu \rightarrow M(\cdot)_n^* \rightarrow M(\cdot)_{n+x}$	$S + h\nu \rightarrow S^*$
$M(\cdot)_n^* + O_2 \rightarrow M(\cdot)_n^{ox} + O_2^{\bullet-}$	$S^* + M(\cdot)_n \rightarrow S + M(\cdot)_{n+x}$
$M(\cdot)_{n+x} + O_2 \rightarrow M(\cdot)_n^{ox} + O_2^{\bullet-}$	$S^* + O_2 \rightarrow S + {}^1O_2$
$2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \xrightarrow{M(\cdot)_n} O_2 + H_2O_2$	

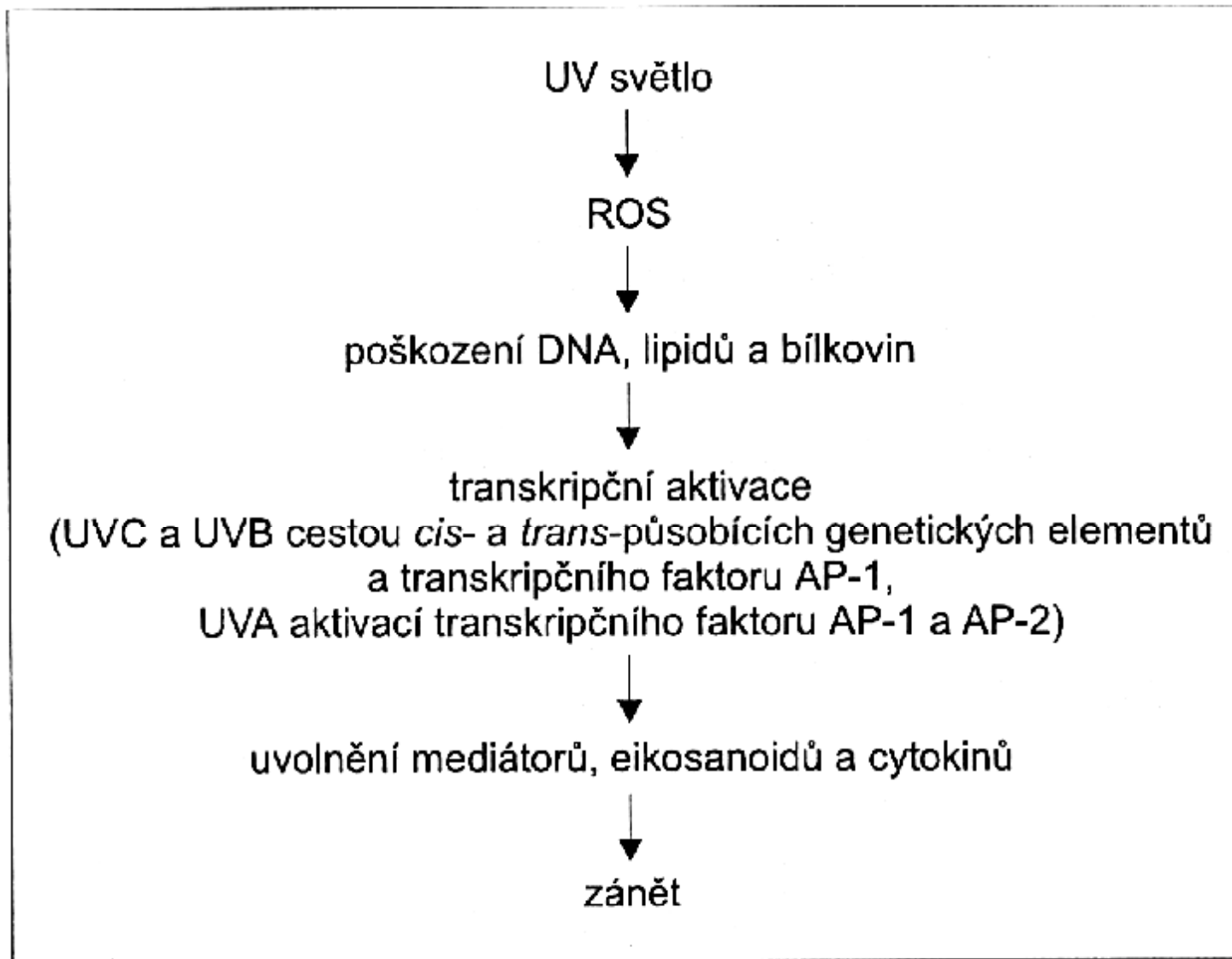
# Tvorba melaninu



**Obr. 42** Raper-Masonovo schéma melanogeneze

T – tyrozináza, TRP-1 – „tyrosinase-related“ protein 1, TRP-2 – „tyrosinase-related“ protein 2, tyr – tyrozin, cys – cystein, DQ – dopachinon, DC – dopachrom, CD – leukodopachrom (cyklodopa), DHI – 5,6-dihydroxyindol, DHICA – 5,6-dihydroxyindol-2-karboxylová kyselina, IQ – indol-5,6-chinon, ICAQ – indol-5,6-chinon-2-karboxylová kyselina, 5-S-cysdopa – 5-S-cysteinylDopa

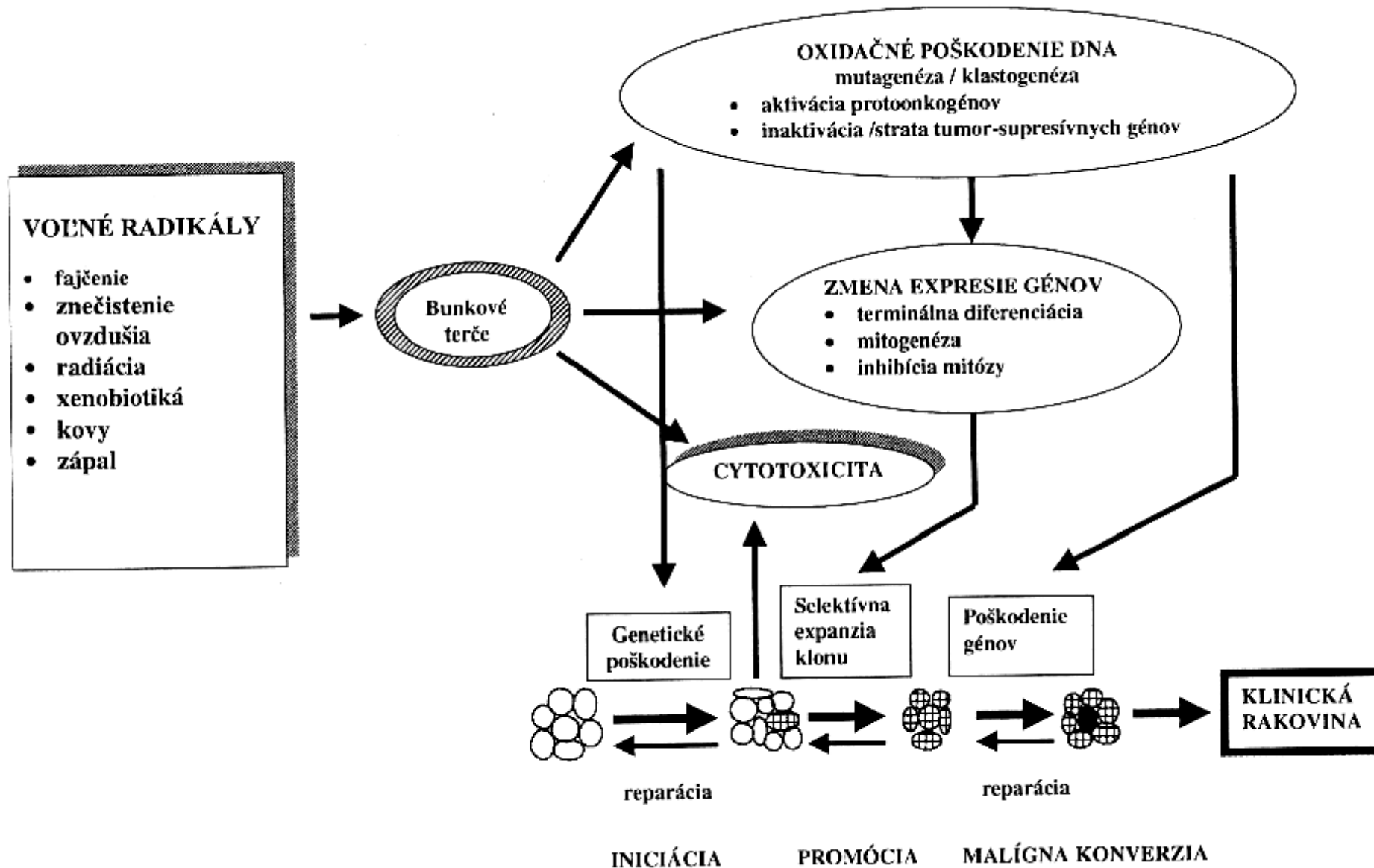
## Úloha ROS a RNS u poškození kůže



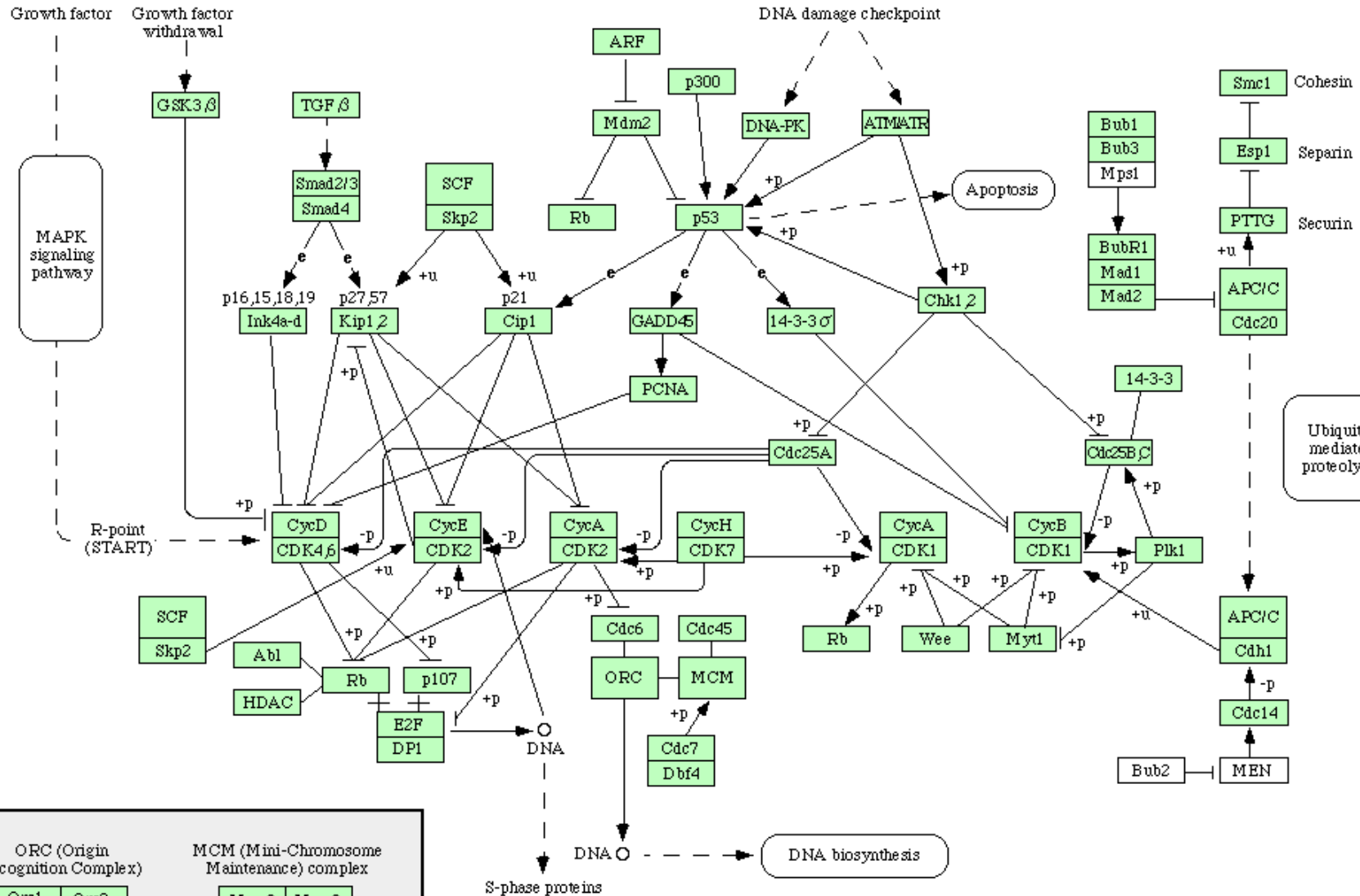
*Působení ultrafialového světla v kůži*



# Úloha ROS a RNS v karcinogenezi



CELL CYCLE



ORC (Origin Recognition Complex)

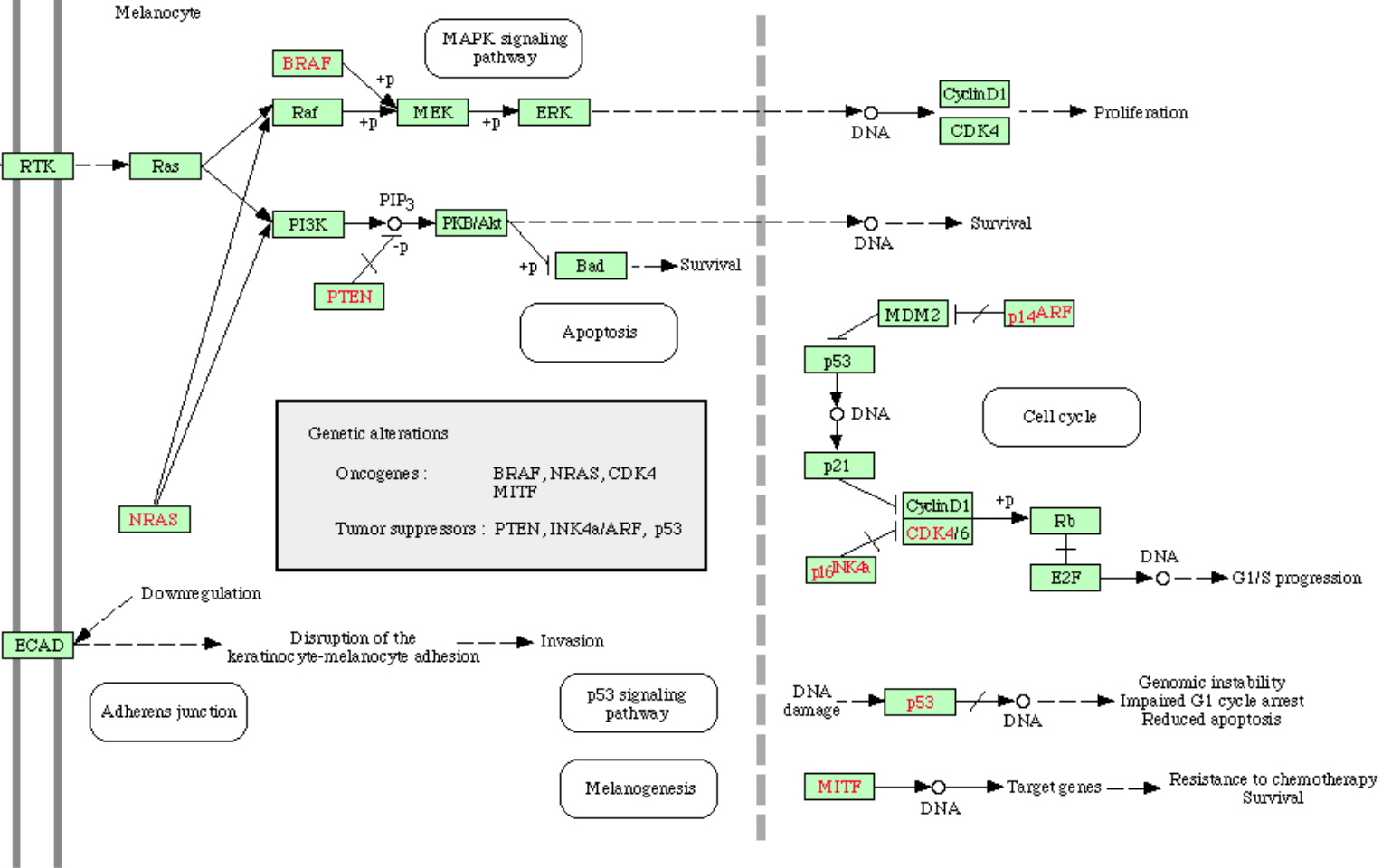
Orc1	Orc2
Orc3	Orc4
Orc5	Orc6

MCM (Mini-Chromosome Maintenance) complex

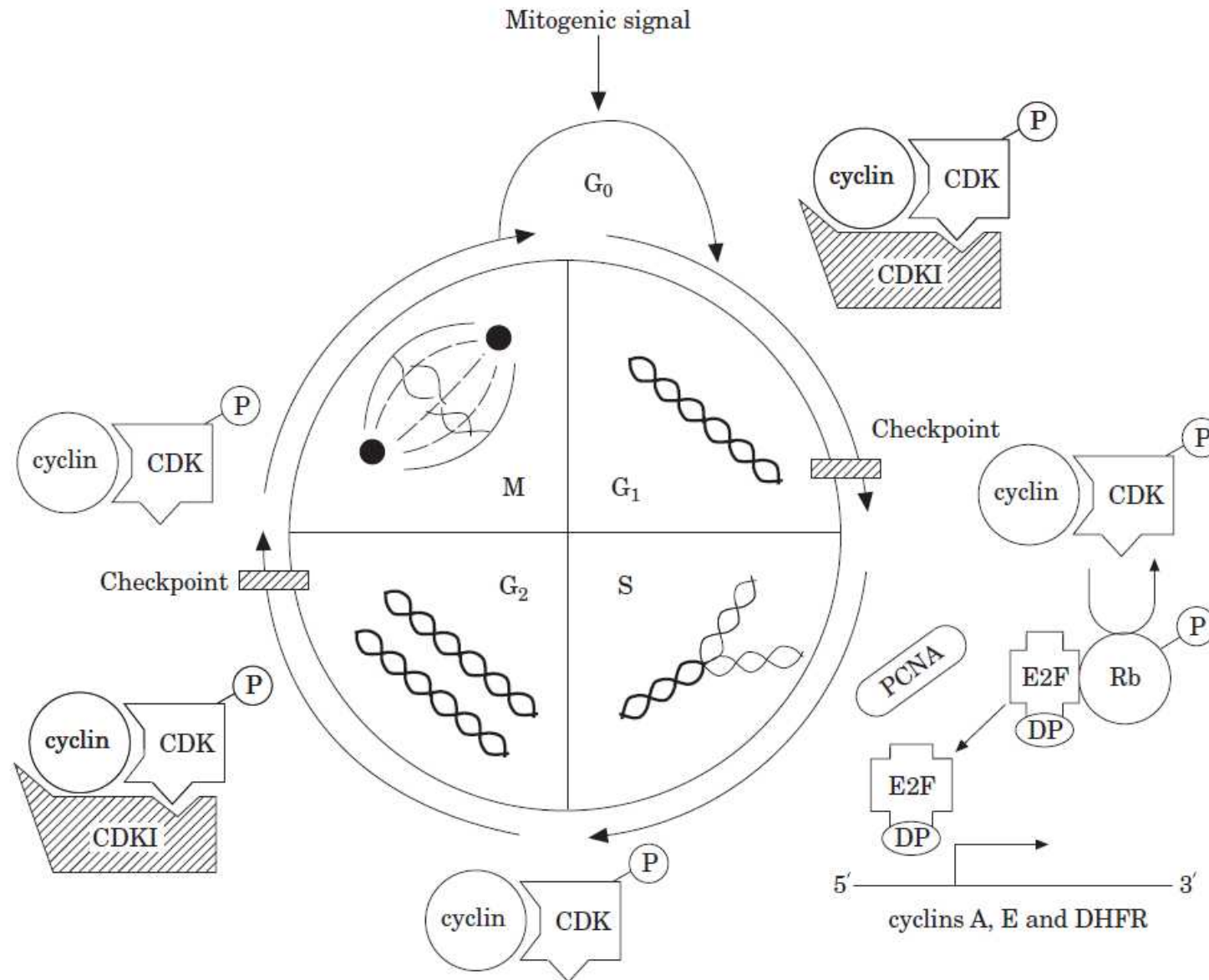
Mcm2	Mcm3
Mcm4	Mcm5
Mcm6	Mcm7

**MELANOMA**

Normal melanocyte  
 Benign nevus  
 Dysplastic nevus  
 Radial-growth phase  
 Vertical-growth phase  
 Metastatic melanoma

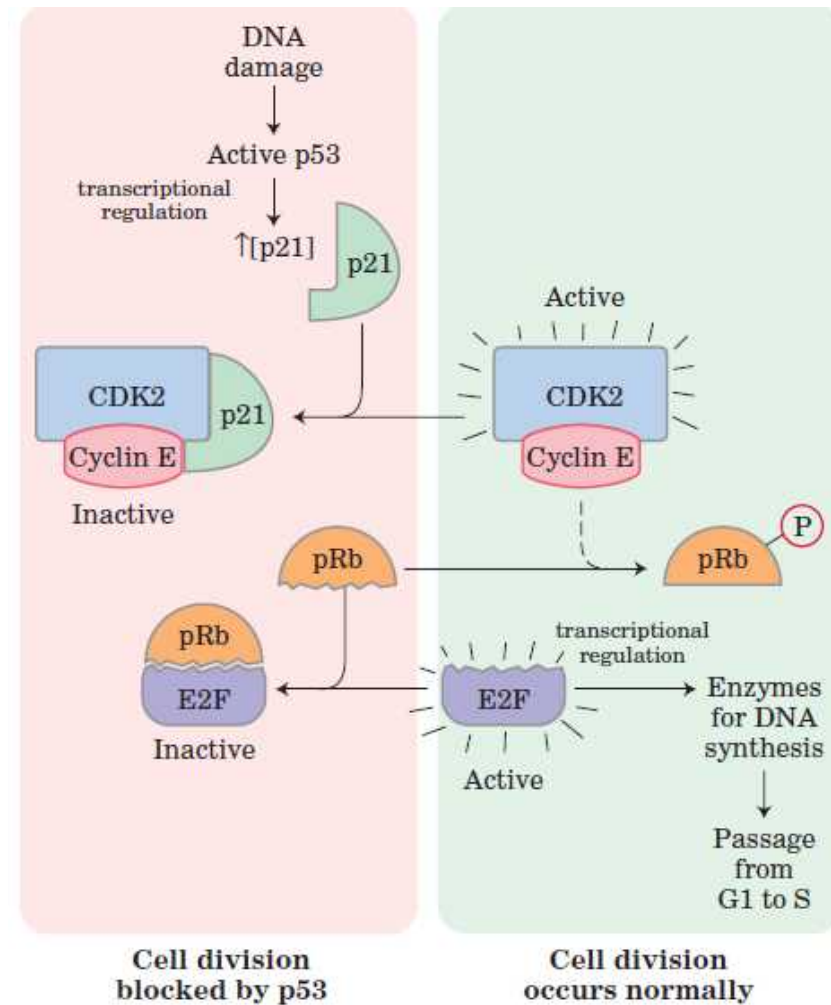


# Úloha ROS a RNS v karcinogenezi



**Figure 1** Diagram to show the progression of the mammalian cell cycle and the relationship between regulatory molecules involved in cell cycle control.

# Úloha ROS a RNS v karcinogenezi



**FIGURE 12-46** Regulation of passage from G1 to S by phosphorylation of pRb. When the retinoblastoma protein, pRb, is phosphorylated, it cannot bind and inactivate E2F, a transcription factor that promotes synthesis of enzymes essential to DNA synthesis. If the regulatory protein p53 is activated by ATM and ATR, protein kinases that detect damaged DNA, it stimulates the synthesis of p21, which can bind to and inhibit cyclin E-CDK2 and thus prevent phosphorylation of pRb. Unphosphorylated pRb binds and inactivates E2F, blocking passage from G1 to S until the DNA has been repaired.

# COLORECTAL CANCER

Chromosome Unstable (CIN) pathway  
Microsatellite Unstable (MSI) pathway

Normal epithelium

Dysplastic ACF

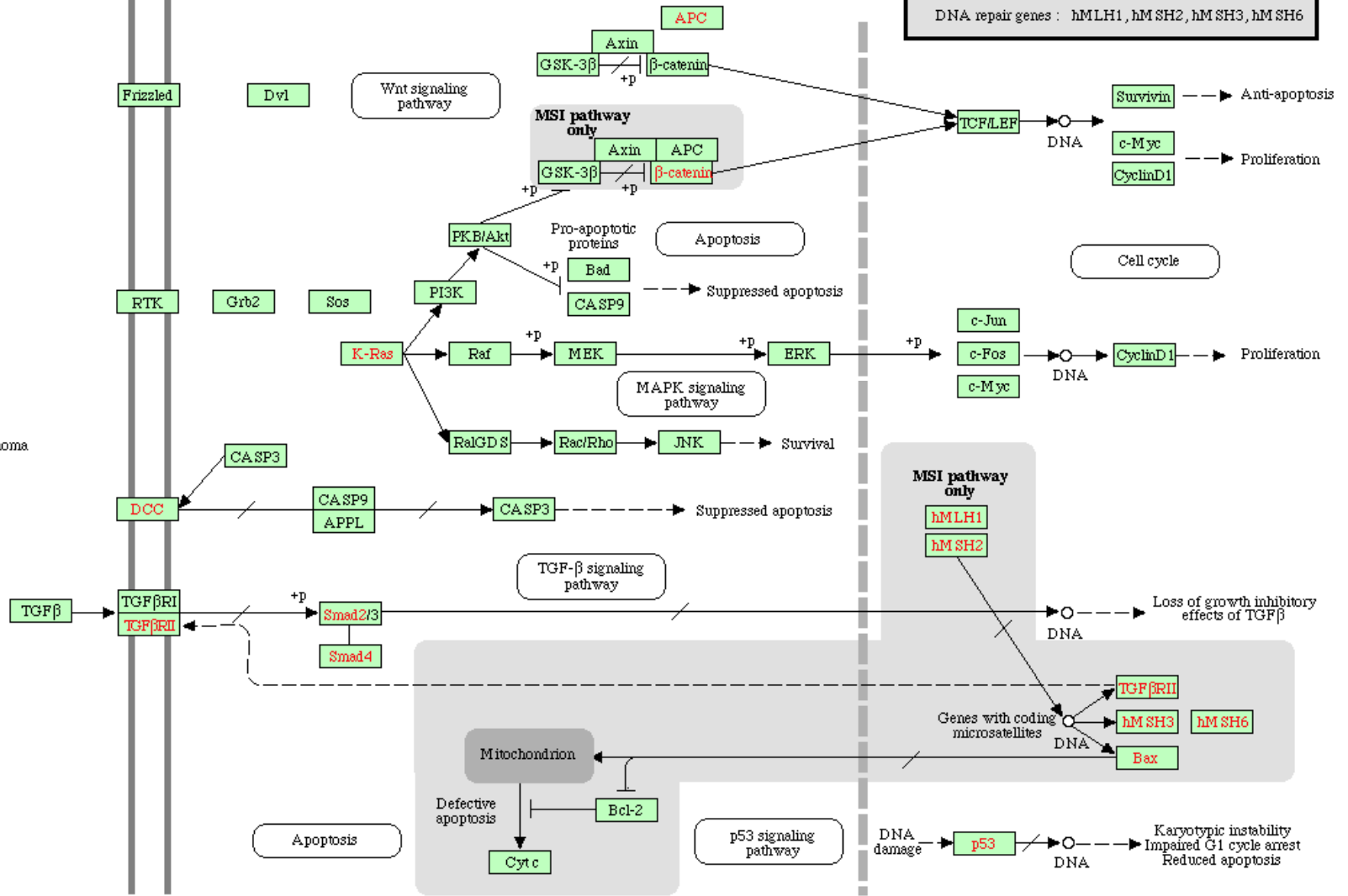
Early adenoma

Intermediate adenoma

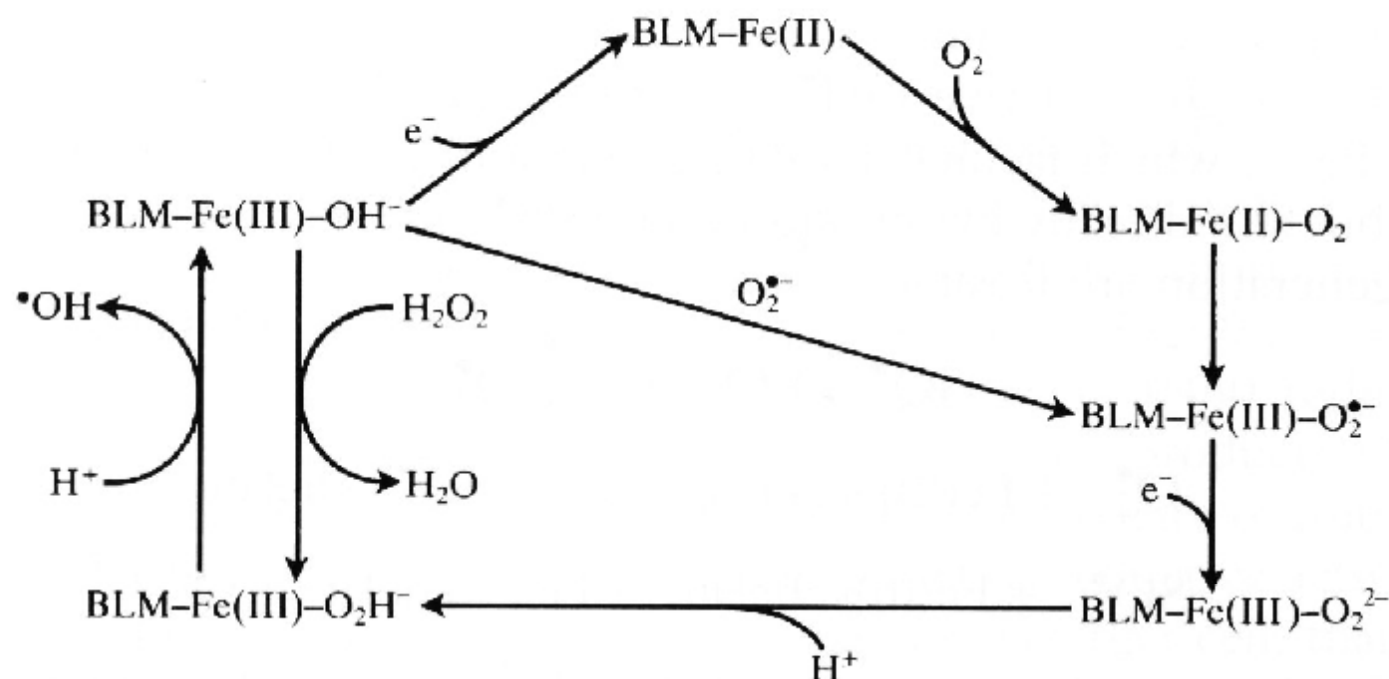
Late adenoma

Carcinoma

Colorectal epithelial cell



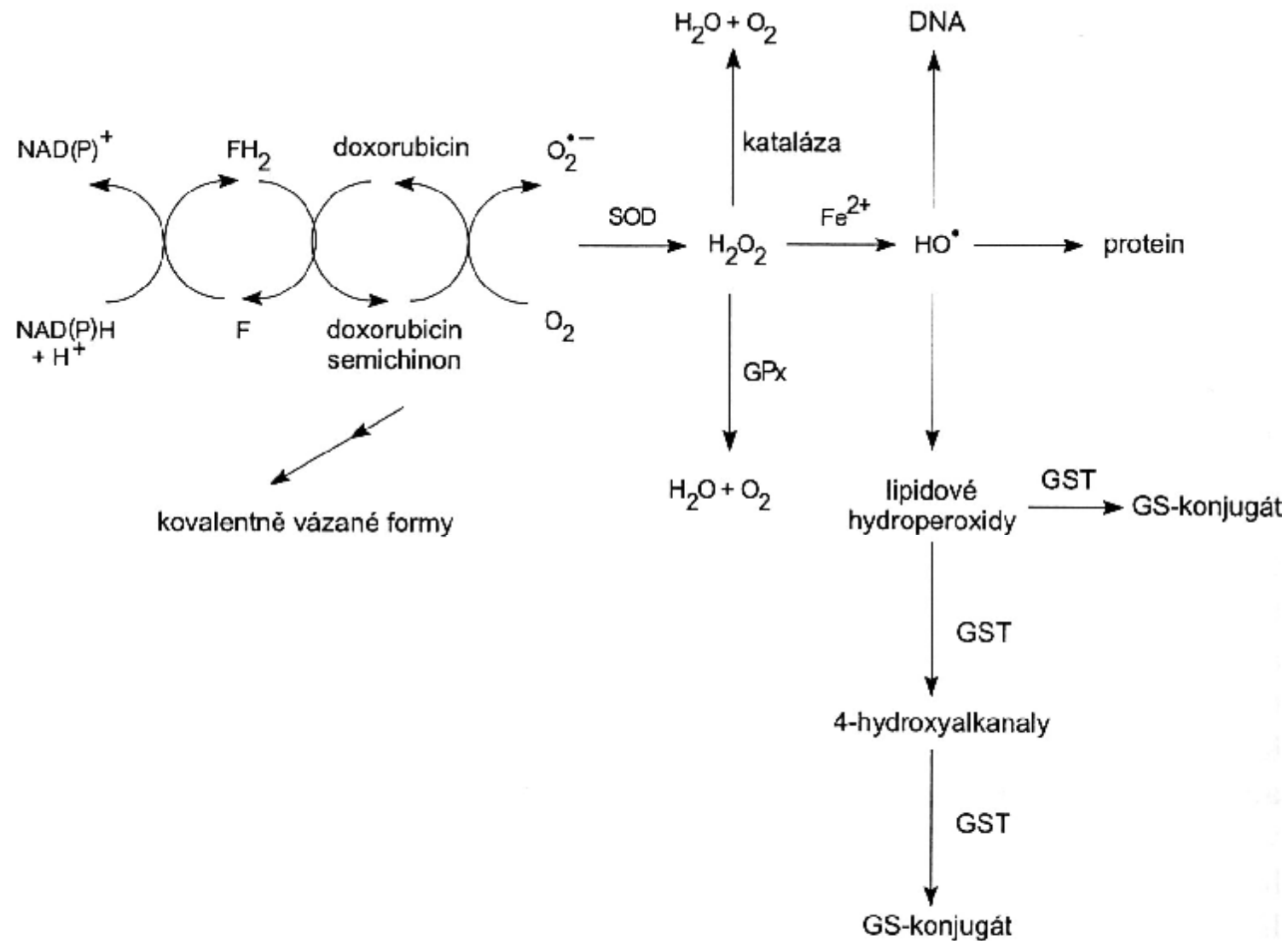
## Úloha ROS a RNS v karcinogenezi



**Fig. 9.23.** Mechanism of bleomycin (BLM) action. The species that attacks DNA is thought to be a ferric peroxide,  $\text{BLM-Fe(III)-O}_2\text{H}^-$ . It can be formed by direct reaction of ferric bleomycin with  $\text{H}_2\text{O}_2$ , or from a  $\text{BLM-Fe(III)-O}_2^{\bullet-}$  complex. Diagram adapted from Sugiura *et al.* (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **105**, 1511, with permission. Under appropriate conditions,  $\text{BLM-Fe(III)-O}_2^{\bullet-}$  might decompose to release  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , and  $\text{BLM-Fe(III)-O}_2\text{H}^-$  to release  $\text{OH}^\bullet$ , explaining why these radicals have been detected (e.g. by spin-trapping) in some bleomycin-containing systems ( $e^-$  represents a reducing system, e.g. thiols, ascorbic acid,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  or reductase enzymes). The mechanism of bleomycin action resembles the catalytic cycle of cytochrome P450 (Chapter 1). (*Chem. Rev.* **98**, 1153 (1998)).

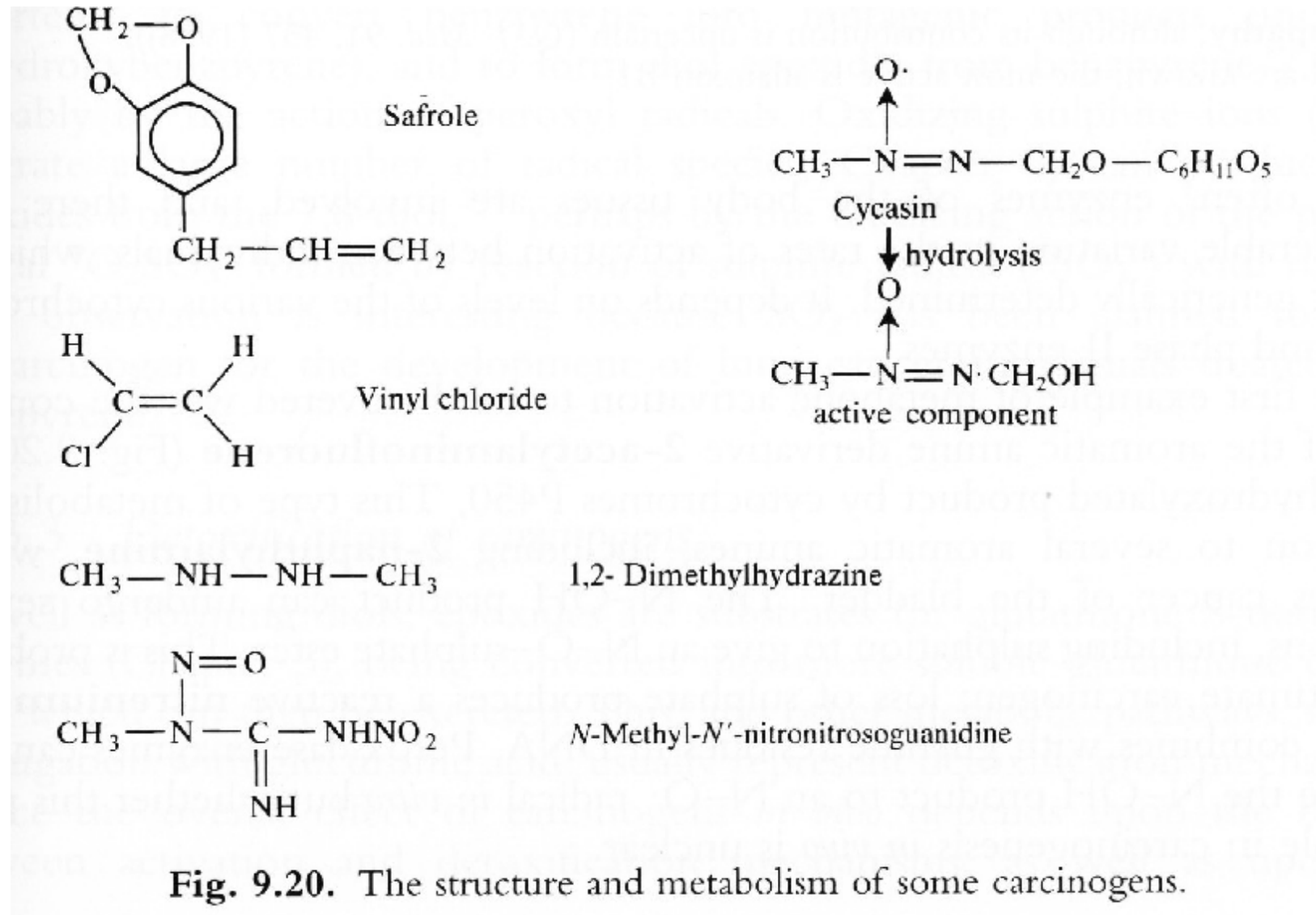


# Úloha ROS a RNS v karcinogenezi



**Obr. 44** Význam reaktivních forem kyslíku v mechanismu toxicity doxorubicinu a ochrana antioxidanty

# Úloha ROS a RNS v karcinogenezi



**Fig. 9.20.** The structure and metabolism of some carcinogens.

# Úloha ROS a RNS v karcinogenezi

