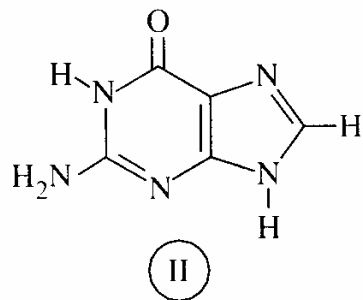
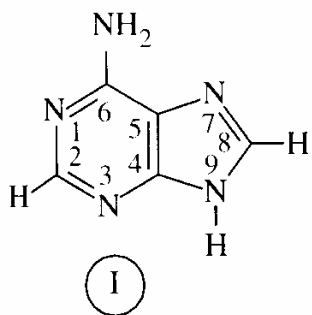


Poškození biologicky důležitých makromolekul

<i>Cíl</i>	<i>Poškození</i>	<i>Následky</i>
nenasycené mastné kyseliny v lipidech	ztráta dvojných vazeb, tvorba reaktivních metabolitů (peroxydy, aldehydy)	změněná fluidita lipidů, změny v propustnosti membrán, vliv na membránově vázané enzymy, tvorba chemoatraktivních látek pro makrofágy
proteiny	agregace a síťování, fragmentace a štěpení, modifikace thiolových skupin a benzenových jader aminokyselin, reakce s hemovým železem	změny v transportu iontů, vstup Ca^{2+} do cytosolu, změny v aktivitě enzymů
DNA	štěpení kruhu deoxyribózy, modifikace a poškození bází, zlomy řetězce, křížové vazby řetězců	mutace, translační chyby, inhibice proteosyntézy

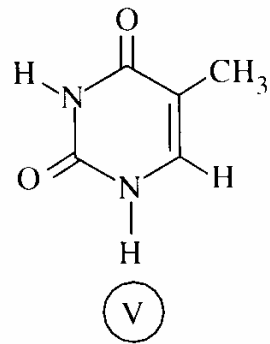
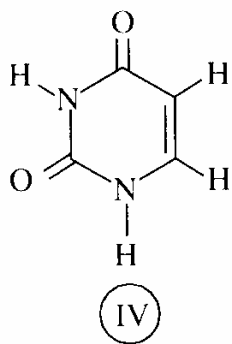
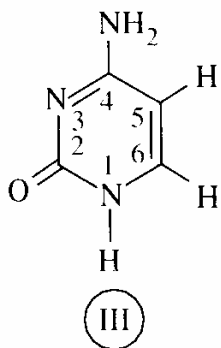
+ glykace a glykooxidace

Poškození DNA



I – adenin

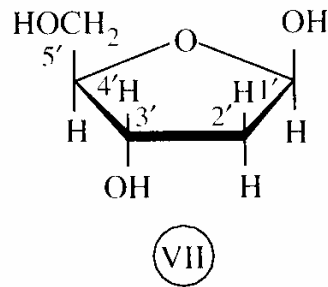
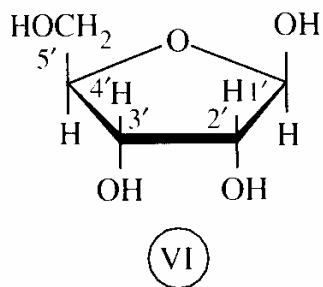
II- guanin



III – cytosin

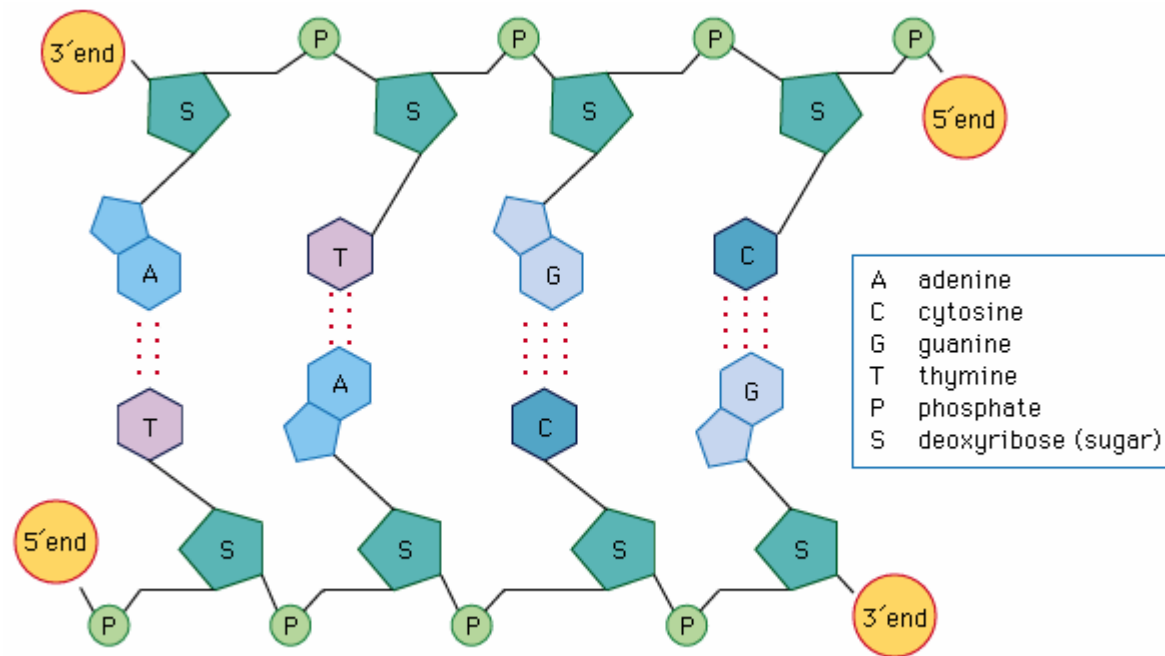
IV – uracil (pouze v RNA)

V – thymin (pouze v DNA)



VI – D-ribóza (pouze v RNA)

VII – 2-deoxy-D-ribóza (pouze v DNA)



©1998 Encyclopaedia Britannica, Inc.

Nukleosid – báze připojená k cukru

Nukleotid – báze + cukr + fosfát

DNA

je stabilní molekulou, v průběhu času však dochází ke spontánním změnám

Příklad spontánních změn:

Ztráta purinů („*apurinic sites*“)

Cytosin může pomalu ztrácet aminoskupinu (deaminace) za vzniku uracilu

Spontánní změny jsou opravovány reparačními mechanismy.

Oxidativní stres silně akceleruje poškození DNA

Poškození DNA po expozici:

reaktivním metabolitům kyslíku a dusíku

ionizujícímu záření

zvýšené koncentraci kyslíku

aktivovaným fagocytům

cigaretovému kouři

ozonu

xanthin oxidase

DNA je poškozována reaktivními metabolity kyslíku i dusíku.

Hydroxylový radikál – vysoce účinný a neselektivní:

1. reaguje s deoxyribózou (vyjmutí vodíku) – vzniká malondialdehyd a další produkty
Důsledky – destrukce sacharidu a přerušení řetězce. To vede k aktivaci PARP (poly(ADP-ribose)polymerasa - enzymu vázaného na chromatin, který využívá NAD^+ k nápravě zlomů). Nadměrná aktivace PARP = deplece NAD^+ = interference se syntézou ATP = buněčná smrt.

2. připojuje se k purinovým a pyrimidinovým bázím – mění je na hydroxyderiváty a oxoderiváty

Důsledek – chybné párování bází při replikaci DNA a zavedení chyby do genetické informace

Singletový kyslík – negeneruje řetězcové zlomy, reaguje hlavně s guaninem

Produkty LPO (RO^* , ROO^*) mohou poškozovat DNA

Reaktivní metabolity dusíku

mohou působit nitraci nebo deaminaci bází DNA

Důsledky oxidativního poškození

Modifikace bazí vedou k **mutacím**.

Příklad:

RNS deaminují A na HX, C na U a G na X, což má za následek nesprávné párování bazí (např. správné párování A – T je nahrazeno HX – C)

Excisní reparace

Oxidované, deaminované nebo špatně spárované (mismatch) báze jsou odstraňovány podobným mechanismem.

První typ = nukleotidová excisní reparace

Chybný nukleotid je vystřižen nukleasou

DNA polymerasa naváže správné nukleotidy podle neporušeného řetězce

Následně DNA ligasa řetězec uzavře.

Druhý typ = excizní reparace báze

DNA glykosylasa hydrolyzuje vazbu abnormální báze na cukr-fosfátovou kostru

Tím vzniká „*AP site*“ (**apurinic** or **apyrimidinic** site)

Dále je uvolněna AP-deoxyribóza působením AP lyasy na 3' a AP endonukleasy na 5' konci

DNA polymerasa zaplní jednonukleotidovou mezeru

DNA ligasa uzavře řetězec DNA

Reparace dvouřetězcových zlomů

Vznikají působením ionizujícího záření (tvorba OH*)

Náprava je možná, ale je daleko těžší než u jednořetězcových zlomů, protože neexistuje intaktní řetězec.

Nesprávné reparace vedou k velkým abnormalitám DNA známým jako chromozomové aberace.

Poškození lipidů

Peroxidace lipidů

Tuky a oleje při skladování na vzduchu žluknou
(autooxidační radikálová řetězová reakce)

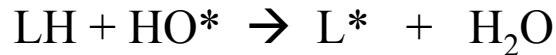
V biologických systémech tomuto procesu podléhají PUFAs,
tj. polynenasycené mastné kyseliny s více dvojnými vazbami

Tři fáze lipidové peroxidace

První fáze = iniciace

Hydroxylový radikál HO*, **alkoxylový radikál RO*** a **peroxylový radikál ROO*** Každá z těchto látek dokáže vytrhnout vodík z metylenové skupiny řetězce mastné kyseliny.

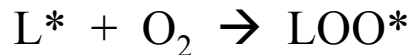
Mastná kyselina nebo lipid se tak stává uhlíkovým radikálem (-*CH-)



Druhá fáze = propagace

Po vytržení vodíku se elektrony v uhlovodíkovém řetězci mastných kyselin uspořádají tak, že mezi dvěma dvojnými vazbami je jedna vazba jednoduchá (= konjugovaný dien).

Tyto látky reagují s molekulárním kyslíkem za vzniku **peroxylového radikálu** (LOO*)



LOO* je schopen vytrhnout elektron z mastné kyseliny sousedního lipidu, která se tak stává novým radikálem, zatímco LOO* se přemění na hydroperoxid (LOOH).



Třetí fáze = terminace

Radikálová reakce se v lipidech propaguje, dokud se radikál PUFA nesetká s jiným radikálem nebo s vitamínem E, kdy se řetězová reakce ukončí vznikem stabilní sloučeniny (terminace).

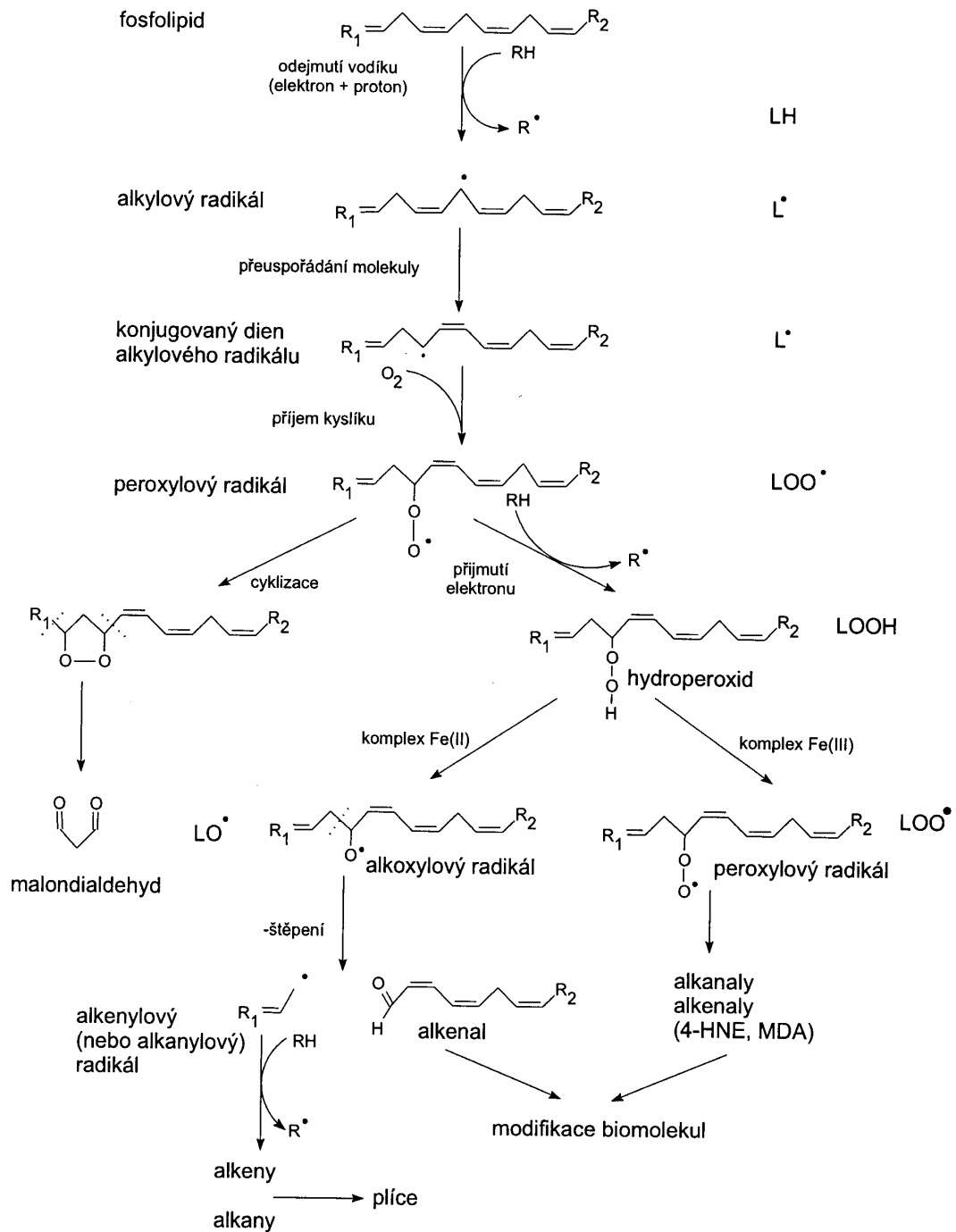
Výsledkem lipidové peroxidace jsou:

Hydroperoxydy mastných kyselin

Cyklické endoperoxidy mastných kyselin

Tyto peroxydy jsou poměrně stabilní, dokud se nesetkají s tranzitními prvky, které katalyzují Fentonovu reakci. V ní se lipidové peroxydy mění na **alkoxylové radikály** LO^* a hydroxidový anion OH^- .





V organismu probíhá:

Neenzymová LPO

Probíhá popsáním způsobem – reakcí s volnými radikály.

Dává směs různých produktů:

Etan, pentan – vydechujeme plicemi

malondialdehyd (MDA), 4-hydroxynonenal (HNE) se navazují na proteiny a mění jejich životnost a funkci.

Enzymová LPO

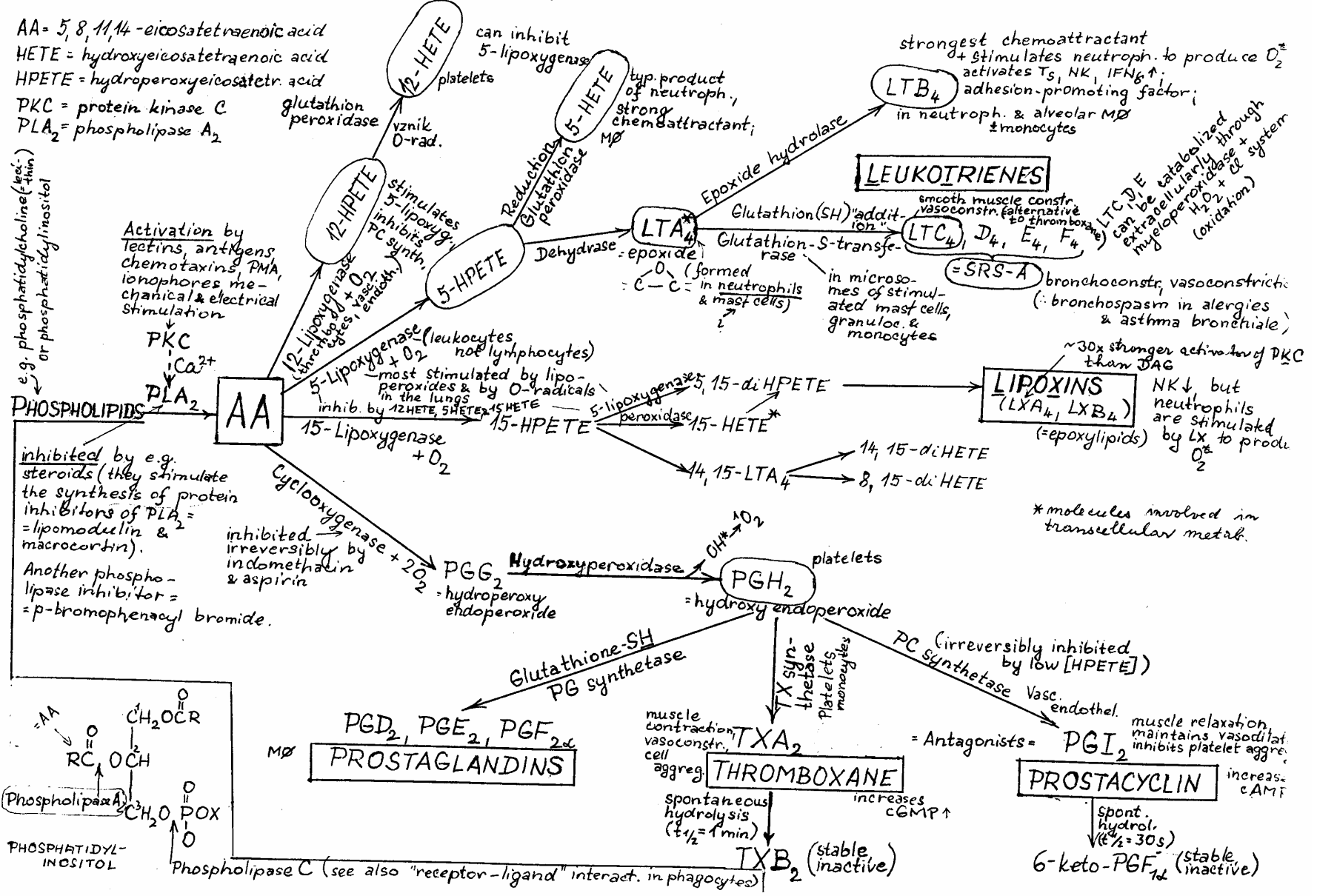
Probíhá na aktivních centrech hydroperoxidáz a endoperoxidáz (cyklooxygenáza, lipoxygenáza) a produkuje biologicky aktivní látky důležité v řízení biologických dějů.

Volné radikály nejsou v tomto případě uvolňovány z enzymu, a tak neškodí.

main source: Stulík J. et al. - Čs. Fysiol. 34
41-54, 1989
Lipids 1990; 15: 21-24
1989; 14: 21

ARACHIDONIC ACID METABOLISM

AA = 5, 8, 11, 14-eicosatetraenoic acid
HETE = hydroxyeicosatetraenoic acid
HPETE = hydroperoxyeicosatetraenoic acid
PKC = protein kinase C
PLA₂ = phospholipase A₂



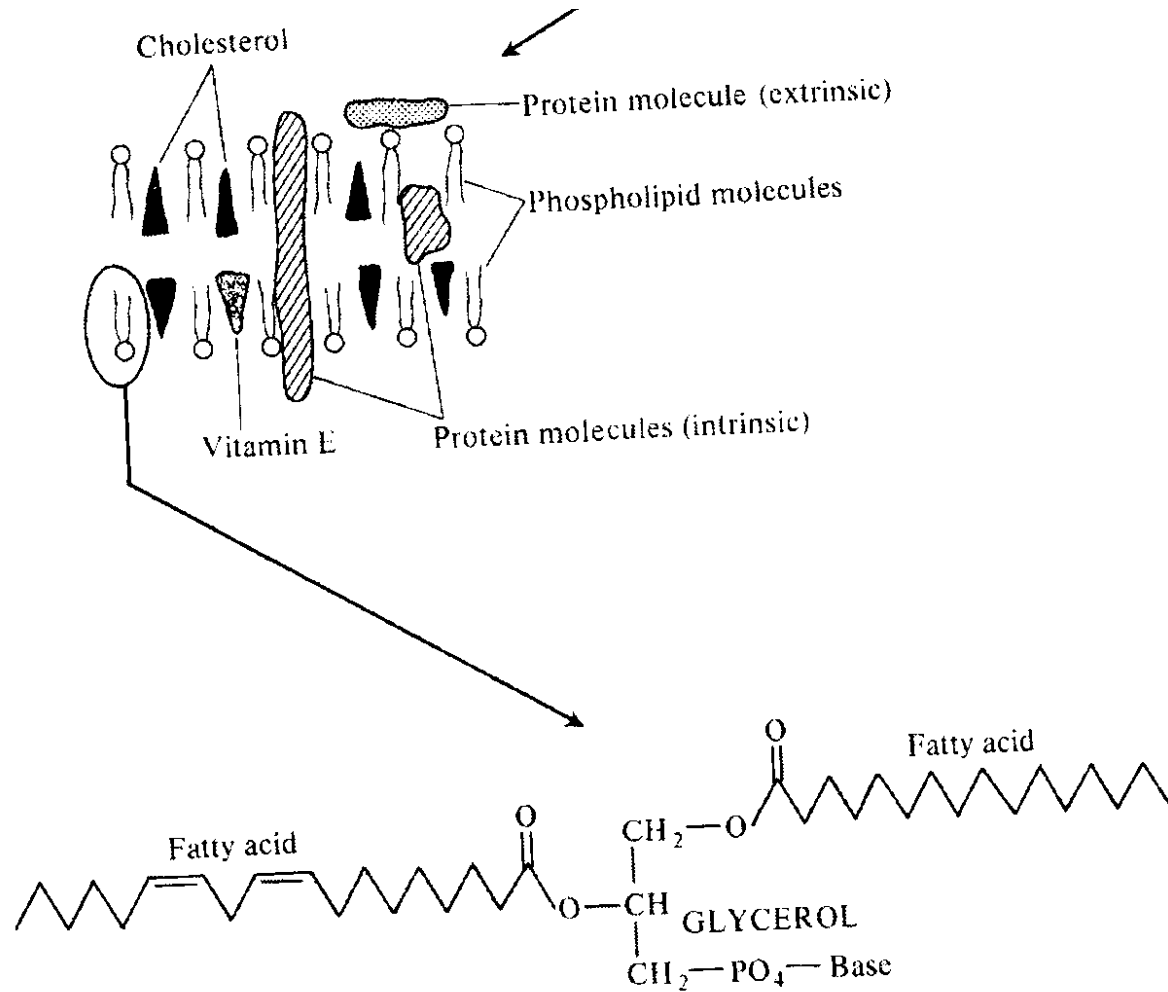


Fig. 4.16. The lipid bilayer as the basic structure of a cell membrane. Cholesterol is found in cell plasma membranes and circulating lipoproteins but not usually in organelle membranes. The membrane shown is that of a sheep red blood cell under the electron microscope.

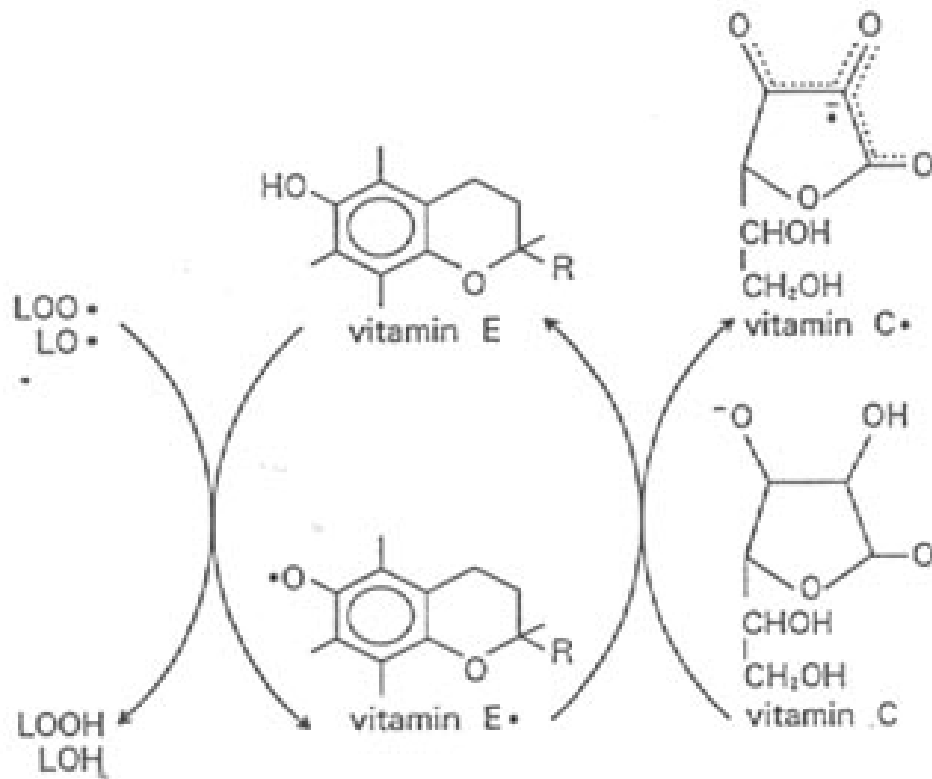


Fig. 2. Chain reaction of vitamin E with lipid radicals and vitamin C.

Table 4.9. Some common, naturally occurring fatty acids

Shorthand name ^a	Common name	Examples of occurrence
16:0	Palmitic	Natural fats and oils, especially palm oil
18:0	Stearic	Natural fats and oils, especially beef fat
18:1 (<i>n</i> -9) ^b	Oleic	Natural fats and oils, especially olive oil
18:2 (<i>n</i> -6)	Linoleic	Widespread, many seed oils
18:3 (<i>n</i> -3)	α -linolenic	All plant leaves, some seed oils, e.g. soybean, rapeseed, linseed oils
20:4 (<i>n</i> -6)	Arachidonic	Animal membranes
20:5 (<i>n</i> -3)	Eicosapentaenoic	Fish oils
22:6 (<i>n</i> -3)	Docosahexaenoic ^c	Fish oils, nervous system

^aNumber of carbons in chain : number of double bonds.

^bThe numbering system in parentheses (often used in the nutritional literature) identifies double bonds from the methyl, $-\text{CH}_3$, end of the chain. For other nomenclature see Fig. 4.14.

^cDocosahexaenoic acid is particularly important in the mammalian brain and in the retina of the eye.

Často diskutovaná otázka

Jsou prospěšnější **nasycené nebo nenasycené** mastné kyseliny ?

Není jasná odpověď.

Jsou prospěšnější **n = 3 nebo n = 6** mastné kyseliny ?

Grónští Eskymáci – velmi nízká frekvence srdečních onemocnění, psoriázy, sklerózy multiplex – předpoklad, že je to způsobeno n = 3 mastnými kyselinami v rybím tuku.

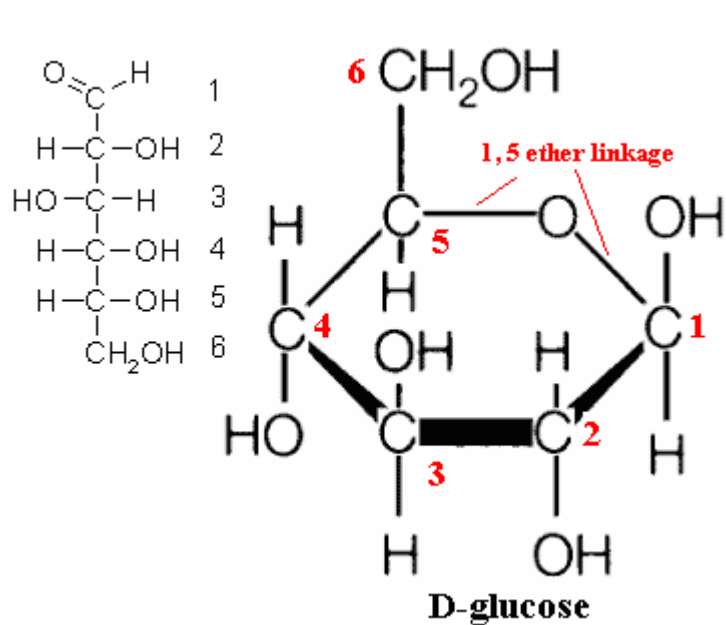
Studie s podáváním rybího tuku jako protektiva nebo léčiva nejsou přesvědčivé.

Možný důvod: n = 3 mastné kyseliny v rybím tuku peroxidují velmi ochotně (vždy 20-30% prodávaného rybího tuku je peroxidováno).

Poškození cukrů a proteinů

Glykace a glykooxidace

Glukóza v roztoku existuje v nealdehydické kruhové formě, částečně však i v rovném řetězci tvořícím aldehyd.

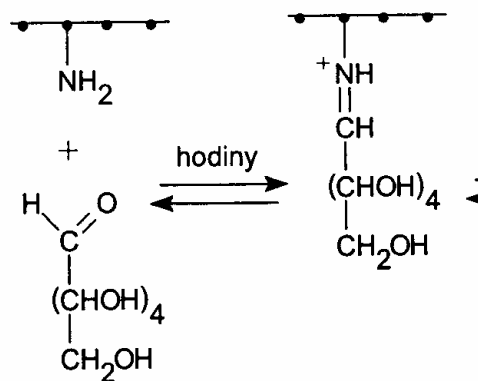


Aldehydy jsou chemicky reaktivní a mohou se vázat na aminoskupiny proteinů v procesu nazývaném **neenzymatická glykace**.

Vzniká tzv. Schiffova báze.

Zvýšená hladina glukózy v krvi vede k patologické hladině glykace.

produkty
časné glykace

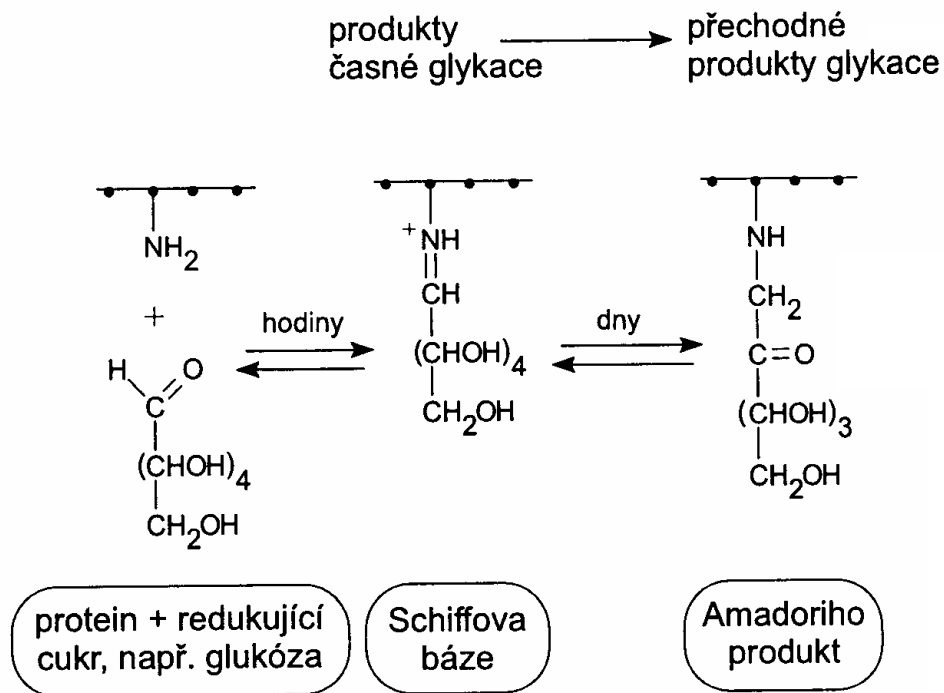


protein + redukující
cukr, např. glukóza

Schiffova
báze

Po určité době se Schiffovy báze přeuspořádávají.

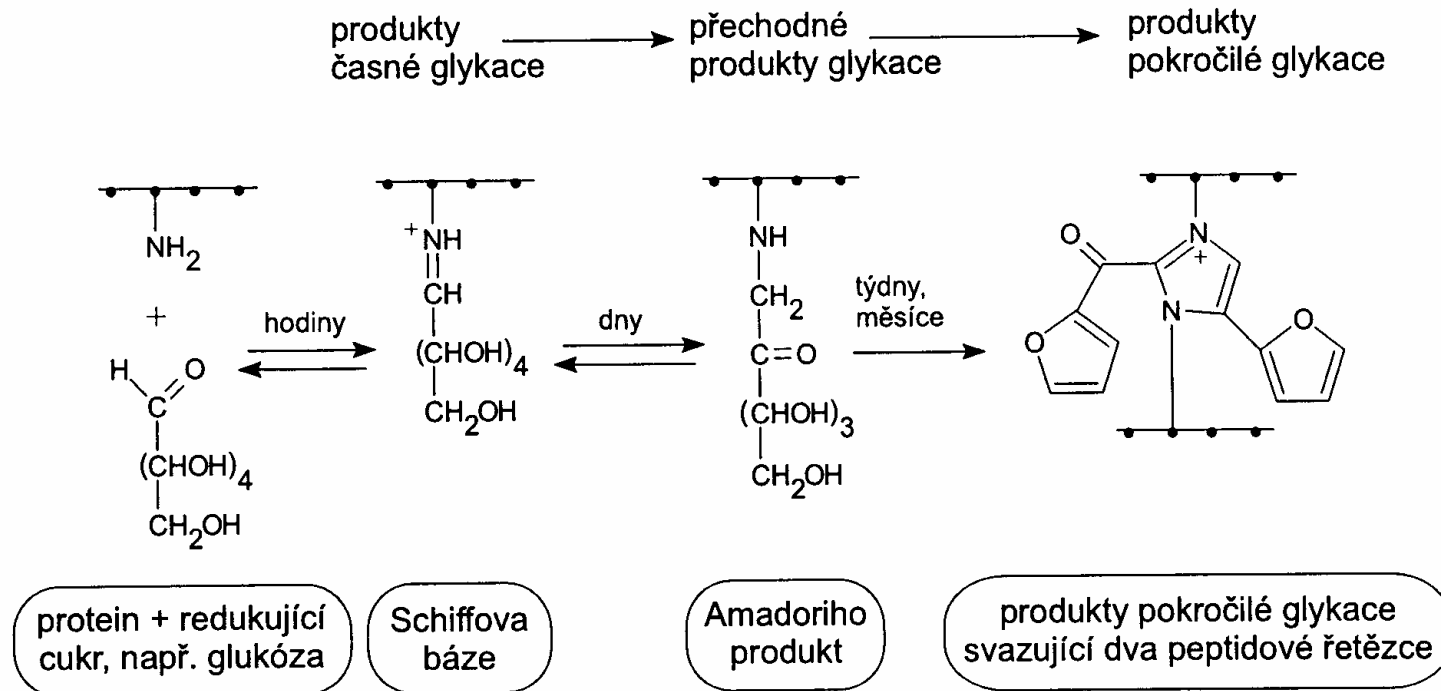
Vzniká **Amadoriho produkt**.



Amadoriho produkt se dále během týdnů až měsíců mění na konečné produkty pokročilé glykace = **Maillardovy sloučeniny** neboli **advanced glycation end products (AGE)**.

AGE se mohou oxidovat kyslíkem za vzniku superoxidu a tudíž i dalších ROS. (Karboxymethyllysin a pentosidin jsou typické produkty oxidace AGEs).

Glykaci tedy provází glykooxidace a oxidační stres.



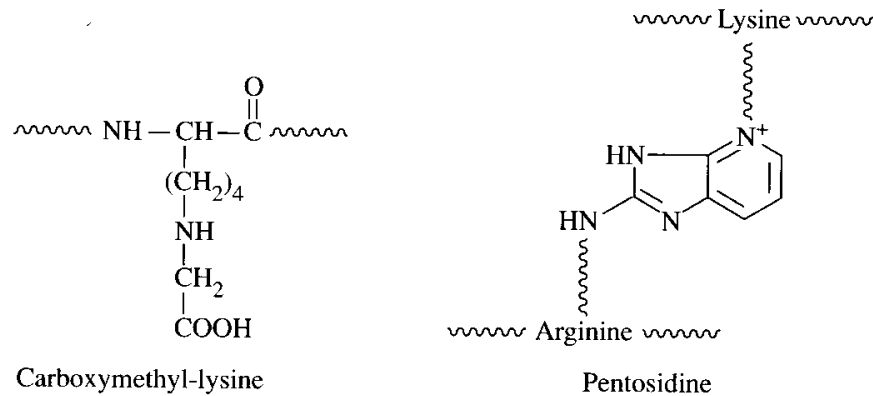
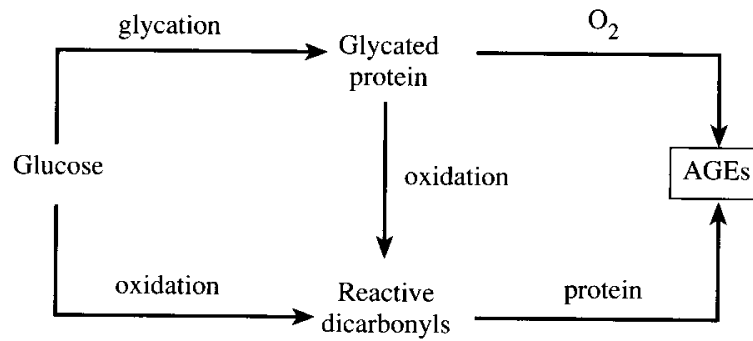


Fig. 9.11. Glyoxidation reactions. The combination of glycation and oxidation can result in the formation of advanced glycosylation end-products (AGEs) whose increased accumulation appears associated with tissue injury in diabetes mellitus. Glucose can be oxidized before binding to proteins, or glycated proteins can themselves oxidize releasing ROS. **Carboxymethyllysine** (N^{ϵ}) and **pentosidine** have been identified as glyoxidation-derived constituents of AGEs, but there are many others. Fig. 9.9 shows formation of N^{ϵ} -carboxymethyllysine from an Amadori product.

Glykace mění vlastnosti modifikovaných proteinů

Příklady negativního působení glykace:

inaktivace SOD = zvýšený oxidativní stres

glykace apoB v LDL = změna náboje LDL částice a její vazba na scavenger LDL receptory makrofágů

AGE jsou rozeznávány specifickými receptory na povrchu cévních a imunitních buněk a následně ovlivňují transkripční faktory a expresi genů cílových buněk

AGE zvyšují syntézu adhezivních molekul na cévní stěně. Podporují adhezivitu monocytů a jejich průnik do cévní stěny. Tím podporují vznik aterosklerózy.

Proteiny = významný cíl volných radikálů

Řada aminokyselin je **hydroxylována** hydroxylovým radikálem

a

nitrována peroxyinitrem (tryptofan, fenylalanin, tyrosin)

S proteiny reagují rovněž alkoxylové a peroxylové radikály
vznikající při LPO

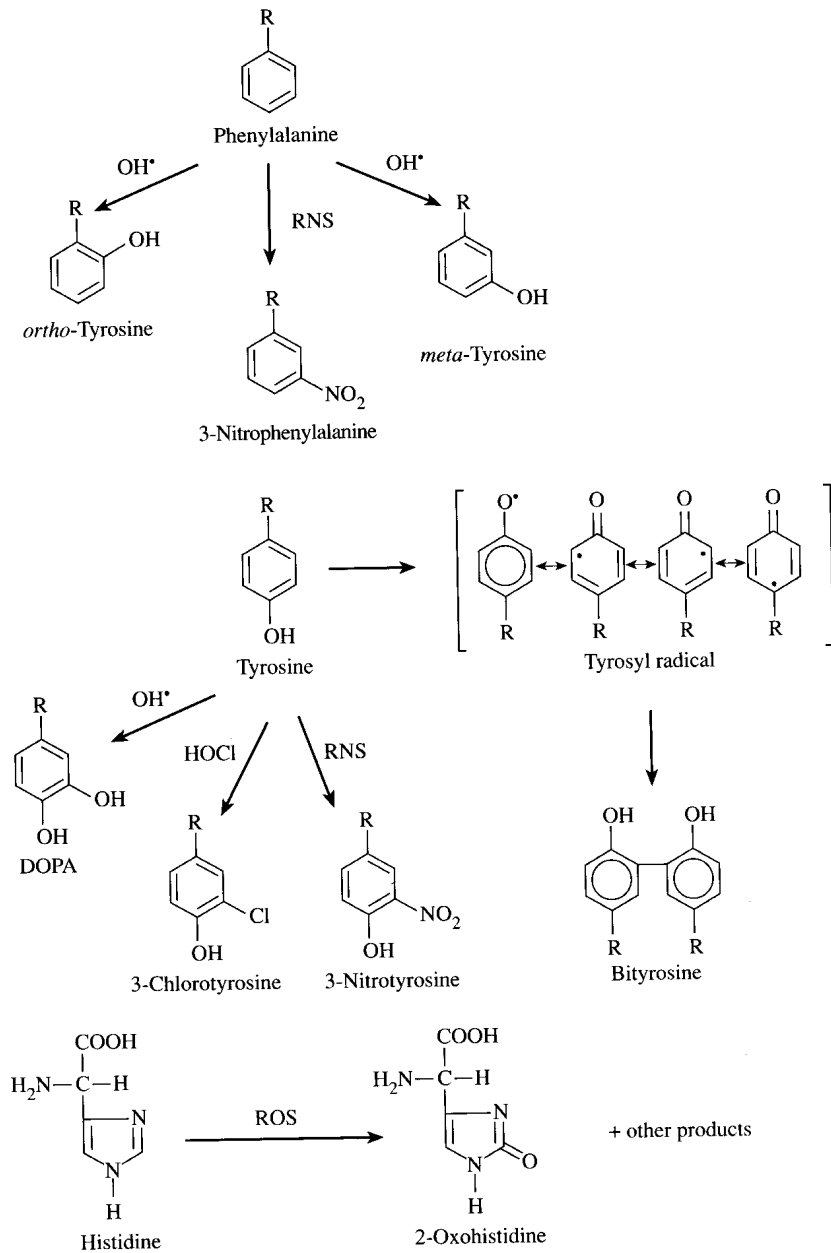


Figure 4.27(a)

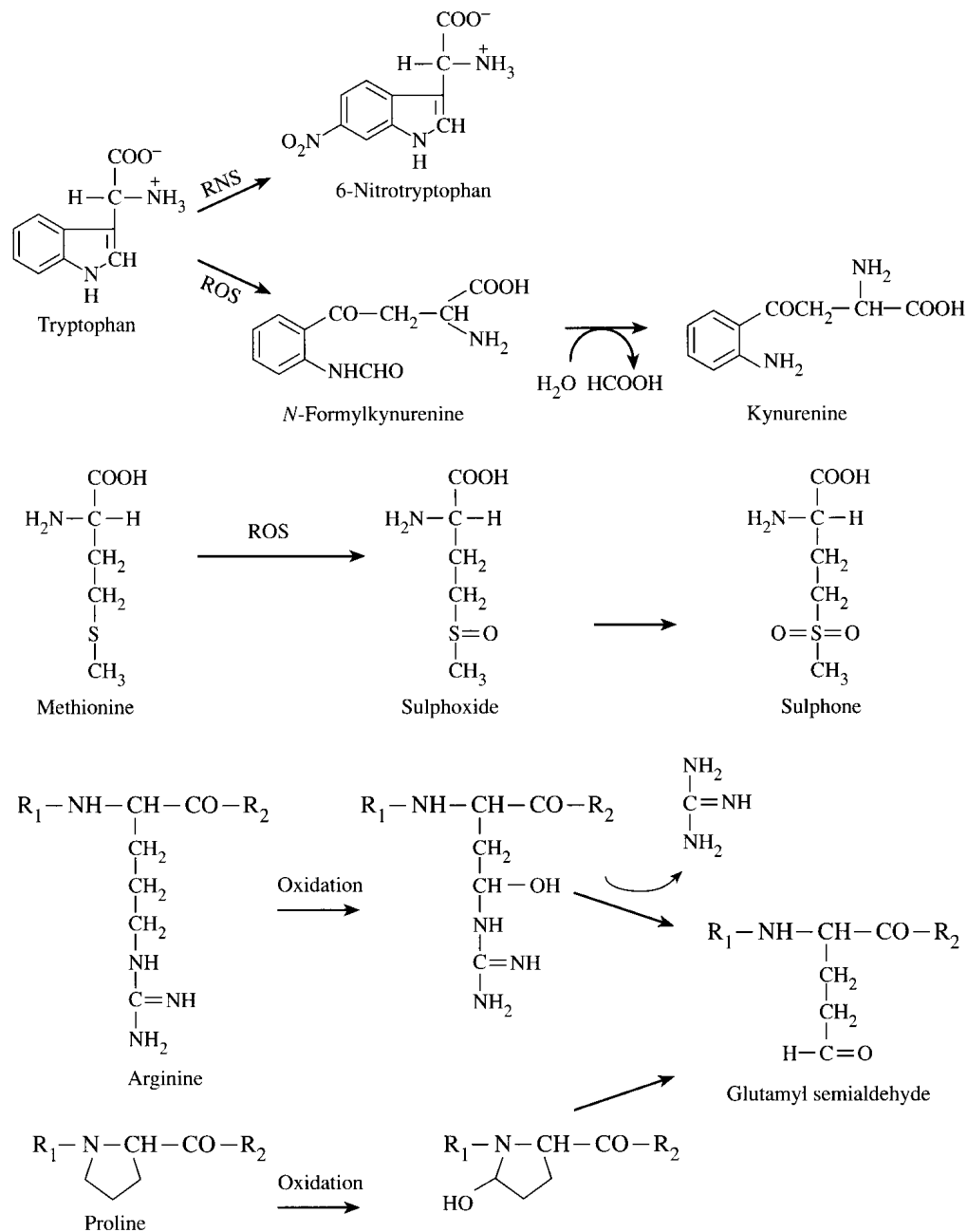


Figure 4.27. Some specific end-products of oxidative damage to amino-acid residues in proteins. Only selected products are shown; many others are known.

Důsledky poškození proteinů

Změna enzymatické aktivity

Změna iontové homeostáze buňky (porucha funkce transportních pump)

V cytosolu se hromadí Ca^{2+} → aktivace proteáz a fosfolipáz

Vznik nových antigenních determinantů a nástup autoimunitních reakcí

Změny v molekulární buněčné signalizaci

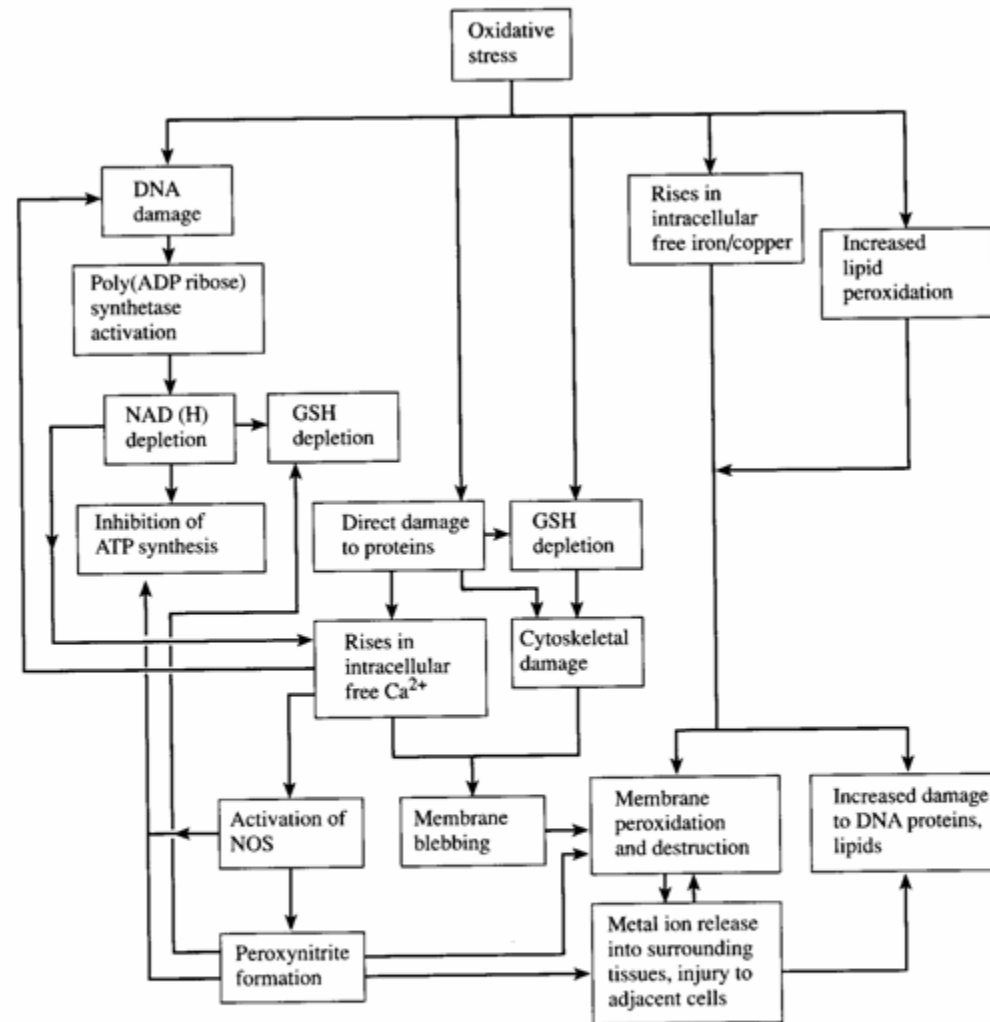


Fig. 4.29. The multiple derangements of cell metabolism that can be caused by oxidative stress. Direct damage to DNA, proteins and/or lipids is possible. Secondary damage can arise when oxidative stress produces rises in 'free' intracellular metal ions, such as Ca^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{2+} . Ca^{2+} can stimulate proteases and nucleases, damaging both DNA and the cytoskeleton as well as increasing NO^\bullet synthesis; excess NO^\bullet can inhibit mitochondrial energy generation and may lead to production of cytotoxic ONOO^- . Activation of calpains may lead to increased ROS production, e.g. by conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase.

Poškození biologicky důležitých makromolekul

<i>Cíl</i>	<i>Poškození</i>	<i>Následky</i>
nenasycené mastné kyseliny v lipidech	ztráta dvojných vazeb, tvorba reaktivních metabolitů (peroxydy, aldehydy)	změněná fluidita lipidů, změny v propustnosti membrán, vliv na membránově vázané enzymy, tvorba chemoatraktivních látek pro makrofágy
proteiny	agregace a síťování, fragmentace a štěpení, modifikace thiolových skupin a benzenových jader aminokyselin, reakce s hemovým železem	změny v transportu iontů, vstup Ca^{2+} do cytosolu, změny v aktivitě enzymů
DNA	štěpení kruhu deoxyribózy, modifikace a poškození bází, zlomy řetězce, křížové vazby řetězců	mutace, translační chyby, inhibice proteosyntézy

+ glykace a glykooxidace