

# Patobiochemie 3

biochemické poruchy

vypracované otázky ke zkoušce

2013/2014

Vendy a Maruška

Zdroje:

WikiSkripta, MedicaBaze, Antioxidanty ve zdraví a nemoci (S. Štípek), Patobiochemie buňky (J. Masopust, R. Průša), přednášky ÚLBLD 1.LF UK

## Seznam otázek

1. Metabolická acidóza, její příčiny a důsledky.
2. Metabolická alkalóza, její příčiny a důsledky.
3. Kombinované poruchy acidobazické rovnováhy.
4. Vztah acidobazické rovnováhy a metabolismu iontů. Změny iontového hospodářství při poruchách ABR. Změny ABR při poruchách hospodaření s ionty.
5. Základní reaktivní formy kyslíku a dusíku: vlastnosti, reakce, hlavní zdroje v organismu, význam v patogenezi.
6. Fyziologická úloha reaktivních forem kyslíku v metabolismu: tkáňové hormony, zbraně fagocytů, hydroxylázy, redoxní signalizace.
7. Peroxidace lipidů jako příklad oxidačního poškození biomolekul. Úloha přechodných kovů (železo, měď) v patobiochemii reaktivních forem kyslíku.
8. Antioxidační ochrana lidského těla.
9. Biochemický podklad stárnutí organismu. Radikálová/mitochondriální teorie, stárnutí jako katabolické selhání, vztah k chronickému zánětu.
10. Význam mitochondrií v buněčné smrti (apoptóze i nekróze) a fyziologickém stárnutí organismu.
11. Za jakých podmínek může být buňka nesmrtelná? Autofagie, Hayflickův limit, telomeráza.
12. Rozdíl mezi průměrnou a maximální délkou života. Vliv genu, teorie „těla na vyhození“, teorie antagonistické pleiotropie, účinek kalorické restrikce.
13. Metabolický syndrom a inzulínová rezistence - charakteristika, příčiny, důsledky, možné terapeutické ovlivnění.
14. Tvorba AGEs, interakce AGE-RAGE, terapeutické možnosti redukce tvorby/účinku AGEs.
15. Mechanismus hyperglykemií indukovaného poškození tkání.
16. Karbonylový stres a jeho úloha v patogenezi dlouhodobých komplikací diabetu, aterosklerózy a renálního selhání.
17. Úloha LDL při vzniku aterosklerózy.
18. Úloha HDL při vzniku aterosklerózy.
19. Biochemické děje v počátečních fázích aterosklerózy.
20. Úloha monocytu/makrofágu, endotelu, buněk hladkého svalstva a T lymfocytů při vzniku aterosklerózy.
21. Pravidla sbalování bílkovin k dosažení nativní konformace.
22. Úloha chaperonu, proteazomu a lysozomu. Stres endoplazmatického retikula buňky.
23. Mechanismus prionových onemocnění.
24. Příčiny patologické konformace bílkovin a klinické důsledky.
25. Metabolické změny v buňce při anoxii a ischemii.
26. Reoxidační poškození tkáně.
27. Excitotoxicita v patogenezi poruch CNS.
28. Obecné mechanismy smrti nervových buněk při neurodegenerativních chorobách.

## 1. Metabolická acidóza, její příčiny a důsledky

Jako metabolickou acidózu označujeme stavy, kdy dojde k poklesu koncentrace standardních hydrogenuhličitanů pod referenční hodnoty. V principu se tak může stát

- v důsledku hromadění některého aniontu, který hydrogenuhličitanu z mineralogramu „vytlačí“
- v důsledku ztrát hydrogenuhličitanů (doprovázených kationtem, nejspíše tedy jako hydrogenuhličitanu sodného)
- vzácněji: v důsledku ztrát některého kationtu, nejspíše sodíku, jež jsou kompenzovány poklesem koncentrace hydrogenuhličitanů.

### Metabolická acidóza z hromadění aniontů

- laktátová acidóza – kyselina mléčná v prostředí, jehož pH je blízké hodnotě 7,4, prakticky zcela disociuje na laktátový anion. Koncentrace laktátu významně stoupá zejména při tkáňové hypoxii.
- ketoacidóza – (z hlediska ABR hromadění  $\beta$ -hydroxybutyrátu a acetacetátu). Rozvíjí se, pokud glukóza nepostačuje jako zdroj energie a ve zvýšené míře se odbourávají tuky: při hladovění, diabetu 1. typu, extrémní zátěži apod.
- renální acidóza
  - při selhání ledvin se hromadí sulfáty, fosfáty a další anionty, které by se normálně vyloučily do moči.
- acidóza při některých otravách
  - intoxikace etanolem – etanol se metabolizuje na acetát
    - Kromě nadprodukce acetátu hraje významnou úlohu produkce NADH při odbourávání etanolu. Vysoká koncentrace redukčních ekvivalentů inhibuje odbourávání laktátu, který se hromadí. Podobně NADH inhibuje glykolýzu, což v konečném důsledku vede ke stimulaci ketogeneze a hromadění  $\beta$ -hydroxybutyrátu a acetacetátu.
  - intoxikace metanolem – metanol se metabolizuje na formiát
  - intoxikace etylenglykolem – metabolizuje se na oxalát.

### Metabolická acidóza ze ztrát hydrogenuhličitanů

je nejčastěji důsledkem ztrát hydrogenuhličitanů z gastrointestinálního traktu. Duodenální a pankreatická šťáva jsou bohaté na hydrogenuhličitanu, které mají neutralizovat tráveninu přicházející ze žaludku. Normálně se hydrogenuhličitanu resorbují zpět v tenkém střevu. Při některých onemocněních GIT (průjmy, syndrom krátkého střeva...) může být resorpce natolik nízká, že koncentrace hydrogenuhličitanů v krvi významně klesne.

Jinou příčinou mohou být ztráty hydrogenuhličitanů ledvinami (renální tubulární acidóza, nežádoucí účinek diuretické léčby apod.). Do skupiny metabolických acidóz ze ztrát hydrogenuhličitanů můžeme také zařadit tzv. diluční acidózu. Dochází k ní při rychlém podání infuzí. Hydrogenuhličitanu se v krvi naředí rychleji, než se stačí metabolismem doplňovat. Pochody, které udržují parciální tlak oxidu uhličitého, jsou mnohem rychlejší, takže  $p\text{CO}_2$  se nemění.

### Klinický obraz

- hyperventilace – snaha o kompenzaci snížením  $p\text{CO}_2$ 
  - acidotické Kussmaulovo dýchání (hyperventilace s apnoickými pauzami)
- myokard – snížení kontraktibility (přímo ovlivněno IC acidózou)
- arteriální krevní řečiště rozšířené, venózní stažené, průtok krve mozkem zvýšen
- kóma – u náhlého zhoršení ledvinných funkcí (u laktátové nebo diabetické ketoacidózy)
- pokles pH doprovázený hyperkalemií
- posun disociační křivky Hb doprava – zlepšuje uvolňování  $\text{O}_2$  ve tkáních
- Ca vázané na bílkovinu se snižuje, stoupá Ca ionizované
- selhání ledvin – typicky se rozvíjí metabolická acidóza
  - několik poruch působících na ABR stejným směrem
    - hromadění síranů, hromadění fosfátů
    - hyperurikémie – urea se za pH blízkého fyziol. roztoku chová jako anion
    - při zachování diurézy a tubulárním poškození selhává reabsorpce hydrogenuhličitanů

## **2. Metabolická alkalóza, její příčiny a důsledky**

Metabolická alkalóza je charakterizována vzestupem pH krve (nad 7,44) se současným vzestupem koncentrace sérových hydrogenuhličitanů (nad 26 mmol/l). Je poměrně častá, a pokud je těžká ( $\text{pH} > 7,55$ ), má velmi vysokou mortalitu (až 45%). V rámci respirační kompenzace dochází k hypoventilaci a vzestupu  $p\text{CO}_2$ . V zásadě může být důsledkem

- ztrát některého aniontu, obvykle chloridů nebo proteinů, které jsou v ionogramu kompenzovány doplněním hydrogenuhličitanů,
- vzestupu koncentrace některého kationtu, nejčastěji sodíku.

### Alkalóza ze ztrát iontů

- hypochloremická alkalóza – doprovází například protrahované zvracení, při němž se ztrácí velké množství chloridového aniontu vyzvracenou žaludeční šťávou. Jinou příčinou hypochloremické alkalózy může být podávání diuretik.
- hypoproteinémie – Bílkoviny se chovají jako polyanionty, takže pokles jejich koncentrace se také kompenzuje doplněním hydrogenuhličitanů. Typickými příklady může být selhání proteosyntézy v játrech, ztráty bílkovin při nefrotickém syndromu či malnutrice.

### Hypernatremická (hypokalemická) alkalóza

Je nejčastěji důsledkem hyperaldosteronismu. K primárnímu hyperaldosteronismu vedou např. některé nádory nadledvin, případně jiné tumory produkující tento hormon. Častější je sekundární hyperaldosteronismus jako následek jaterního selhání, neboť aldosteron se v játrech odbourává. Jinou příčinou sekundárního hyperaldosteronismu může být nadměrná aktivace systému renin-angiotenzin-aldosteron.

Zvýšená hladina aldosteronu způsobí, že ledviny retinují více sodíku, což se v ionogramu kompenzuje doplněním hydrogenuhličitanového aniontu. Šetření sodíku navíc probíhá na úkor zvýšených ztrát draslíku a protonů do moči, což vede k dalšímu prohlubování alkalózy.

Retenci sodíku způsobují i kortikosteroidy, metabolická alkalóza proto provází i Cushingův syndrom.

#### Alkalóza z nadbytku jiných kationtů

Vzácněji může být metabolická alkalóza způsobena nadbytkem jiného kationtu, např. ionizovaného vápníku. Dochází k ní např. při nádorech kostí (mnohočetný myelom, metastázy karcinomu prsu, prostaty apod.). Při odbourávání kostní tkáně se uvolňuje velké množství  $\text{Ca}^{2+}$ , ale i  $\text{HCO}_3^-$ .

#### Klinické projevy

Těžká metabolická alkalóza snižuje perfuzi mozku i myokardu a klinicky se projevuje bolestmi hlavy, zmateností, křečemi, bolestmi na hrudi a arytmiemi. Kompenzační hypoventilace komplikuje odpojení pacientů s respirační insuficiencí od ventilátoru.

### **3. Kombinované poruchy acidobazické rovnováhy**

V praxi se lze často setkat s kombinací několika poruch acidobazické rovnováhy. Významná je zejména kombinace metabolické acidózy v metabolickou alkalózou: při vyšetření ABR dle Astrupa mohou být jednotlivé parametry v normě nebo jen mírně vychýlené. Kombinovaná porucha ABR proto nemusí být rozpoznána, nebo může být podhodnocena. Přitom léčebný zásah, který ovlivní jednu z dílčích poruch, může způsobit, že druhá porucha rychle převáží. Tím může dojít k prudké změně pH vnitřního prostředí a těžkému metabolickému rozvratu. Stavby vedoucí ke kombinovaným poruchám ABR nejsou vzácné. Typickými příklady mohou být:

zvracení a průjem – zvracení vede k hypochloremické alkalóze, průjem k acidóze ze ztrát hydrogenuhličitanů

protrahované zvracení – hypochloremická alkalóza při zvracení se kombinuje s ketoacidózou způsobenou hladověním a laktátovou acidózou z nedostatečné perfuze tkání při hypovolemii

hepatorenální selhání – kombinuje se jaterní metabolická alkalóza s renální acidózou

selhání jater s respirační insuficiencí – těžká hypoproteinémie při selhání jater vede k plicnímu edému, v důsledku hypoxie se rozvíjí laktátová acidóza

selhání ledvin s nefrotickým syndromem a těžkou hypoproteinémií – renální acidóza z hromadění sulfátů a fosfátů je provázena alkalózou při hypoproteinémii

- nefrotický syndrom – charakterizován proteinurií s následnou hypoproteinémií, hypoalbuminémií, hypocholesterolémií a otoky. Jeho možné komplikace jsou infekce, tromboembolické příhody, akcelerovaná ateroskleróza a proteinová malnutrice. Může progredovat do chronického selhání ledvin.

Dále mohou být kombinované poruchy děleny na současné a následné.

#### Současné kombinace

- stejnosměrné – kombinace respirační a metabolické poruchy téhož směru: respirační insuficience při obstrukci dýchacích cest → respirační acidóza a současná hypoxie → metabolická laktátová acidóza
- protichůdné – např. úporné zvracení a průjem

- sdružené – poruchy ABR a elektrolytový rozvrat – např. intenzivní průjem – acidóza + ztráta vody a elektrolytů

#### Následné kombinace ABR

- přirozené bez terapie
    - kompenzační děj po vymizení příčiny „přestřelí“
    - např. cvičení u osob s mitrální stenózou → laktátová acidóza z fyzické zátěže a hypoxie. U některých nemocných navíc respirační acidóza z hyperventilace.
  - iatrogenní – nesprávná léčba
    - např. diabetická acidóza léčená inzulinem a hydrokarbonáty. Po nástupu účinku inzulinu jsou oxokyseliny nahrazeny hydrokarbonáty → metabolická alkalóza. Hyperventilace → respirační al. Výsledek → kombinovaná alkalóza
- jednoduché kombinace převažují
- kombinované poruchy mají až 5x vyšší úmrtnost
- komplikovaná léčba protichůdných kombinací – kombinace nebo kompenzace??
- nejčastější kombinace metabolické acidózy – kombinované hyperchloremické MAC (průjmy a renální tubulární acidóza, průjmy a nepřiměřená rehydratace roztoky NaCl, léky, hyperparathyreóza), kombinované MAC se zvýšeným deficitem aniontů (ketoacidóza s laktátovou acidózou, DM, glykogenózy, alkoholická acidóza), hyperchloremická MAC s MAC se zvýšeným deficitem aniontů (hyperchloremická s laktátovou MAC, intersticiální nefritida → porušená produkce amoniaku → porucha exkrece  $H^+$  → retence  $H^+$  v organismu)

#### **4. Vztah acidobazické rovnováhy a metabolismu iontů. Změny iontového hospodářství při poruchách ABR. Změny ABR při poruchách hospodaření s ionty.**

Vztahy mezi acidobazickou rovnováhou a metabolismem hlavních iontů je možné rozdělit do dvou skupin:

1. Výměna protonů za jiné kationty
2. Udržování elektroneutrarity, tedy rovnováhy mezi koncentracemi hydrogenuhličitanů a ostatních iontů.

#### Výměna protonů za kationty draslíku a vápníku

##### I. Draslík a acidobazická rovnováha

Hovoří-li se o krátkodobém udržování acidobazické rovnováhy, mluví se především o pufrech krve, tedy zejména o hydrogenuhličitanovém a hemoglobinovém systému. Zcela obdobně se však chovají i intracelulární pufrы. Podílejí se na nich hlavně hydrogenuhličitanы, bílkoviny a fosfáty.

Snadno si můžeme představit, že při acidémii bude část „nadbytečných“ protonů vstupovat do buněk, v nichž se bude pufrovat. Tím se přes plasmatickou membránu přenesl kation a tato změna by tedy sama o sobě vedla ke změně membránového potenciálu. Namísto protonu proto z intracelulárního do extracelulárního prostoru přestoupí jiný kation. Protože vodivost plasmatické membrány je z hlavních iontů nejvyšší pro  $K^+$ , bude to především draslík.

Acidóza popsaným mechanismem povede k hyperkalemii. Nezvyšuje se celkové množství draslíku v organismu, jen se mění jeho distribuce mezi kompartmenty. Z hlediska organismu jako celku bude dokonce důsledkem acidózy deplece kalia, protože se zvýší jeho renální ztráty (takže těžší a déletrvající acidémie bude doprovázena deplecí kalia při současné hyperkalemii). Zcela analogicky provází alkalózu hypokalemie. Celý mechanismus však funguje i obráceně. Hyperkalemie způsobí acidózu a hypokalemie naopak alkalózu. Zjednodušeně si lze představit, že  $K^+$  se na plasmatické membráně směňují za protony.

## II. Vápník a acidobazická rovnováha

Podobně jako se směňuje proton za draselný kation, mění se také protony na vápenatý kation.

Klíčovou roli v tomto mechanismu hrají plasmatické bílkoviny. Bílkoviny krevní plasmy se chovají jako pufr, především díky karboxylovým skupinám a aminoskupinám. Zabývejme se chováním karboxylových skupin.

V kyselém prostředí jsou karboxylové skupiny v protonovaném, nedisociovaném stavu ( $-COOH$ ).

Při alkalizaci začnou pufrovat, dochází k jejich disociaci na karboxylát  $-COO^-$ .

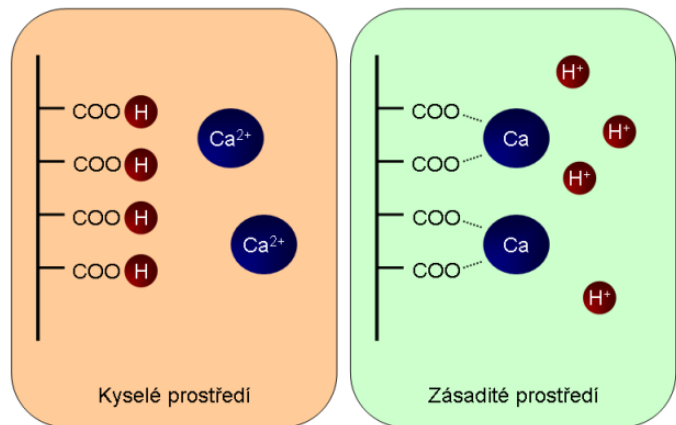
Karboxylát dokáže velmi účinně vázat dvojmocné kationty, zejména  $Ca^{2+}$ , obzvláště pokud je několik karboxylátových skupin blízko sebe, což je u bílkovin běžné. Znamená to tedy, že při změně pH nedochází ke změně  $-COOH$  na  $-COO^-$  a obráceně, ale ke složitějšímu ději, která je vidět na obrázku.

Můžeme také říct, že na pH prostředí záleží, jaká část vápníku bude ionizovaná a jaká část bude neionizovaná. I v tomto případě můžeme celý děj shrnout zjednodušeným tvrzením, že na plasmatických bílkovinách dochází ke směně protonů a vápenatých iontů.

Praktickým důsledkem je, že alkalóza vede k ionizované hypokalcémii, acidóza naopak k ionizované hyperkalcémii. Celková kalcémie se nemění, musíme si však uvědomit, že právě ionizované kalcium je metabolicky aktivní, zejména pokud jde o membránové děje.

Na patogenezi hysterického záchvatu se podílí psychogenně podmíněná hyperventilace. Vede k hypokapnii a tím i k respirační alkalóze. Výše popsaným mechanismem dochází k poklesu koncentrace ionizovaného kalcia, což má za následek zvýšení neuromuskulární dráždivosti. Psychogenní záchvat se tím dále prohlubuje, uzavírá se bludný kruh. Výsledkem bývá pár s křečemi a apnoickou pauzou. Během krátkého bezdeší se upraví  $pCO_2$ , pH se vrátí k normě, stejně tak stoupne i ionizovaná kalcémie a epizoda končí. V rámci první pomoci se postiženým dává dýchat do sáčku – to je dostatečné pro udržení saturace kyslíkem, zabrání však excesivním ztrátám  $CO_2$ .

Řízené hyperventilace jako prostředku ke zvýšení neuronální excitability se využívá i cíleně, například během zaznamenávání EEG.



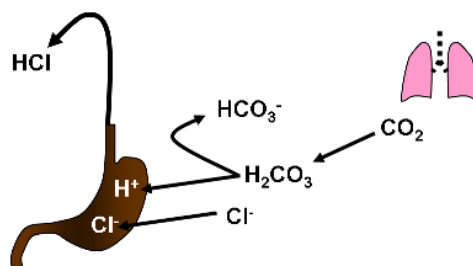


### Hydrogenuhlíčitanový anion a ostatní hlavní ionty

Vztahy mezi acidobazickou rovnováhou a iontovým hospodářstvím jsou těsně provázané. Hlavním důvodem je skutečnost, že jedna část hydrogenuhlíčitanového pufru nemá náboj ( $\text{H}_2\text{CO}_3$  čili  $\text{CO}_2$ ), zatímco druhá složka je nabitá ( $\text{HCO}_3^-$ ). Hydrogenuhlíčitanový anion proto musí být v rovnováze s ostatními ionty, aby byla zachována elektroneutralita vnitřního prostředí. Pro parciální tlak oxidu uhličitého nic takového neplatí, jeho regulace může být do značné míry nezávislá. Přitom podle Henderson-Hasselbalchovy rovnice ( $\text{pH} = \text{pK}_A + \log c_B/c_A$ ) pH vnitřního prostředí závisí na poměru koncentrace hydrogenuhlíčanů a  $\text{pCO}_2$ .

Všimněme si, že koncentrace většiny hlavních iontů jsou buď přesně regulované, neboť jejich změna by měla závažné funkční důsledky ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ), nebo organismus naopak disponuje jen velmi omezenými možnostmi je rychle ovlivnit (koncentrace bílkovin, ketokyselin, sulfátů a fosfátů). Přitom změni-li se koncentrace některého iontu v důsledku nějakého patologického pochodu, musí být tato změna kompenzována změnou koncentrace dalšího iontu, aby byla zachována elektroneutralita. Často kompenzace spočívá ve změně koncentrace hydrogenuhlíčanů.

Při zvracení se s žaludeční šťávou ztrácí velké množství  $\text{Cl}^-$ . Koncentrace ostatních hlavních iontů se nemění. Aby byla zachována elektroneutralita, bude nedostatek aniontů doplněn zvýšením koncentrace hydrogenuhlíčanů. Ventilace přitom bývá zachována,  $\text{pCO}_2$  se nemění. Znamená to, že dojde ke změně poměru v H-H rovnici ve prospěch konjugované báze a rozvíjí se tzv. hypochloremická alkalóza.



Bylo by zavádějící interpretovat metabolickou alkalózu při zvracení jako důsledek ztráty protonů s žaludeční kyselinou. Ukáže se to, budeme-li se zabývat původem a osudem jednotlivých iontů. Při sekreci HCl transportují H<sup>+</sup> aktivně parietální buňky žaludeční sliznice protonovou pumpou. Cl<sup>-</sup> přechází na lumenální stranu pasivně, aby byla zachována elektroneutralita celého děje. Zdrojem protonů je disociace kyseliny uhličité, H<sup>+</sup> se secernuje, HCO<sup>3-</sup> se vrací zpět do krve. Sumárně tedy můžeme celý děj popsat jako nahrazení chloridů v krvi za hydrogenuhlíčitany, jak jsme učinili v obecném výkladu výše.

Obecně lze doporučit, aby se při úvahách o důsledcích nějakého pochodu na ABR posuzovaly především změny koncentrací hlavních iontů a jejich vyrovnání změnou koncentrace HCO<sup>3-</sup>. Změna pH je až druhotná v důsledku změny poměru v H-H rovnici. Musíme mít na paměti, že koncentrace protonů je o mnoho řádů nižší, než jsou koncentrace ostatních složek ionogramu. Eventuální ztráta nebo doplnění protonů je okamžitě vyrovnána pufrovacími mechanismy, jejich kapacita je, vzhledem ke koncentraci samotných protonů, obrovská.

### **5. Základní reaktivní formy kyslíku a dusíku: vlastnosti, reakce, hlavní zdroje v organismu, význam v patogenezi.**

#### Reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS)

- v organismu běžně vzniká řada reaktivních forem kyslíku (ROS) i dusíku (RNS) – látky se značným fyziologickým i patogenetickým významem



- látky pohotově reagující s různými biologickými strukturami – s MK, lipidy, AMK, proteiny, mononukleotidy, polynukleotidy (NK), řadou nízkomolekulárních metabolitů, koenzymů
- významní prostředníci přenosu energie, faktory imunitní ochrany, signální molekuly buněčné regulace
- za určitých okolností – toxické látky, dezinformační agenti – schopnost organismus poškodit a dokonce i usmrtit
- volný radikál = atom nebo molekula obsahující alespoň jeden orbital s jediným (nepárovým) elektronem; většina biomolekul nejsou radikály
- vznik volného radikálu
  - homolytickým štěpením
    - štěpení kovalentní (dvouelektronové) chemické vazby – každý fragment získá jeden nepárový elektron
    - nutné hodně energie: vysoká teplota, UV nebo ionizační záření
  - redukcí – přidání 1 elektronu k normální molekule
  - oxidací – ztráta 1 elektronu
  - v biologických systémech vznikají oxidací a redukcí → mohou být neutrální částice, nebo kladné či záporné ionty
  - tečka (·) ve vzorci značí nepárový elektron
- obecně bývají radikály velmi reaktivní – snaží si doplnit párový elektron → pokud radikál reaguje s normální molekulou, změní ji na radikál a radikálová reakce se tak šíří do okolí
  - pouze reakcí dvou radikálů se nepárové elektrony spojí ve dvojici → radikálová reakce se tak ukončí (terminace)
- dvouatomová molekula kyslíku je také radikál – ve dvou orbitalech má po jednom nepárovém elektronu – s biomolekulami reaguje ale relativně pomalu – musí totiž změnit spin jednoho z elektronů (překonat spinovou restrikcí) – v reaktivnější formy se však může velmi snadno změnit dodáním energie

### Reaktivní formy kyslíku

<b>Volné radikály</b>	<b>Látky, které nejsou volnými radikály</b>
superoxid, $O_2^{\cdot -}$	peroxid vodíku, $H_2O_2$
hydroxylový radikál, $HO^{\cdot}$	kyselina chlorná, $HOCl$
peroxyl, $ROO^{\cdot}$	ozon, $O_3$
alkoxyl, $RO^{\cdot}$	singletový kyslík, $^1O_2$
hydroperoxyl, $HO_2^{\cdot}$	-

- 1. přijetím jednoho elektronu se molekula kyslíku (biradikál) redukuje na superoxid (monoradikál):  $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot -}$
- 2. elektron redukuje superoxid na peroxid vodíku:  $O_2^{\cdot -} + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$
- 3. s dalším elektronem se peroxid vodíku rozpadá na vodu (disociovaná forma – hydroxidový ion) a hydroxylový radikál:  $H_2O_2 + e^- \rightarrow OH^- + HO^{\cdot}$
- 4. poslední elektron redukuje  $HO^{\cdot}$  na další molekulu vody:  $HO^{\cdot} + e^- \rightarrow OH^-$

- čtyřelektronová redukce molekuly atmosférického kyslíku na 2 molekuly vody je nutná pro aerobní způsob života – probíhá v dýchacím řetězci mitochondrií – v aktivním centru cytochromoxidázy – umožňuje transformaci energie chemických vazeb živin do ATP
- hydroxylový radikál ( $\text{HO}\cdot$ ) – jako volná částice je nejjedovatější látka (ve vazbě s enzymem není škodlivý) – ve tkáni se okamžitě slučuje s jakoukoli molekulou, nebo z ní vytrhne elektron a tím ji aktivuje (nenasyčené MK, AMK, báze NK)
- singletový kyslík – vzniká po vystavení záření nebo po chemické reakci → získal při tom energii, která vyzdvihla nepárové elektrony do jiné orbitalové pozice (příp. změnila jeho spin) – změnilo se pouze uspořádání elektronů → velice reaktivní
  - slučuje se např. s nenasycenými MK na lipidové peroxidy
  - vznik v těle: po absorpci světla některými pigmenty, při spontánní neenzymové dismutaci superoxidu
- superoxid – má oxidační i redukční vlastnosti
  - podléhá dismutaci = jedna jeho molekula poskytuje elektron druhé – zároveň se oxiduje i redukuje:  $\text{O}_2\cdot^- + \text{O}_2\cdot^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$
  - dismutace je v biologických organismech urychlována superoxid-dismutázou
- peroxid vodíku – není to radikál – účastní se ale jejich vzniku
  - Fentonova reakce – železem katalyzovaná reakce (v přítomnosti tranzitních kovů:  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$  se peroxid pohotově redukuje):  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{HO}\cdot + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$
  - po Fentonově reakci je  $\text{Fe}^{3+}$  superoxidem redukováno zpět na  $\text{Fe}^{2+}$  - regenerace
  - nutné uložení tranzitních kovů v bezpečných formách (ferritin, tranferin, ceruloplasmin) – čas pro odstranění superoxidu z tkáně superoxid-dismutázou a peroxidu vodíku katalázou (oba enzymy jsou součástí antioxidačního ochranného systému organismu)
- kyselina chlorná
  - syntéza neutrofilními granulocyty (polymorfonukleáry) pomocí myeloperoxidázy:  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{HClO} + \text{H}_2\text{O}$
  - silný oxidant – spolu s dalšími RONS používána polymorfonukleáry jako baktericidní prostředek

### Reaktivní formy dusíku

Volné radikály	Látky, které nejsou volnými radikály
oxid dusnatý, $\text{NO}\cdot$	nitrosyl, $\text{NO}^+$
oxid dusičitý, $\text{NO}_2\cdot$	nitroxid, NO
	kyselina dusitá, $\text{HNO}_2$
	oxid dusitý, $\text{N}_2\text{O}_3$
	oxid dusičitý, $\text{N}_2\text{O}_4$
	nitronium, $\text{NO}_2^+$
	peroxynitrit, ONOO
	alkylperoxynitrit, ROONO

- oxid dusnatý – za určitých okolností prudce jedovatý
  - in vivo reaguje velmi pomalu – difuze  $\text{NO}\cdot$  do krve a jeho inaktivace Hb je mnohem rychlejší než uvažované reakce s většinou biomolekul včetně kyslíku

- in vivo reaguje dostatečně rychle jen s tranzitními kovy a radikály
- jeho metabolity jsou velmi reaktivní
- in vitro: 1. ve vysoké koncentraci rychle reaguje s kyslíkem na oxid dusičitý a posléze na dusitan
  - 2. má krátký poločas v pokusech s perfuzí orgánů → i nízká koncentrace stačí in vivo k jeho regulačním funkcím a přitom neškodí
- biologický poločas pouze několik sekund – pohotově a průběžně vychytáván v erythrocytech – reaguje v železem oxyHb → vzniká metHb a nitrát
- pohotově se navazuje na hemové železo guanylátacyklázy – podstata stimulace syntézy cGMP vedoucí k relaxaci hladké svaloviny cév (vazodilatace) a mechanismu dalších regulací
- in vivo se v přítomnosti akceptorů elektronů ( $\text{NO}_2^-$ , tranzitní kovy) slučuje s fenoly, thioly a se sekundárními aminy
- reakcí s –SH skupinami cysteinu, glutathionu, albuminu a dalších látek vznikají nitrosothioly (thionitrity) – zřejmě transportní forma  $\text{NO}^\cdot$
- peroxynitrit – vzniká reakcí  $\text{NO}^\cdot$  se superoxidem:  $\text{NO}^\cdot + \text{O}_2^- \rightarrow \text{OONO}^-$ 
  - fyziologické podmínky (pH 7, nízká koncentrace superoxidu a  $\text{NO}^\cdot$ ) nejsou pro jeho vznik výhodné – při intenzivní syntéze  $\text{NO}^\cdot$  a  $\text{O}_2^-$  může jeho koncentrace dosáhnout mikromolární hladiny
  - oxidační činidlo – za fyziologického pH se protonovaný peroxynitrit (kyselina peroxydusitá) rozkládá na hydroxylový radikál a oxid dusičitý
  - in vivo odpovědný za nitraci a hydroxylaci tyrozinu
  - tranzitní kovy katalyzují jeho heterolytické štěpení na hydroxidový anion a nitroniový kation (schopnost napadnout fenolové sloučeniny a in vivo v proteinech měnit např. tyrosin na 3-nitrotyrosin)

## 6. Fyziologická úloha reaktivních forem kyslíku v metabolismu: tkáňové hormony, zbraně fagocytů, hydroxylázy, redoxní signalizace

- účastní se uvolňování a přeměny energie nezbytné pro životní pochody
- součástí enzymových mechanismů
- některé jsou signálními molekulami v buněčném informačním systému
- škodí pouze tehdy, vymknou-li se přísné kontrole
- nástroj oxidáz a oxygenáz
  - cytochromoxidáza – funkčně poslední enzym dýchacího řetězce ve vnitřní mitochondriální membráně
    - přijímá elektrony pocházející ze živin a předává je na molekulární kyslík
    - redukuje kyslík 4 elektrony → vznik 2 molekul vody a uvolnění energie pro syntézu ATP
    - toxické meziprodukty ( $\text{H}_2\text{O}_2$  a superoxid) zůstávají navázány na enzym
  - monooxygenázy = oxygenázy se smíšenou funkcí
    - začleňují do molekuly substrátu –OH skupinu = hydroxylázy
    - aktivují kyslík v ER jater nebo mitochondriích nadledviny

- dioxygen redukován 3 elektrony na úroveň hydroxylového radikálu → použit k hydroxylaci řady endogenních a exogenních látek (i léků)
  - hydroxylace významná při syntéze cholesterolu a jeho přeměně na žluč. kys.
  - xenobiotika se po hydroxylaci mohou konjugovat s hydrofilními látkami → rozpustnější ve vodě → snazší vyloučení z těla
  - ROS zůstávají na enzymu
- RONS jako účinná zbraň fagocytů proti bakteriím a cizím strukturám
  - neutrofilny a makrofágy – ROS používají k odstranění zbytků mrtvých buněk a k zabíjení bakterií
  - enzymový komplex NADPH-oxidáza na plazmatické membráně – obsahuje flavocytochrom b<sub>558</sub> – komplex se po pohlcení částice aktivuje a redukuje dioxygen na superoxid → takto aktivované buňky zvýší spotřebu O<sub>2</sub> (respirační vzplanutí) → superoxid se mění na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
  - kyselé prostředí ve fagosomu podporuje uvolnění iontů železa → Fentonova reakce → tvorba hydroxylového radikálu
  - polymorfonukleáry – po splynutí fagosomu s jinými vakuolami vstoupí do systému ještě myeloperoxidáza → katalyzuje tvorbu HOCl z H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a Cl<sup>-</sup> → může být dalším zdrojem HO<sup>·</sup> po reakci se superoxidem
  - makrofágy, neutrofilny, další bb. – účinkem cytokinů, mikrobů a jejich produktů stimulována exprese indukovatelné syntázy oxidu dusnatého (NOS II) nezávislé na Ca<sup>2+</sup> - kalmodulin je aktivní podjednotkou enzymu
  - NOS II ↑ koncentraci NO<sup>·</sup> o několik řádů → ten pak nestačí být odstraněn difuzí do krve, vytváří se superoxid → reagují spolu na peroxyinitrit – baktericidní prostředek sloužící k oxidaci a nitraci cizorodých (a někdy i vlastních) struktur
  - zvláště citliví jsou intracelulární paraziti (Plasmodia a Leishmania), některé viry, houby, bakterie a nádorové buňky
  - chronická granulomatóza – defekt NADPH-oxidázy → časté infekce kůže, plic, jater, kostí → RONS se uvolní i do extracelulárního prostoru, kde mohou poškodit okolní tkáňové a buněčné struktury
- RONS jako signální molekuly
  - signály – intra i extracelulární – prostřednictvím buněčné molekulární informační sítě řídí buněčné pochody, ovlivňují aktivitu enzymů a expresi genů
  - stav oxidoredukčního prostředí a RONS se na tomto řízení podílejí buď přímo, nebo ovlivněním regulačních molekul
  - primární posly – přinášejí informace do buňky z okolí
    - hormony, neurotransmitery, růstové faktory i fyzikální podněty
    - buněčná signální (transdukční) cesta – speciální kaskáda molekulárních interakcí převádějící informaci k cílové struktuře nebo pochodu v buňce
  - receptor – navazuje se na něj signální molekula, pokud není rozpustná v lipidech
    - speciální protein zanořený do plazmatické membrány cílové buňky
    - může reagovat s dalšími molekulami transdukční cesty (protein G, proteinkinázy) → aktivují kaskádu enzymů → vytvoří nebo uvolní sekundární a terciární posly → podporují proteinkinázovou fosforylaci dalších článků

cesty → změna aktivity významného metabolického enzymu nebo vazba/uvolnění transkripčního faktoru

- signální cesty vzájemně propojené vytvářejí informační síť
- ROS jsou považovány za informační druhé posly
- změny nízkých koncentrací ROS (= regulační mechanismus) **X** masivní produkce ROS (= nástroj imunitní ochrany)
- ROS produkované NADPH-oxidázou jsou signálními molekulami ovlivňujícími buněčné funkce i syntézu cytokinů, adhezinů a regulátorů proliferace
- dva ze známých transkripčních faktorů (NF-κB, AP-1) mění aktivitu působením ROS
- po navázání TNFα na příslušný receptor se spustí tvorba ROS
- oxidoredukční prostředí (redox stav) buňky – definováno kapacitou antioxidačního systému, dostupností redukčních ekvivalentů a intenzitou oxidační zátěže (které je buňka vystavena příjmem RONS z okolí i IC zdrojů) – tento stav ovlivňuje oxidoredukčně citlivé skupiny na molekulách signálních cest a tím modifikuje informaci přenášenou v buněčné informační síti
- redoxní senzory – sousedící –SH skupiny – zoxidují produkty oxidačního stresu (lipidové hydroperoxydy, intracelulární H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) na disulfidické můstky
- NO<sup>•</sup> - důležitá signální molekula
  - konstitutivní NOS I v několika oblastech CNS a ANS závislá na Ca<sup>2+</sup> → zvláštní neurotransmitter (v synaptické štěrbině perzistuje několik sekund a jako snadno difundující látka zasáhne oblast s několika miliony synapsí) – spíše modulátor ovlivňující oscilační chování neuronální sítě
  - stimuluje syntézu jiných neurotransmiterů, ovlivňuje diferenciaci neuronů, genovou expresi, učení a dlouhodobou paměť
  - při uvolnění s plexus myentericus vyvolává relaxaci střevní hladké svaloviny
  - nezbytný pro vazodilataci v corpus cavernosum penis → erekce
  - NOS III v cévním endotelu → vazodilatace, inhibice agregace a adheze trombocytů, inhibitor adheze leukocytů na endotel, antiproliferativní účinek na buňky hladké svaloviny cévní stěny
  - EDRF = endothelium derived relaxing factor
  - v krevním oběhu působí jako zvláštní hormon – informaci sděluje pomocí své koncentrace – ta je neustále snižována erytrocyty vazbou na oxyHb
  - v plicním cévním endotelu je exprese NOS III potlačena hypoxií
  - příjemcem informace od NO<sup>•</sup> je solubilní guanylátcykláza

## 7. Peroxidace lipidů jako příklad oxidačního poškození biomolekul. Úloha přechodných kovů (železo, měď) v patobiochemii reaktivních forem kyslíku.

### Peroxidace lipidů (= lipoperoxidace)

- oxidativní poškození vyšších mastných kyselin v autokatalytickém nekontrolovaném procesu → výsledkem je tvorba hydroperoxidů lipidů a jiných sekundárních metabolitů vč. aldehydů
- může ji nastartovat každá látka s dostatečnou afinitou k elektronům schopná vytrhnout vodíkový atom z methylenové skupiny uhlovodíkového řetězce mastné kyseliny
  - volné radikály: hydroxylový (HO<sup>•</sup>), alkoxylový (RO<sup>•</sup>), peroxylový (ROO<sup>•</sup>) radikál

- k urychlení přispívají i ionty některých kovů – např. železa nebo mědi
- substrát: nenasycené vyšší mastné kyseliny (součástí fosfolipidů biologických membrán a plazmatických lipoproteinů) – nejnadhěji podléhají karboxylové kyseliny se dvěma a více dvojnými vazbami – kyselina linolová (18:2), linolenová (18:3), arachidonová (20:4)
- podmínka – přítomnost minimálně 2 dvojných vazeb oddělených methylenovou skupinou
- tři fáze: iniciace, propagace, terminace
- iniciace – z uhlovodíkového řetězce MK je působením volných radikálů odštěpen atom vodíku za vzniku volného radikálu mastné kyseliny a vody
  - elektrony v MK se přeskupí tak, že mezi 2 dvojnými vazbami zůstane pouze jedna jednoduchá (původně mezi nimi byly dvě jednoduché) → konjugovaný dien → velmi rychle v aerobním prostředí reaguje s kyslíkem za vzniku radikálu peroxyly
- propagace – iniciuje se oxidace dalšího řetězce polynenasycené mastné kyseliny
  - peroxylový radikál je schopen z vedlejší MK vytrhnout vodík → nový radikál → původní radikál se přemění na hydroperoxid (lipoperoxid LOOH) s konjugovaným uspořádáním dvojných vazeb → sled reakcí se může mnohonásobně opakovat
  - lipoperoxidy – mají oproti původní MK posunutou dvojnou vazbu – primární reakční produkty lipoperoxidace → mohou se měnit reakcemi za vzniku cyklických produktů, štěpením, polymeračními reakcemi – sekundární produkty lipoperoxidace
- terminace – při vyčerpání substrátu, při vzájemné reakci dvou radikálů, nebo působením antioxidantů (např. tokoferolu)
- při nekontrolovaném průběhu – in vivo destruktivní proces → mění se struktura a funkce napadených sloučenin (nejen lipidů, ale i bílkovin, enzymů, nukleových kyselin)
- žluknutí tuků – oxidační reakce v průběhu skladování/zpracování

### Úloha železa

- přechodný prvek – předposlední elektronovou slupku nemá zcela zaplněnou (i měď)
- ionty  $Fe^{2+}$  s peroxidem vodíku tvoří velmi reaktivní meziprodukty, např. feryl
  - Fentonova reakce:  $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow [oxo-železo-komplexy] \rightarrow Fe^{3+} + HO\cdot + OH^-$
- superoxid může redukovat  $Fe^{3+}$  na  $Fe^{2+}$ :  $Fe^{3+} + O_2^- \rightarrow [oxo-Fe-komplexy] \rightarrow Fe^{2+} + O_2$
- $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$  v biologických systémech neexistují samostatně – vážou se do komplexů s molekulou nesoucí atom s volným elektronovým párem – ligand → bývalý ion vloží svůj náboj do celkového náboje komplexu
- součástí hemoproteinových enzymů (peroxidázy, cytochromoxidáza, cytochrom P-450)
- reaktivita železa je různá v závislosti na molekule, se kterou vytvořilo komplex (chelát)
- součástí hemoglobinu (70% Fe) a myoglobinu (10% Fe) – transport molekulárního kyslíku
- pentózový cyklus v erytrocytu – zdroj redukčních ekvivalentů → Fe ani ROS nemají čas na rozvoj oxidačního stresu a hemolýzy → Hb funguje jako antioxidant
- haptoglobin (vychytává volný Hb), hemopexin (odstraňuje volný hem)
- v potravě  $Fe^{3+}$  → vlivem askorbátu  $Fe^{2+}$  → vstřebání do erytrocytu → předání na transferin
- transferin – váže dva ionty  $Fe^{3+}$
- ferritin – schopen přijmout až 4500 atomů železa
- IC Fe řídí na translační úrovni syntézu transferinového receptoru a ferritinu

- volné železo – oxidoredukčně aktivní Fe vázané na jiné proteiny nízkomolekulární látky – slouží k fyziologickým potřebám, ale vstupuje do Fentonovy reakce → je existence slučitelná se životem pouze v rovnováze s antioxidačním systémem
- primární ochrana před toxicitou Fe → oddělení od dalších substrátů Fentonovy reakce

### Úloha mědi

- organismus obsahuje 100mg mědi
- absorbovaná Cu (1mg/den) → naváže se na albumin → do jater → hepatocyty syntezují ceruloplasmin (CP) – schopen vázat 6 atomů Cu, váže 95% tělesné mědi → uvolněn do plazmy → předává Cu podle potřeby různým tkáním
- součástí proteinů a enzymů (cytochromoxidáza, SOD, dopamin β-hydroxyláza, tyrozináza)
- CP – feroxidázová aktivita – oxiduje Fe<sup>2+</sup> na Fe<sup>3+</sup> bez vedlejší produkce ROS → skutečnou úlohou CP není transport mědi, ale železa
- přechodný prvek – ve své oxidoredukční formě se účastní Fentonovy reakce, stimuluje peroxidaci lipidů a oxidační poškození jiných biomolekul

## **8. Antioxidační ochrana lidského těla**

Existují tři možné typy ochrany organismu:

1. Bránit se tvorbě nadměrného množství RONS regulací aktivity enzymů, které je tvoří, nebo vychytáváním tranzitních prvků z reaktivních pozic.
  2. Záchyt a odstranění vytvořených radikálů – vychytávače/zametače (scavengers), lapače (trappers) a zhasiče (quenchers). Dělení na enzymy a látky dávající s RONS stálější produkty
  3. Reparační mechanismy poškozených molekul
- antioxidanty vzájemně spolupracují – funkce jednoho často podmiňuje účinek jiného
  - příčinou patologického stavu může být jednak nadměrná produkce RONS, ale i porušení rovnováhy složek antioxidační soustavy

### Enzymové antioxidační systémy

- superoxidodismutáza (SOD) – obsažena v každé buňce
  - urychluje spontánní dismutaci superoxidu na dioxygen a peroxid vodíku
  - Cu,Zn-SOD (SOD1)- ze dvou identických podjednotek – v každé je atom Cu a Zn
    - velmi stabilní, katalyzuje při pH 4,5-9,5
    - v cytosolu a mezimembránovém prostoru mitochondrií
    - přenos elektronu s jedné molekuly superoxidu na druhou obstarává Cu
    - Zn má stabilizační funkci, katalýzy se neúčastní
  - Mn-SOD (SOD2), Fe-SOD
    - vyskytují se u prokaryot jako dimery – Fe-SOD nebyla nalezena v živočišných buňkách
    - proenzym má signální úsek – adresa pro přesun vytvořeného proteinu do mtch
  - extracelulární SOD (EC-SOD) – živočišná
    - dismutaci katalyzuje atom Cu, molekulu stabilizuje atom Zn
    - vazebné místo pro heparansulfát – váže se na luminální povrch endotelu



- glutathionperoxidázy – odstraňují intracelulární hydroperoxydy
  - cytosolová GSH-glutathionperoxidáza (cGPx)
    - rozkládá několik typů hydroperoxidů mastných kyselin – ty ovšem musí být nejprve fosfolipázou A<sub>2</sub> uvolněny z poškozených lipidů
    - aktivní i v dismutaci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – spolupracuje s katalázou při odstraňování H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
  - fosfolipidhydroperoxid-GSH-peroxidáza (PHGPx) – monomer
    - redukuje fosfolipidové hydroperoxydy na neškodné hydroxyderiváty přímo v membránách a bez uvolnění MK z lipidů – zabraňuje neenzymové peroxidaci lipidů
  - gastrointestinální (giGPx) a plazmatická (pGPx) – neobjasněná funkce
  - selenoproteiny – obsahují selenocysteinový zbytek jako součást peptidového řetězce
    - součást aktivního centra enzymu – redukuje peroxid 2 elektrony na hydroxylovou skupinu (nebo vodu) a sám se oxiduje na selenol → ten se regeneruje 2 elektrony dvěma glutathionů zpět na selenocystein
  - oxidovaný glutathion (GSSG) se musí redukovat zpět na GSH - glutathionreduktáza
- glutathiontransferázy (GST)
  - katalyzuje konjugační reakci - -SH skupina GSH je navázána na elektrofilní organickou látku → detoxikace cizorodých látek (xenobiotik)
  - ochrana před následky lipoperoxidace
- kataláza (KAT)
  - 4 tetraedricky uspořádané podjednotky – v každé 1 protoporfyrinová skupina s Fe<sup>3+</sup>
  - katalyzuje dvouelektronovou dismutaci peroxidu na dioxygen a vodu
  - katalyzuje peroxidázové reakce nevýznamné pro antioxidační ochranu

#### Vysokomolekulární endogenní antioxidydy

- proteiny se schopností vázat přechodné kovy a tak měnit jejich oxidoredukční vlastnosti → přestanou katalyzovat radikálové reakce
- transferin (plasma), laktoferin (polymorfonukleáry) – váží Fe<sup>3+</sup> → nevstoupí do Fentonovy r.
- feritin – feroxidázová aktivita – udržuje skladované Fe v oxidovaném stavu
- haptoglobin – vychytává extracelulární Hb (prooxidačně nebezpečná forma železa)
- hemopexin – váže uvolněný hem
- ceruloplazmin – váže měď – podstatná pro feroxidázovou aktivitu ceruloplazminu – oxiduje Fe<sup>2+</sup> na Fe<sup>3+</sup> → uvolnění Fe z buněk a jeho předání transferinu
  - současně se kyslík oxiduje 4 elektrony – nevznikají toxické meziprodukty
- albumin – váže Cu<sup>2+</sup> → ten se peroxidem vodíku oxiduje na Cu<sup>3+</sup> → poškozuje okolní struktury albuminu – molekuly albuminu se vlastně obětují
- metalothioneiny – proteiny obsahující hodně cysteinů a žádné aromatické AMK – prostřednictvím síry chelatují ionty kovů
  - při oxidačním stresu se zvýší jejich syntéza
- chaperony – váží nascentní proteiny a pomáhají při jejich posttranslační prostorové úpravě
  - oxidační stres indukuje jejich syntézu → rozpoznají oxidací poškozené proteiny → naváží je na sebe → urychlí jejich odstranění v proteasomech

### Nízkomolekulární endogenní antioxidanty

- askorbát (vit. C)
  - kofaktor enzymů při syntéze kolagenu a přeměně dopaminu na noradrenalin
  - redukuje  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{2+}$  na  $\text{Cu}^{+}$  → umožňuje vstřebávání železa ze střeva a využití přechodných prvků v aktivním centru hydroxyláz
  - redukuje anorganické i organické radikály a reaguje s  $^1\text{O}_2$  a  $\text{HClO}$
  - regeneruje tokoferylový radikál → mění se na askorbový radikál (méně reaktivní)
- alfa-tokoferol a vitamin E
  - $\alpha$ -tokoferol je biologicky nejúčinnější ze skupiny vitaminů E
  - antioxidační látka membrán – lipofilní izoprenová struktura
  - zneškodňuje peroxylové radikály MK dříve než poškodí sousední lipidy – přeměňuje alkyl peroxylový radikál na hydroperoxyly, se kterými si poradí GPx
  - askorbát zčásti redukuje tokoferylový radikál zpět na tokoferol
- ubichinon (koenzym Q)
  - tlumí radikálové reakce ve všech membránách ve spolupráci s tokoferolem
- karotenoidy,  $\beta$ -karoten a vitamin A
  - odstraňování radikálů centrovaných na uhlík a alkylperoxylových radikálů v lipidech
  - mohou zhaset singletový kyslík – měnit ho na běžný tripletový kyslík
- thioly a disulfidy
  - glutathion (redukováná forma GSH, oxidovaná GSSG)
    - snadno se oxiduje → odstraňuje ROS a udržuje v redukováné formě –SH skupiny proteinů, cysteinu, CoA, regeneruje tokoferol a askorbát
    - s různými ROS reaguje neenzymově
  - kyselina lipoová
    - kofaktor pyruvátdehydrogenázového a  $\alpha$ -ketoglutarátdehydrogenázového komplexu
    - univerzální antioxidant – regeneruje tokoferylový radikál, reaguje s radikály
- melatonin – hormon epifyzy – řídí sezónní reprodukční cyklus řady druhů
  - vychytává hydroxylové radikály – pouze při vysokých farmakologických hladinách
- kyselina močová – konečný produkt odbourávání purinů
  - nejhojnější antioxidant plazmy – vychytávání  $\text{RO}^\cdot$  a  $\text{HClO}$ , váže Fe a Cu do formy nevyvolávající radikálové reakce
- bilirubin – degradační metabolit hemu
  - inhibuje peroxidaci lipidů – regenerují  $\alpha$ -tokoferol
  - zhasí singletový kyslík

### Flavonoidy

- sekundární rostlinné metabolity – součást lidské diety
- tvorba chinoidních struktur → jednoelektronové redukce
- antioxidanty – protizánětlivé, antikancerogenní, zasahují do buněčného signálního systému
- chelatují železo – mohou tlumit oxidační stres tkáně

## 9. Biochemický podklad stárnutí organismu. Radikálová/mitochondriální teorie, stárnutí jako katabolické selhání, vztah k chronickému zánětu.

- stárnutí – pokles vitality s věkem, vzestup náchylnosti k různým chorobám
- u různých živočichů vypadá stejně, ale probírá různě rychle
- nevyhnutelný důsledek aerobního metabolismu mitochondrií postmitotických tkání
- není přímo naprogramováno genomem – i když geny hrají roli
- na molekulární úrovni – neschopnost obnovovat správnou strukturu biomolekul neomezeně dlouho
- mitochondriální DNA mutuje 10x rychleji než jaderná – není obalena histony, méně dokonalý systém opravy mtDNA
- tvorba kyslíkových radikálů v mitochondriích → nahromadění mutací v mtDNA s věkem → porucha funkce respiračních komplexů → (tvorba radikálů v mtch) → srdeční selhání, svalová slabost, diabetes mellitus, demence, neurodegenerace → „bludný kruh“

### Radikálová/mitochondriální teorie stárnutí

- hromadění oxidačního poškození s věkem
- mitochondriální teorie – mtch jsou hlavní zdroj ROS v organismu – ale nedaří se prokázat, že mtDNA je více poškozována ROS, ani že dramaticky hromadí mutace s věkem
- model dle Kirkwooda a Kovalda
  - určité množství ROS uniká z mitochondrií a poškozuje ostatní buněčné struktury
  - prevence tvorby ROS a systémy opravující DNA nejsou nikdy 100% účinné
  - mírně poškozené mitochondrie produkují méně energie, než buňka potřebuje
- důkazy pro: Life-time Energy Potential
  - drosophila – délka života závisí na teplotě (vyšší t → vyšší spotřeba O<sub>2</sub> → kratší život)
  - u většiny savců je délka života dána určitou sumou srdečních tepů/spotřebou O<sub>2</sub>
  - myši exprimující defektní mtDNA-polymerasu → 3-5x více bodových mutací v mtDNA, více delecí mtDNA → kratší život, předčasné projevy stárnutí

### Stárnutí jako katabolické selhání

- nekompletní degradace v lysosomech, uvolnění Fe z mtch, ROS, lipoperoxidace, cross-linking, agregace a polymerace zoxidovaných proteinů a lipidů → ↑ lipofuscin (v lysosomech), v cytosolu defektní mtch a proteinové agregáty → deficit hydroláz dodávaných do defektních lysosomů, poškozené a hypertrofované mtch nelze odbourat (→ působí pozitivní zpětnou vazbou na bod č. 1) → méně ATP, více ROS, poškozené mitochondrie a lysosomy mohou iniciovat apoptózu

### Vztah k chronickému zánětu

- stresová reakce: oxidace nebo nitrosylace kritických –SH skupin → transkripční faktory: aktivace, translokace do jádra → indukce genové exprese: chaperony (HsP), enzymy antioxidační ochrany, metalothionein, hemoxygenasa 1
- stresová reakce se ve stáří stává chronickou

## 10. Význam mitochondrií v buněčné smrti (apoptóze i nekróze) a fyziologickém stárnutí organismu

### Nekróza

- v časně fázi dochází k narušení buněčných membrán → buňky a jejich organely (např. mitochondrie) začnou „bopnat“ → únik vnitřního obsahu do okolí → zánět, rozpad buňky
- porucha kalciové homeostázy - ischemie a některé toxiny navozují velmi rychlý nárůst cytosolového  $\text{Ca}^{2+}$  tokem z mitochondrií, ER a extracelulárního prostoru → nespecifické zvýšení permeability buněčných membrán a aktivace řady enzymů poškozujících buněčné struktury (fosfolipázy, proteázy, ATPázy, endonukleázy)
- ztráta mitochondriální pyridinových nukleotidů s následným výrazným úbytkem ATP a snížením až nemožností jeho obnovy – důsledek ischemie a působení některých škodlivin
  - vysokoenergetické vazby ve formě ATP jsou důležité pro řadu syntetických i degradačních pochodů
  - ovlivnění integrity plasmatické membrány
- hypoxie – působí na aerobní respiraci – oxidační fosforylaci v mitochondriích
  - ↓ tenze  $\text{O}_2$  → ↓ oxidační fosforylace → ↓ tvorba ATP → anaerobní glykolýza a glykogenolýza → hromadění laktátu, ↑ obsah anorganického fosfátu (hydrolýza fosfátových vazeb) → ↓ IC pH → „zaškrcování“ chromatinu (clamping)
- deplece ATP → porucha Na/K-ATPasy → isoosmotický ↑  $\text{H}_2\text{O}$  v buňce → buněčný edém
- přetrvávající hypoxie → hyperhydratace buňky i mitochondrií → vakuolizace mitochondrií, další poškození membrány
- ireverzibilní poškození nastává při neschopnosti napravení mitochondriální dysfunkce a rozvoji hluboké poruchy membránových funkcí
- postischemické zvýšení ROS vzniká neúplnou redukcí kyslíku v mitochondriích a tvorbou superoxidu oři reakci xantinoxidázy
- při oxidaci v mitochondriích vznikají ROS

### Apoptóza

- dvě signální dráhy vedoucí k apoptóze – vnitřní a vnější
- **vnitřní** – zprostředkovává většinu proapoptotických signálů – jdou hlavně z mitochondrií
  - řízena vzájemným působením dvou faktorů rodiny Bcl-2 a Bax/BH3
- vnější – aktivaci smrtících domén TNF receptorové nadrodiny
- mtch hrají důležitou roli v průběhu apoptózy signální dráhy – uvolnění cytochromu C
- jedním z předpokládaných mechanismů apoptózy je alterace mitochondriální membrány
  - inhibující signál reguluje funkci mitochondriálních kanálů pro ionty a vodu
  - potlačení supresivního signálu (nejsou zde antiapoptózy cytokiny) → neschopnost kanálů udržovat normální iontový potenciál mezi vnitřkem a vnějškem mtch
  - kolaps transmembránového potenciálu → ↑ permeabilitu mtch membrány otevřením jejich pórů → nabobtnání mitochondrií

- nabobtnání postihne především vnitřní membránu (má větší povrch) → ruptury vnější membrány → rozrušení respiračního řetězce → uvolnění cytochromu c z mezimembránového prostoru
- cyt c – na jedné straně nutný pro respiraci, na druhé straně se účastní záhuby buňky
- dvě teorie uvolnění cytochromu c z mitochondrií
  1. otevření megakanálu PTP (permeability transition pore) → průnik solutů a vody do mtch → ruptura vnější membrány → vyplavení mitochondriálních enzymů včetně cyt c do cytoplazmy – nevysvětluje všechny formy apoptózy (mtch mohou být nezměněny)
  2. nepředpokládá větší disruptci vnější membrány – formace kanálů, která umožní přenesení cytochromu c za spoluúčasti VDAC a kanálového proteinu Bcl<sub>2</sub> (udržuje normální funkci mitochondriální membrány společně s kanálovým proteinem Bcl<sub>x</sub>)
- Apaf1 (apoptotic protease-activating factor 1) – váže kaspázu 1 a dATP
  - naváže se na něj cytochrom c → spuštění aktivace kaspázy 9 → podněcuje apoptózu aktivací dalších kaspáz
  - inhibitory kaspáz nezabrání ruptuře vnější mitochondriální membrány → kaspázy samy membránu nenatravují
- nahromadění cytochromu c v cytosolu je známkou probíhající apoptózy
- ARTS (apoptosis-related in TGFβ signaling pathway) – mitochondriální protein
  - zprostředkovává apoptózu navozovanou různými proapoptotickými stimuly
  - v mtch → translokován do jádra → koinciduje s apoptózovým signálem od TGFβ
- AIF (apoptosis inducing factors) – při indukci apoptózy se dostávají z mitochondrie do cytoplazmy společně s cytochromem c, kde aktivují kaspázovou kaskádu

### Stárnutí

- postupně se snižuje kapacita oxidační fosforylace
- dochází k pleomorfní vakuolizaci mitochondrií
- ROS způsobují denně alterace bazí v DNA (i v mtDNA) → převýší se možnosti opravného mechanismu (jeho schopnosti s věkem klesají) → mtDNA více poškozována
- radikálová/mitochondriální teorie stárnutí – viz otázka č. 9

### **11. Za jakých podmínek může být buňka nesmrtelná? Autofagie, Hayflickův limit, telomeráza.**

- buňka k nesmrtelnosti potřebuje:
  - dělení (kdy se mj. ředí neodbouratelné proteiny) nebo spánek v hypoxickém prostředí
  - telomerasu
  - žádné, nebo vypnuté mitochondrie – nejvíce stárnout specializované postmitotické buňky nervové, srdečního a kosterního svalu

### Autofagie

- slouží k odstranění nepotřebných proteinů a organel
- makroautofagie – celé organely
- mikroautofagie – makromolekuly, malé organely
- chaperony zprostředkovaná autofagie – KFERQ proteiny

### Hayflickův limit

- maximální počet dělení, kterým buňka prochází před svým zánikem
- lidské fibroblasty v kultuře se dělí maximálně 50-70x, pak stárnou a hynou
- platí pro všechny somatické buňky, ale neplatí pro nádorové
- u buněk ze starých osob je počet dělení menší
- fibroblasty a epiteliální buňky nikdy Hayflickova limitu nedosáhnou

### Telomeráza

- ribonukleoprotein s vlastním RNA primerem – doplňuje konce chromosomů při replikaci DNA
- většina buněk lidského těla telomerasu nepotřebuje – dělí se málo nebo vůbec
- kmenové, germinální a aktivované imunitní buňky telomerasu mají
- myši somatické buňky telomerázu mají, přesto žije myš kratší dobu než člověk
- experimentální knock-out myšního genu pro telomerázu vedl k předčasnému stárnutí

## **12. Rozdíl mezi průměrnou a maximální délkou života. Vliv genů, teorie „těla na vyhození“, teorie antagonistické pleiotropie, účinek kalorické restrikce.**

- průměrná délka života – naděje dožití (r. 2000): muži 71,65 let, ženy 78,35 let
- maximální délka života – nemění se: cca 115-120 let

### Tělo na vyhození (disposable soma theory)

- bakterie – nestárnou za cenu vysoké mortality
- vyšší organismy – specializace
  - gamety – haploidní (filtr genetických defektů), obrovská redundance a velká selekce, DNA pro další generace
  - soma – diploidní, trvalejší struktura (ale opotřebovává se), DNA není určena pro další generace
- v přírodě se většina živočichů stárnutí nedožije
- v přírodním výběru je rozhodující úspěch v reprodukci
- omezená metabolická energie se musí dělit mezi údržbu těla a reprodukci (trade-off)

### Vliv genů

- teorie antagonistické pleiotropie
  - geny poskytující výhodu v reprodukci, ale poškozující nositele později
  - příklady: Huntingtonova chorea, Hemochromatosa, srpkovitá anémie
- geny se ve vztahu k délce života uplatňují třemi různými způsoby
  1. Geneticky kódovaným programem – programované stárnutí (programovaná smrt) – jeho přítomnost je nutná jednak pro zaručení životního prostoru pro novou generaci, jednak jako ochrana před přílišným zatížením genetického materiálu mutacemi vznikajícími v průběhu života (zkracující se délka telomer po mitotickém dělení)

2. Celkový dopad na délku života všech geneticky programovaných funkcí organismů, které samy o sobě přímý vliv na délku života nemají (rozmnožování, adaptace, diferenciace)

3. Genetický důsledek na funkce organismu, které nejsou řízeny programem smrti, ale které délku života silně ovlivňují – imunita, metabolismus, regenerace, produkce klíčových látek

- dlouhověkost je určena především geneticky
- ovlivnit genetický program (programovanou smrt) můžeme jen samotným zásahem do genetického programu člověka – do struktury DNA
- vzhledem k dlouhověkosti můžeme rozdělit enzymy do tří překrývajících se skupin:
  - enzymy a koenzymy pomáhající asimilovat živiny
  - podporující činnost orgánů, dodávající buňce energii a pomáhající tělo uklízet
  - enzymy a koenzymy chránící před volnými radikály – s antioxidačním účinkem

#### Kalorická restrikce – prodlužuje život

- omezení množství potravy při zachování její biologické kvality
- funguje i u teplokrevných živočichů s konstantní intenzitou metabolismu
- prodlužuje maximální délku života, snižuje oxidační stres, výskyt nádorů a zpomaluje stárnutí
- organismus „přečkávající“ nepříznivé období věnuje více metabolické energie na údržbu
- mechanismus
  - určité potlačení signalizace IGF-1 a inzulínu
  - sirtuiny – enzymy deacetyluující histony, p53, inhibované NADH
- ohledně fungování u lidí probíhají studie

### **13. Metabolický syndrom a inzulínová rezistence (charakteristika, příčiny, důsledky, možné terapeutické ovlivnění)**

- spojení některých nemocí a rizikových faktorů – jejich společný výskyt vede k řadě zdravotních komplikací
- Reaven zařazuje pod tento termín: inzulínorezistenci, porušení glukózové tolerance, hyperinzulinémií, arteriální hypertenzi, hypertriacylglycerolémií, snížené množství HDL a cholesterolu
- bylo vytvořeno několik definic pro metabolický syndrom
- moderní definice ATP III amerického cholesterolového programu:
  1. Obvod pasu u žen nad 88 cm, u mužů na 102 cm
  2. Krevní tlak nad 130/85
  3. Glykemie nad 6,0 mmol/l
  4. Triglyceridy nad 1,7 mmol
  5. HDL-cholesterol pod 1,25 mmol/l (50 mg) u žen a pod 1,0 mmol/l (40 mg) u mužů
- nová definice (2005) – světová + evropská diabetologická společnost (IDF a EASD) – podmínkou je přítomnost abdominální obezity, obvod pasu nad 94cm (muži) a 80cm (ženy)
- „smrtící kvarteto“ – abdominální obezita, arteriální hypertenze, hyperglykémie nebo porucha tolerance, aterogenní dyslipidémie (vzestup TAG a snížení HDL)



- další složky – hyperfibrinogenemie, nefropatie, hyperurikemie, mikroalbuminurie, snížený tkáňový aktivátor plasminogenu
- Důležité je včasné zachycení syndromu – nejčastěji v dospívání/rané dospělosti ↑ TAG
- Složky syndromu mají různou váhu – např. DM 2 nese 4násobné riziko kardiovaskulárních potíží než několik jiných dohromady
- příčina: vliv prostředí – nedostatečný pohyb, nadměrný kalorický příjem, genetické předpoklady (obezita, diabetes, hypertenze v rodině)
- Složky metabolického syndromu
  - 1) **Sy inzulinorezistence** – nejvíce ve svalu a játrech, ale ve všech bb. i mozku, u některých hypertoniků a obézních se nevyskytuje, souvisí s klinickými projevy metab. syndromu
  - 2) **Syndrom zvýšené sympatikotonie** – souvisí s „naladěním“ CNS a stresem, nejčastější projev METSY v dospívání, provází esenciální hypertenzi.
  - 3) **Androidní obezita** - spojena s apoptózou tukových buněk, systémovým zánětem a změnou spektra sekretovaných hormonů tukové tkáně (snížená sekrece adiponektinu, převaha leptinu a prozánětlivých cytokinů). Redukce hmotnosti (bariatrická chirurgie, antiobezitika) → komplexní intervence většiny složek METSY
  - 4) **Syndrom ektopického ukládání** se steatózou jater je vyvolán neschopností tukové tkáně absorbovat další tuk. Tukové buňky systémově secernují látky, ale i lokálně ovlivňují buňky orgánů a také monocyty a další krevní součásti. Obezita (systémového onemocnění) i lokální „obezita“ orgánů.
  - 5) **Sy nízké porodní hmotnosti** – u nemocných se často vyskytuje nízká porodní hmotnost - „small baby syndrom“, Barkerův syndrom.
  - 6) **Sy systémového zánětu** – zdrojem je tuková tkáň, je zde přítomen oxidační stres, endoteliální dysfunkce, porušena sekrece NO. Marker zánětu je zvýšené CRP a tzv. asymetrický dimetylgarginin. Relativně novým zánětlivým onemocněním s vazbami na metabolický syndrom je psoriáza, deprese.
  - 7) **Nutrigenetické a nutrigenomické vlivy** – souvisí se vznikem METSY. Jsou různě vyjádřeny u jedinců s různou genetickou výbavou (nutrigenetika) nebo nutriční vlivy přímo regulují expresi genů (nutrigenomika).
  - 8) **Sarkopenie a sarkopenická obezita** - Absence pohybu a úbytek svalových vláken jsou důležité v rozvoji inzulinorezistence i systémového zánětu. U starší obézní populace má sarkopenie k metabolickému syndromu větší vztah než BMI či obvod pasu.
- **Porušení patofyziologických systémů:**
  1. porucha glykoregulace (porušená glykemie nalačno, porušená glukózová tolerance až po diagnózu diabetu 2. typu, častý je i textační diabetes);
  2. porucha utilizace a tvorby lipidů s hypertriglyceridemií, nízkým cholesterolem HDL, přítomností malých částic LDL; popsáno je současně nízké vstřebávání cholesterolu v trávicím traktu a vystupňovaná endogenní sekrece, což vede prakticky k normální hladině celkového cholesterolu;
  3. zvýšení sympatikotonie a krevního tlaku;
  4. kumulace zejména viscerálního tuku s obezitou, steatózou jaterní a svalovou;
  5. prokoagulační stav s poruchou fibrinolýzy;
  6. tzv. systémový zánět s vyšší hladinou CRP, vyšší sedimentací, hyperurikemií;

7. relativní sterilita, často i projevy syndromu polycystických ovarií a hirsutismu;
  8. výskyt některých nádorů (např. gynekologické nádory a kolorektální karcinom);
  9. sklon k depresi, horší spolupráce v režimové léčbě;
  10. syndrom spánkové apnoe.
- složky syndromu mají vzájemnou vazbu, přítomnost jedné zvyšuje možnost další
  - METSY může postihovat až 30% populace – alespoň 1 složku má 80% populace
  - syndrom defektní protiregulace – organismus pacienta s DM2 je adaptován na hyperinzulinémii → zvýšená sekrece hyperglykemizujících hormonů (glukagon, katecholaminy, růstový hormon, kortizol) a posun glykemického prahu → člověk nerozpozná mírnou hypoglykémii, kterou by mohl korigovat perorální glukózou a snadno upadá do hypoglykemického kómatu

### Inzulinová rezistence (tkáňová odpověď na podání inzulínu je snížena)

- Metody vyšetření:
  - **Přesné** – metoda inzulínového CLAMPU, gluk. i.v. toleranční test
  - **Orientační** – inzulínémie nalačno, test s podáním inzulínu a výpočtem ukazatele poklesu glykémie KITT
- Epidemiologie odpovídá epidem. METSY, je přítomna obvykle při výskytu 1-2 složek syndromu.
- Může být způsobena podáním steroidů, diuretik, betalytik atd. V pediatrii jsou známé tzv. syndromy vrozené inzulínové rezistence.
- Inzulínorezistenci snižuje obvykle redukce hmotnosti, fyzická aktivita, podání tzv. inzulínových senzitizerů, metforminu a některých antihypertenziv, např. ACE inhibitorů.
- Příznaky zkoumány na knock-out zvířatech (vyřazení inzulínového receptoru např. v játrech (LIRKO), ner. tkáni (NIRKO), tuku (FIRKO) a betabuňce (BIRKO-myš))
- NIRKO - normální glykémie, hyperlipoproteinémie, obezita a rysy metabolického syndromu
- LIRKO - těžká inzulínorezistence, diabetes, hyperplazie betabuňek.
- FIRKO - ochrana před obezitou a diabetem.
- BIRKO - ztráta časně fáze sekrece inzulínu, s věkem progredující diabetes 2. typu, zmenšené betabuňky.
- Příčiny selhání sekrece inzulínu u diabetiků 2. typu:
  - toxické působení lipidů (lipotoxicita)
  - toxické působení hyperglykémie (glukotoxicita)
  - selhání energeticky betabuňky - mitochondriální změny
  - špatný přenos glukózy do buňky - poruchy tzv. přenašečů zejména GLUT2
  - snížení tvorby stimulatorů sekrece v GIT – inkretiny
  - vyčerpání betabuňky
  - depozita tuku a dalších látek v Langerhansových ostrůvcích
  - inzulínorezistence betabuňky - myš BIRKO.
- Druhy- receptorová, postreceptorová (metsy) a protilátková
- Podání lipidů vede ke zhoršení utilizace glukózy (oxid MK snižuje oxidaci glukózy)
- U obezních jedinců vždy část hyperinzulinémie vyvolána hypersekrečí (dietně), další část kompenzací inzulínorezistence. Vztahy inzulínové sekrece a inzulínové senzitivity jsou

hyperbolické a posunuté podle existence či neexistence obezity. Obéznější mají větší hypersekreční podíl na inzulinémii.

#### 14. Tvorba AGEs, interakce AGE-RAGE, terapeutické možnosti redukce tvorby / účinku

##### AGEs (advanced glycation end products)

- Jsou to produkty pokročilé glykace
- Heterogenní skupina látek, patří mezi ně pentosidin, GOLD, MOLD
- Charakteristická žlutohnědá pigmentace a fluorescence
- Modifikují biologické struktury, vazba na bílkoviny, schopnost zesílení – crosslinking
- Reagují se specifickými receptory – např. RAGE
- Význam při DM, chronickém renálním selhání, ateroskleróza, neurodeg. Onemocnění
- Změny vlastností pozměněných AGE bílkovin:
  - Změna rozpustnosti
  - Změna náboje
  - Nižší izoelektrický bod
  - Crosslinking
  - Zvýšená rezistence k tepelné denaturaci
  - Stabilita vůči snížení pH

##### Tvorba (co ovlivňuje jejich hladinu v organismu)

- Neenzymatická glykace – reakce volných aminoskupin s karbonylovými skupinami redukujících cukrů bez katalytického účinku enzymů, též Maillardova reakce (pozoroval hnědnutí bílkovin při zahřívání s cukry) – má 3 části:
  - Iniclace – neenzymová kondenzace aldehyd skupiny redukujícího cukru a aminové skupiny za vzniku nestab. Schiffovy baze, reverzibilní reakce, k dosažení rovnováhy dojde během pár hodin
  - Propagace – Schiff baze během několika dní podlehne přesmyku na Amadoriho produkty (ketoaminy), částečně reverzibilní, rovnováha na straně vzniku AmP (ustálení 20-30 dní). V této fázi mohou být AmP rozkládány na glyoxal, methylglyoxal, deoxyglukoson (při vyšším pH, eliminují amin z prvního C)- velmi reaktivní – propagátory neenzym glykace, nenávratně poškozují proteiny
  - Terminace – reakce AmP nebo jejich degradačních sloučenin s volnými amino skup. proteinů s dlouhou životností (kolagen, elastin, myelin)→vznik AGE , ireverzibilní děj, který trvale poškozují tkáň, v kterých se AGE ukládají.
- Oxidační stres = nerovnováha mezi tvorbou volných radikálů a antioxidantů, které je mají z těla odstranit. Rovnováha je posunuta ve prospěch radikálů.
  - Poškozují biologické struktury – lipidy (lipoperoxidace), proteiny (zesítnění), cukry (glykosylace) a NK (mutace DNA)
  - Volné radikály – hydroxylový, superoxid, herbicidy, pesticidy,...
  - Antioxidanty – Vit. C, E, selen, β-karoten
- Karbonylový stres – zvýšení reaktivních karbonylových sloučenin – zvýšená tvorba nebo snížené odbourávání (chyba eliminace- aldehyddehydrogenáza) a následné vylučování
  - Vznikají autooxidací sacharidů, polynenasycených MK

- Glyoxal, glykoaldehyd, hydroxynonenal
- Dochází k modifikaci biologických struktur, má vztah k oxidačnímu stresu, hyperglykémii, hyperlipidémii

Interakce AGE-RAGE – receptor pro produkty pokročilé glykace, transmembránový protein, patří do imunoglobulinové superrodiny, má schopnost vázat AGE sloučeniny

- Interakce s AGE – způsobí vnitrobuněčnou signalizaci, nejčastěji na bb endotelu (oblasti typicky postižené aterosklerózou), makrofázích a mikroglíích v mozkové tkáni
- Vede k oxidačnímu stresu a aktivaci MAP-kináz → aktivace transkripčních faktorů (NF-κB – velmi citlivý na tyto mechanismy) → kaskáda reakcí, která vede k tvorbě mnoha molekul

Působení RAGE v organismu:

- Aktivace NF-κB faktoru, exprese adhezivních molekul, zvýšená buň. Proliferace
- Stimulace tvorby cytokinů (IL-1, TNF-α, interferon γ) a růst. faktorů (PDGF, IGF-1)
- Zvýšení vaskulární permeability, podněcuje migraci makrofágů, tvoří se endotelin
- Dochází k mutacím DNA, zvyšuje se syntéza kolagenu IV, proteoglykanů, fibronektinu
- V místě zánětu tvoří fagocyty karboxymethyllysiny (CML)

Negativní působení RAGE:

- DM – mikrovaskulární komplikace, nefropatie, depozita v bazální membráně, změna náboje, sekrece růstových faktorů, zhuštění a zmnožení mezangiální matrix, zvýšení vaskulární permeabil., neuropatie (degen. změny vláken i pochvy, som i autonomní), retinopatie (edém, ischemie, fibróza cév, krvácení do sklivce, mikroaneurysmata,...)
- Kardiovaskulární komplikace – modifikace proteinů cévní stěny, crosslinking, zvýšená produkce ECM, glykace a oxidace LDL částice, poškození endotelu-glykace kolagenu
- Hromadění AGEs v pyramidových buňkách způsobuje Alzheimerovu chorobu
- Poškození arterií (zeslabení stěny, změny propustnosti)
- Ateroskleróza, chronická plicní onemocnění, jaterní cirhóza, revmatoidní artritida

Terapeutická redukce účinku AGEs – zamezení jejich negativních vlivů

- vznik – zamezení příjmu nežádoucích potravin, snížení hyperglykémie a hyperlipidémie, inhibice tvorby (snížení oxidačního stresu)
- chemické degradace zesíťovaných proteinů
- interakce AGEs- RAGE – ovlivnění účinku na receptor anti RAGEAb, sRAGE (solubilní receptor pro AGEs je inhibítozem toxických účinků AGEs), sérová hladina snížena u pacientů s ICHS, DM a arteriální hypertenzí
- léky (látky) – taurin, carnosin, aspirin, pyridoxaamin, aminoguanidin, kys. A-lipoová

## 15. Mechanismus hyperglykémii indukovaného poškození tkání

- Hyperglykémie – zvýšená koncentrace glukózy v krvi (nad normu 3,5 -5,5), hladinu glukózy udržuje inzulín, glukagon, kortizol, STH a katecholaminy.

Nejčastější příčiny hyperglykémie:

- 1) Nadměrný přívod sacharidů
- 2) Absolutní nedostatek inzulínu – DM 1. Typu

- 3) Inzulínová rezistence – DM 2. typu, metabolický syndrom, doprovází některé infekce, mozkové příhody, pooperační stavy, součástí Reavenova syndromu.
- 4) Zvýšené působení hyperglykemizujících faktorů:
  - a) Sympatoadrenální systém – stres
  - b) Glukokortikoidy – stres, hyperkortikalismus, terapie kortikoidy, steroidní diabetes při Cushingově syndromu
  - c) STH – akromegalie
  - d) Glukagon – glukagonom

Příznaky hyperglykémie – časté močení, žízeň, známky dehydratace, iontové poruchy, v těžkých případech poruchy vědomí až koma

Důsledky hyperglykémie – závisejí na příčině, délce trvání a stupni

- Narušuje funkčně i strukturálně pojivovou tkáň
- Zvýšená neenzymová glykace proteinů (AGEs, ↑ glykovaný hemoglobin HbA1c)
- Polypová cesta (zvýšený výskyt sorbitolu) a vznik kyslíkových radikálů
- Překročení renálního prahu (10 mmol/l) → glykosurie (ztráty energie, ↑ riziko moč. infekcí, dehydratace, poruchy iontové homeostázy)
- Hyperglykémie = ↑ osmolarity ECT → hyperglykemické hyperosmolární kóma u DM 2, těžká dehydratace, hyperosmolarita a rozvrat vnitřního prostředí

Molekulární podklad orgánových změn při dlouhotrvající hyperglykémii

- Glukóza se v buňkách, které obsahují aldózoreduktázu metabolizuje na sorbitol, ten neprochází buněčnou membránou, hromadí se v buňkách a způsobuje jejich edém
- 1) **Poškození zraku** - nahromaděním sorbitolu v oční čočce dochází k zadržování vody → omezuje transparentnost čočky (zakalení čočky-katarakta)
  - 2) **Zhoršení vedení vzruchů neurony**
    - sorbitol se hromadí ve Schwannových buňkách a v neuronech narušuje vedení axonem (polyneuropatie), poškozují především vegetativní řízení, reflexy a cití
    - buňky produkují proti edému kompenzačně myoinositol, který jim chybí pro jiné funkce
  - 3) **Oslabení imunitního systému**
    - Buňky, které neabsorbují v dostatečné míře glukózu, se v důsledku extracelulární hyperosmolarity srašťují
    - U lymfocytů vede srašťování k omezení jejich funkce (tvorba superoxidů, důležitá pro imunitní obranné reakce)
    - Pacienti s diabetem- zvýšený sklon k infekcím, př. infekce kůže (furunkl) nebo ledvin (polynefritis), infekce zvyšují potřebu inzulínu (vedou k většímu uvolňování antagonistů)
  - 4) **Trombembolické komplikace**
    - Hyperglykémie podporuje tvorbu plazmatických glykoproteinů (fibrinogen, haptoglobin, α<sub>2</sub>-makroglobulin, koagulační faktory V a VIII) → zvýší se koagulační pohotovost, viskozita a trombembolické riziko
  - 5) **Diabetická angiopatie a vliv na orgánové systémy**
    - Vazba glukózy na volné aminoskupiny proteinů → nevratná přeskupení → AGEs
    - AGEs se váží na receptory buněčné membrány → podpora ukládání kolagenu v BM cév
    - Tvorba pojivové tkáně částečně stimulována TGF, kolagen může být měněn glykosylací

- Obojí způsobí ztlustění BM + snížená propustnost, zúžení lumina (mikroangiopatie)
- Postižení sítnice oka (retinopatie)
- V ledvinách glomeruloskleróza (Kimmelstielův-Wilsonův syndrom) → proteinurie, pokles GF zánikem glomerulů, hypertenze, insuficience ledvin)
- Hypertenze + ↑ VLDL + zvýšená koagulační pohotovost → makroangiopatie (poškození ledvin, srdeční a mozkový infarkt, uzavření periferních cév)
- Glu + Hba → HbA1c – vyšší afinita ke kyslíku, na periférii jej hůře uvolňuje

## 16. Karbonylový stres a jeho úloha v patogenezi dlouhodobých komplikací diabetu, aterosklerózy a renálního selhání

- ↑ reaktivních karbonylových sloučenin vede k orgánovým poškozením- neenzymaticky reagují s aminoskupinami proteinů (Maillard reakce) za vzniku AGEs
- Glyoxal, glykoaldehyd, hydroxynonenal, methylglyoxal, 2-deoxyglukoson
- Mohou vznikat ze sacharidů, aminokyselin a lipidů
- Mechanismus vzniku – oxidační X neoxidační cesta
- Zvýšená tvorba, nedostatečné odstraňování (defekt aldehyddehydrogenázy) a vyloučení
- Vztah k oxidačnímu stresu, hyperlipidémii, hyperglykémii
- Exkrece karbonylových sloučenin:
  - ledviny
  - pomocí enzymů- aldozoreduktáza, aldehyddehydrogenáza, glyoxyláza – všechny pro svou funkci potřebují redoxní koenzymy (NADH, NADPH, GSH)
- Komplikace při Diabetes mellitus – chronické změny následkem hyperglykémie → zvýšená glykace proteinů → oxid + karbonyl stres, vznik AGEs, ALEs, poruchy lipid. Metabolismu
  - metabolické změny – neenzymové glykace (Maillardova reakce), intracelulární hyperglykémie – ve tkáních, kde není potřeba inzulín (čočka, nervová tkáň, ledviny) → hyperglykémie vede ke ↑ obsahu glu v buňkách → metabolizace na sorbitol a fruktózu → hyperosmolarita bb → osmotické poškození buňky; sorbitol – poškozují iontové pumpy → neuropatie + aneurysmata v sítnici
  - makrovaskulární komplikace – urychlený rozvoj aterosklerózy → ICHS, ICHDK
  - mikrovaskulární komplikace
    - nefropatie – depozita v BM (je ztlustělá), změna náboje, sekrece RF, zhuštění a zmnožení mezangiální matrix, zvýšení vaskulární permeability, modifikace proteinů cévní stěny, glykace a oxidace LDL částic, glykace kolagenu (poškození endotelu)
    - retinopatie – neproliferativní forma (mikroaneurysmata, drobná krvácení, edém, exsudáty)/preproliferativní (avaskulární úseky, plošná krvácení) / proliferativní (tvorba nových cév, fibróza, krvácení do sklivce)
  - ostatní – diabetická noha – neuropatie malých a velkých cév, vznikají otoky, vředy, může dojít k infekci v místě postižení → nekróza tkáně až gangréna - diabetická neuropatie, hypertenze

- Komplikace při chronickém selhání ledvin – karbonylový stres poškozuje ledviny tvorbou AGEs, ALEs (modifikace biologických struktur) nebo dojde k diabetické nefropatii → narušení funkce (vylučování katabolitů, regulace iontové, vodní a acidobazické rovnováhy)
  - amyloidóza spojená s dialýzou -  $\beta_2$  mikroglobulin je oběma stresy modifikován → tvorba cytokinů, vstup makrofágů a monocytů
  - peritoneální dialýza – autooxidace glukózy na dikarboxylové sloučeniny → AGEs → selhání peritoneální dialýzy (předejdeme separací glukózy od elektrolytu)
  - kromě karbonylových sloučenin i radikály a AGEs, ALEs (advanced lipoperoxidation end products)
  - nedostatečná clearance radikálů O a N, snížená antioxidační ochrana
- Komplikace při ateroskleróze – LDL/HDL proniknou do intimy → glykace, stresy → glykovaný LDL, glyko-oxidovaný LDL, oxidovaný LDL → interakce s proteoglykany → crosslinking (zesíťování proteinů) → ztlustění a poškození endotelu, zvýšená prokoagulační aktivita, tvorba zánětu, blokáce NO (↓ vazodilatace)
  - makrofágy pomocí scavenger receptoru akumulují LDL a cholesterol → pěnové buňky (uvolňují lipidy a produkují RF pro hladkou svalovinu, uvolňují O radikály a hydrolázy)
  - modifikované LDL mají chemotaktický účinek na monocyty → do stěny jako makrofágy → ateromový plát – uvnitř může dojít k nekróze pěnových buněk – rozpad plátu a vznik trombu
- Terapie – Aminoguanidin (brání zesíťování), atak hydrazinové skupiny na karbonyl → hydrazony, vitamin E, GSH, lipoová kyselina

## 17. Úloha LDL při vzniku aterosklerózy

- LDL obsahují velký podíl cholesterolu (nepolární jádro), obal – apolipoprotein B100
- Katabolizují se přes receptor na povrchu hepatocytů i buněk extrahepatálních tkání, receptory rozpoznají apoB100 (ten je i na VLDL, IDL) a apo E (VLDL, IDL)
- Přes receptor – kontrola homeostázy cholesterolu + ochrana buněk před akumulací chol.
- Nadbytek intracel. cholesterolu:
  - potlačení syntézy dalších LDL receptorů (↓ transkripce) brání vstupu dalších molekul cholesterolu do buňky
  - potlačení syntézy cholesterolu inhibicí HMG-CoA-reduktázy (enzym, určuje rychlost)
  - inhibice uvolnění transkripčních faktorů (SREBP)
  - esterifikován pomocí acyl-CoA-cholesterolacyltransferázy
- LDL III-IV – malé denzní – méně cholesterolu, silnější aterogenní vlastnosti (nejsou ničeny receptorem pro LDL, pronikají snáze do endotelu, snadněji modifikovány), ↑ je riziko pro infarkt a ischemickou chorobu
- ↑ malých denzních + ↓ HDL + hypertriacylglycerolemie = fenotyp B velikosti LDL
- Zvýšený průnik LDL do endotelu – příčiny:
  - zvýšená koncentrace u některých poruch metabolismu lipidů – familiární hypercholesterolemie



- zvýšená permeabilita endotelu (poškození-turbulentní proudění, hypertenze, hypoxie)
- nedostatečné odstraňování cholesterolu ze subendotel. prostoru kvůli nízkému HDL
- modifikované LDL – hlavně oxidativní – peroxidace polynenasycených MK fosfolipidů → fragmenty MK se váží na aminoskupinu lysinu a na další oblasti apoB100 → addukty lipidových produktů a apoB100, částice získá aterogenní vlastnosti
  - mírně oxidované – lipoperoxidy, apoB100 nezměněn, navozují syntézu MCP-1 (přitáhne monocyty do stěny arterie), adhezních molekul pro monocyty, CSF (díf monocytů v makrofágy) → vstup monocytů do subendotelového prostoru
  - silně oxidované – pozměněny obě složky /i apoB100/ - modulace syntézy proaterogenních cytokinů a RF makrofágy+ bb hladkého svalstva, cytotoxicky poškozují endotel, inhibují NO-syntázu (narušení dilatace), navozují oba typy imunity
- Scavengerové receptory- „zametací, uklízečí“, třída A a B, na povrchu makrofágů, bb hladkého svalstva a endotelu, aktivitu nereguluje intracelulární cholesterol! →CH se nekontrolovatelně hromadí → pěnové buňky,....
- Tyto receptory mohou být i v hepatocytech, kde jsou pro HDL a účastní se reverzního transportu cholesterolu

## 18. Úloha HDL při vzniku aterosklerózy

- heterogenní skupina lipoproteinů
- pre-β-HDL tvořena jen apoA1, fosfolipidy + malé množství volného cholesterolu → postupné přijímání cholesterolu → α-HDL → diferencovány na HDL 2, HDL 3
- nositelé antiaterogenních účinků:
  - zpětný transport cholesterolu z arteriální stěny do jater
  - antioxidační účinky
  - protizánětlivé účinky – zlepšení endotelové funkce
  - antiagregační působení na trombocyty
- zpětný transport cholesterolu – z extrahepatálních tkání do jater – přestup neesterifikovaného cholesterolu z buňky (přenašeč ABCA 1) a zachycení pre-β-HDL → esterifikace LCAT → přemístěn do středu HDL
- transport do jater pomocí scavengerových receptorů (přímý způsob) **X** nepřímý- cholesterol vyměněn za TAG ve VLDL, LDL (zařizují CETP proteiny)
- antioxidační účinky – enzymy transportované jako součást HDL
  - Paraaxonáza – chrání LDL před lipoperoxidací (snižuje lipoperoxidy tak, že hydrolyzuje oxidované polynenasycené MK ve fosfolipidu v oxidovaných HDL)
  - acetylhydroláza faktoru aktivujícího destičky – totéž, ale působí na MK s kratším řetězcem ( $\leq 9$ )
- protizánětlivé účinky – snížení exprese adhezivních molekul na endotelu a inhibice adheze monocytů k endotelu

## 19. Biochemické děje v počátečních fázích aterosklerózy.

+

## 20. Úloha monocyту/makrofágu, endotelu, buněk hladkého svalstva a T lymfocytů při vzniku aterosklerózy.

### Ateroskleróza:

- chronické progresivní onemocnění cévní stěny, při kterém dochází k místní akumulaci lipidů, krevních komponent a fibrózní tkáně v intimě arterií
- provázené změnami v medii
- vyvíjí se jako chronický zánět s nadměrnou proliferativní odpovědí intimy a medie na podněty, zvláště modifikované LDL

### Vývoj aterosklerotické léze:

#### **Časná fáze – hromadění lipidů**

- 1) Izolované pěnové buňky odvozené z makrofágů
- 2) Tukové proužky – hromadění pěnových buněk (obsahují intracelulární akumulované lipidy)
- 3) Intermediární léze – malá množství extracelulárně uložených lipidů (pocházejí z odumřelých pěnových buněk)
- 4) Aterom – vznik lipidového jádra (tvořené extracelulárně akumulovanými lipidy)

#### **Pozdní fáze – proliferace intimy a nasedající trombóza**

- 1) Fibroaterom – proliferace buněk hladkého svalstva v intimě a ↑ syntéza ECM, obsahující kolagenní a elastická vlákna → tvorba vazivové vrstvy nad lipidovým jádrem
- 2) Komplikovaná léze – kalcifikace, ruptura nebo exulcerace, krvácení do ateromu, vznik trombu

Faktory uplatňující se v ateroskleróze	Rizikové faktory aterosklerózy
<b>Lipoproteiny</b>	<b>Zvýšený celkový cholesterol</b>
<b>Monocyty / makrofágy</b>	<b>↑LDL, TAG a ↓ HDL</b>
<b>Endotelové buňky</b>	<b>Hyperglykemie</b>
<b>Buňky hladkého svalstva</b>	<b>Hyperinzulinemie</b>
<b>T- buňky</b>	<b>↑ hladina homocysteinu</b>
<b>trombocyty</b>	<b>↑ hladina fibrinogenu</b>

### Úloha cholesterolu

- je vždy součástí aterosklerotického ložiska, zvýšená koncentrace v séru hlavním rizikovým faktorem ICHS
- za atherogenitu zodpovědné zmnožení tzv. *aterogenních lipoproteinů* obsahujících apo B100
- celkový cholesterol:
  - a) *proaterogenní lipoproteiny* – transport cholesterolu k periferním tkáním (**LDL, VLDL, IDL, Lp(a)**)
  - b) *antiaterogenní lipoproteiny* – transport cholesterolu do jiných lipoproteinů a do jater – HDL

### Časné fáze aterosklerózy

- 1) vývoj je zahajován **aktivací a dysfunkcí endotelových buněk**

- příčiny dysfunkce:
  - a) hyperlipoproteinemie, hyperhomocysteinemie
  - b) hypertenze, hypoxie
  - c) kouření
  - d) infekce (Chlamydie, cytomegalovirus, EB virus)
  - e) inzulinová rezistence
- důsledky endotelové dysfunkce:
  - a) zvýšená permeabilita pro LDL
  - b) zvýšená adheze leukocytů
  - c) vazokonstrikce
  - d) prokoagulační stav

## 2) přestup LDL do subendotelového prostoru (mezi endotelovými buňkami nebo transcytosou)

- v EC matrix intimy jsou LDL zachyceny negativně nabitými proteoglykany přes pozitivně nabitě domény apo B100 → vystavené působení aktivních látek (možná **modifikace**)

## 3) modifikace LDL (pozměněním struktury se stávají aterogenními)

- modifikace – oxidativní modifikace, glykace, agregace částic a další
- oxidativní modifikace – oxidace vyvolané enzymy (zdroj – makrofágy, buňky hladkého svalstva, endotel), enzymy:
  - a) lipoxygenázy – přeměna polynenasycených MK (volných i vázaných esterově) na lipoperoxidy
  - b) NADPH oxidáza – produkce superoxidu, které se může měnit na peroxid vodíku
  - c) Myeloperoxidáza – z  $H_2O_2$  a chloridů → produkce kys. chlorné a tyrosylových radikálů
  - d) Indukovatelná NO-syntasa – produkce NO – prekurzor peroxinitritu ( $ONOO^-$ )
  - e) Oxidace vyvolané ionty přechodných kovů (železo, měď)

## 4) Modifikované LDL indukují lokální zánětlivou reakci

- Podpora vstupu monocytů do intimy – stimulace syntézy aktivních látek v endotelu (adhezni molekuly- VCAM-1, ICAM-1; MCP-1 – monocyte chemotactic protein; CSF)
- Výsledek- adheze monocytů k endotelu → chemotaxe do subendotelového prostoru → přeměna v makrofágy
- Tyto LDL zvyšují expresi scavengerových receptorů na povrchu makrofágů → tyto receptory stimulují vychytávání LDL makrofágy → přeměna makrofágů v pěnové buňky (výskyt charakteristický pro tukové proužky)

### Scavengerové receptory – „úklidové, zametací“

- Rodina receptorů, rozpoznává celou řadu ligand (modif. vlastní či patogenní nevlátní)
- Váží a internalizují modifikované LDL
- Jejich aktivita není regulována intracelulární hladinou cholesterolu → cholesterol se nekontrolovaně hromadí v buňce → vznik pěnových buněk
- Třída A (SR AI/II) – rychlé vychytávání modif LDL, na povrchu makrofágů, buněk hladkého svalstva, Kupfferovy buňky

- Třída B (SR BI/CLA-1) – pro modifikované LDL, AGEs, nativní formy HDL (přenos esterů cholesterolu do jater a tkání → steroidogeneze)

Pozdní fáze:

1) **Vznik fibroateromu**

- Depozita fibrózní tkáň
- Makrofágy - sekrece různých biologicky aktivních látek:
  - Reaktivní formy N a O- prohloubení oxidace LDL
  - Chemokiny - stimulace migrace monocytů, buněk hladkého svalstva (z médiu) a T-lymfocytů do intimy
  - Mitogeny – př. PDGF proliferace buněk hladkého svalstva
  - Zánětlivé cytokiny – např. IL-6, TNF- $\alpha$
  - Metaloproteinázy – destabilizují aterosklerotický plát
- Buňky hladkého svalstva – migrace do subendotelového prostoru, proliferace, produkce proteinů extracelulární matrix
- T lymfocyty – sekrece cytokinů a růstových faktorů

2) **Ruptura aterosklerotického plátu** – a následná trombóza → nejzávažnější komplikace

- Klinický projev- akutní koronární syndrom

<b>Nestabilní plát</b>		<b>Stabilní plát</b>
Velké s vysokým obsahem lipidů extra i intracel. uložených	<b>JÁDRO</b>	S malým obsahem lipidů a pěnových buněk
Tenký fibrózní, chudý na buňky hladkého svalstva	<b>FIBRÓZNÍ KRYT</b>	Silná fibrózní čepička
↑množství makrofágů a T lym	<b>ZÁNĚT</b>	Nejsou známky zánětu, málo makrofágů
V místě odstupu plátu podminovaný	<b>POVRCH</b>	Hladký povrch
vysoká	<b>TROMBOGENITA</b>	minimální

- Faktory přispívající k ruptuře - Ztenčení fibrózního krytu:
  - Snížené množství kolagenu (snížená syntéza, zvýšená degradace)
  - Pokles počtu buněk hladkého svalstva
  - Zvýšený počet makrofágů
- Ruptura - účast zánětu při ruptuře aterosklerotického plátu:
  - T- lymfocyty – syntéza INF- $\gamma$  → inhibice syntézy kolagenu buňkami hl. svalstva → indukce apoptózy buněk hladkého svalstva
  - Expresí CD40Ligandu – aktivace makrofágů – stimulace syntézy proteolytických enzymů a dalších prozánětlivých mediátorů
  - Makrofágy – produkce proteolytických enzymů – „matrix“ metaloproteináz (kolagenáz, želatináz) → štěpení kolagenu

Úloha buněk hladkého svalstva – souhrn:

- Kumulace v intimě (společně s monocyty) zejména ve stadiu fibrózních plátů
- Vycestovávají z medie na podkladě cytokinů a růstových faktorů (IL-a, TNF-alfa, PDGF)
- Změna kontraktálního fenotypu buňky na syntetický fenotyp (zmnožení DER, GK- ↑ syntéza kolagenu I, II + ECM)
- Vytvářejí nad lipidovým jádrem fibrózní kryt
- ↑ množství kolagenu → změna mechanických vlastností cévní stěny
- Některé se mohou přeměnit na pěnové buňky (spolu s makrofágy)

## 21. Pravidla sbalování bílkovin k dosažení nativní konformace.

- Konformační změna – změna sekundární, terciární nebo kvartérní struktury proteinu, aniž by se změnila struktura primární
- Sbalování proteinu – sled konformačních změn → polypeptidový řetězec zaujme biologicky aktivní strukturu; během translace i in vitro při denaturaci
- Jedná se o komplexní děj
- Jednořetězcové bílkoviny – samovolné svinutí do nativní struktury (dané primární strukturou)
- Větší komplexní bílkoviny – pro svinutí často nutná bílkovina CHAPERON
- **Chaperony** – proteiny, podílejí se na sbalování dalších bílkovin
  - ATP-ázy, nespecifické ke svým ligandům, chrání proteiny před patologickými konformacemi
  - Jsou syntetizovány při buněčném stresu (změny teploty, chlad, vliv detergentů, změna pH, iontové síly, účinek toxických látek )
  - Jejich syntézou se buňka brání denuračním účinkům stresových faktorů
  - **Molekulární:** Rozpoznávají patologický protein, váží se na hydrofobní povrch a inhibují agregaci. Patří sem hlavně tzv. **heat shock proteiny** (vznikající při tepelném poškození) – chrání před denurací.
  - **Chemické:** Upravují podmínky uvnitř buněk, stabilizují proteiny proti tepelné a chemické denuraci (glycerol).
  - **Farmakologické:** Váží se na specifickou konformaci, stabilizují ji. Prevence před proteosomální degradací.
  - **Uplatnění** - pomáhají proteinům se správně sbalit, umožňují bílkovině rozbalení, zabraňují předčasnému sbalení, brání intermolekulárním interakcím nesbalených proteinů a tím jejich precipitaci

### Problematika sbalování proteinu:

- **protein vystřídá několik konformací**, než se stane funkčním.
- **Princip samosbalování** by trval příliš dlouho (produkty by zřejmě ihned reagovaly s dalšími látkami v cytoplasmě a vznikla by tak nerozpletná směska)
- **Afinsenův postulát** – nativní prostorové uspořádání dáno pořadím AMK v řetězci, nejvýznamnější jsou hydrofobní interakce AMK v proteinovém jádře, rychlost sbalování odpovídá vzdálenosti interagujících AMK, pokud interagují sousední → rychlost je vyšší
- **Levinthalův paradox** – sbalování řízeno termodynamicky (sbalování do energeticky nejvhodnější konformace), neprobíhá náhodně, jsou zde meziprodukty – začátek sbalování

v nukleárních centrech (části polypeptidového řetězce s uspořádanější strukturou) → tyto centra se sbalí jako první → tím určeno další sbalování a sníží se počet konformací (pokud by neexistovaly centra, konformací je velký počet a sbalování by trvalo dlouhou dobu)

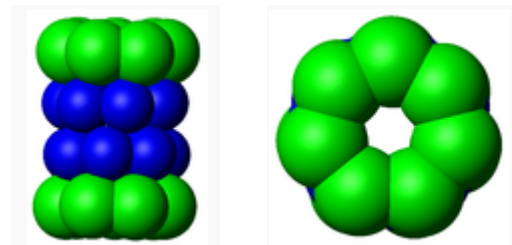
## 22. Úloha chaperonu, proteazomu a lysosomu. Stres endoplazmatického retikula buňky.

### Chaperony

- proteiny podílející se na sbalování dalších bílkovin
- pomáhají bílkovinám správně se sbalit (folding) = nalézt prostorové uspořádání odpovídající nativní konformaci; někdy mohou umožňovat i rozbalení
- zabraňují bílkovinám svinout se předčasně
- zabraňují intramolekulárním interakcím ještě nesbalených bílkovin a tím i jejich precipitaci
- ATP-ázy – podobají se enzymům – nejsou specifické ke svým ligandům
- = stress proteins = heat shock proteins (HSP)
- syntetizují se při celulárním stresu – změny teploty, chladu, vlivem detergentů, změnou pH, iontové síly, účinkem toxických látek (možná i některých potravin)
- jejich syntézou se buňka chrání denaturačním účinkům stresových faktorů
- glukose regulated proteins – chaperony v ER = cold shock proteins
- ubiquitin a hsp8 reguluje degradaci cytoplazmatických proteinů
  - po aktivaci ATP → naváže se na lysinový zbytek proteinu → ubiquitovaný protein se přesune do vhodného proteasomu → degradace
  - degraduje asi 30% nově vytvořených polypeptidů a proteinů – hodně chybným intermediátů vznikajících při prvním foldingu → nutné odstranění
- hsp32 – enzym hemoxygenáza – oxiduje hemovou část Hb na bilirubin
  - reguluje správnou koncentraci NADPH, rozhoduje o antioxidační ochraně buněk
- hsp28 – crystallin – reguluje apoptózu a reorganizaci filament
- hsp70 – nejdůležitější velkých chaperonový komplex – největší v eukaryotních buňkách
  - v cytoplazmě, ER, mitochondriích
  - pomáhá opravovat špatně uspořádané nascentní nebo již hotové řetězce

### Proteasomy

- bílkovinné komplexy s proteázovou aktivitou
- u eukaryot i prokaryot – v jádře, cytosolu
- 2 podjednotky – katalytická a regulační
- k degradaci IC proteinů – informačních, signálních
- rozpoznají polyubiquitované proteiny → vtahují je do svého nitra → odštěpení polyubiquitinů → rozštěpení proteinu na krátké oligopeptidy → spolu s ubiquitiny vypuštěny do cytosolu
- některé proteiny degradovány bez označení ubiquitinem – jiný specifický signál nebo protein
- inhibice činnosti – ubistatiny – váží se na polyubiquitiny daných proteinů
- odklízejí staré proteiny
- imunitní význam – účastní se procesu rozpoznávání antigenních struktur (rozklad Ag pro následující prezentaci)



- regulace buněčného cyklu
- význam v apoptóze
- mají i své endogenní inhibitory – možné využití v terapii nádorů
- inhibice → umožní apoptózu buněk potlačením aktivity nukleárního faktoru NF-κB a zvýšením aktivity „strážného“ proteinu p53
- dobré je podporovat jejich činnost u neurologických onemocnění spojených s hromaděním proteinových komplexů (Alzheimerova, Parkinsonova, Huntingtonova choroba)

### Lysosomy

- sférické membránové organely
- obsahují před 50 typů enzymů – kyselé hydrolázy – rozklad IC i EC materiálů – sacharidy, proteiny, lipidy, nukleové kyseliny
- vnitřní pH 5,0-6,0 – udržováno protonovou pumpou v jeho membráně
- vznik – oddělením od hladkého ER či Golgiho aparátu
- primární – váčky s enzymy, bez materiálu
- sekundární – větší – vznik splynutím primárního lysosomu s fagozomem
- terciární – obsahují zbytky nerozložitelného materiálu (např. lipofuscin)
- autofagie – k recyklaci vlastních opotřebovaných struktur
- onemocnění na podkladě defektu lysosomů
  - vrozená – genetické poruchy jejich enzymů či regulačních proteinů
    - postupné hromadění materiálu – zejména v CNS
    - asi 40 chorob, většinou neléčitelné
    - Fabryho, Niemann-Pickova, Tay-Sachsova, Gaucherova, Pompeho choroba
  - získaná – většinou jen relativní poruchy – z nadbytku přijímaného materiálu
    - časté u makrofágů (foamy cells při ateroskleróze)
    - mohou být postiženy i hepatocyty, epitel buněk proximálních tubulů ledvin
    - dna – membrány lysosomů rozrušovány krystalky kyseliny močové → uvolnění enzymů → kloubní zánětlivá reakce

### Stres endoplazmatického retikula

- soubor různých vlivů – vyvádějí ER z homeostázy → hromadění nesbalených proteinů
- odezva: spuštění signálních drah = unfolded protein response → zpomalení translace mRNA, degradace malfoldovaných proteinů, zvýšení exprese chaperonových genů, udržení oxidativního prostředí v ER
- v případě selhání regulačních mechanismů spuštěna apoptóza
- běžná funkce ER – dotvoření polypeptidu – N-glykosylace a oxidativní prostředí zaručují vznik disulfidových můstků
  - malfolding → ohrožuje ER nabalováním dalších malfoldovaných proteinů
    - tomu brání navázání chaperonů (Grp78) → protein určen k degradaci
- stresové signalizační dráhy
  - MERK kináza (eIF2 kináza)
  - kinázová rodina zahrnující Ire1 – spouští dvě formy odpovědi

- exprese chaperonových genů (mimo jiné Gpr78) – zaručí zůstávání proteinů v unfoldedovaném stavu a tím nebude docházet k malfoldingu; k expresi dochází pomocí transkripčního faktoru XBP1
- vazba a udržení  $\text{Ca}^{2+}$  v ER
- transkripční faktor ATF6 – ovlivňuje expresi mRNA pro XBP1

### 23. Mechanismus prionových onemocnění.

- proteinová a infekční analoga virionu, normální složka mnoha tkání člověka včetně mozku
- původci neurodegenerativních onemocnění lidí a zvířat
- kódovány 1 genem PRNP, posttranslační modifikace → vznik řady izoform
- vytvářeny jako sekretorické proteiny, vezikulárním transportem směřují do buněčné membrány
- v neuronech putují axonálním transportem a koncentrují se na synapsích
- normální prion  $\text{PrP}^{\text{C}}$  (celulární) –  $\alpha$ -helikální struktura, uplatnění při uchování dlouhodobé paměti, obnovování hemopoetických buněk kostní dřeně
- posttranslační modifikace je může změnit v patogenní a infekční (ALE bez změny primární struktury)
- cesta přeměny – mutace, spontánní konverze, infekce patologickým prionem
- molekuly patogenních prionů dále mění i priony celulární v patogenní (částečná konfigurace  $\beta$ -listu), shlukování těchto forem  $\text{PrP}^{\text{SC}}$  může vytvářet amyloidní plaky → degenerace neuronů
- $\text{PrP}^{\text{SC}}$  odolná vůči chemickým a fyzikálním vlivům a účinku proteáz
- Prionová teorie – Stanley Prusiner – 1997 Nobelova cena
- Přítomnost patogenních proteinů vyvolá spongiformní encefalopatie

#### Scrapie

- u postižené ovce se nejprve objeví útlum, střídá ho období přehnané aktivity, později silné svědění
- dále postižení CNS – narušení koordinace pohybů (zvířata našlapují zvysoka-„klus“)
- finální stadia – ochrnutí a smrt ovce
- prion ovce nemůže nakazit člověka X prion skotu ANO – může sloužit jako matrice pro vznik Creutzfeldt-Jakobovy choroby

#### Bovinní spongiformní encefalopatie (BSE – „nemoc šílených krav“)

- u skotu poprvé v 1986, o 10 let později nová varianta Creutzfeldt-Jakobovy choroby
- makroskopický nález na mozku - tvorba pórů → pozdější stadia spongiformní struktura
- inkubační doba několik let

#### Creutzfeldt-Jakobova choroba

- vzácné onemocnění ze skupiny transmisivních spongiformních encefalopatií
- příčina – vznik patologického proteinu (prion) - infiltruje lidský mozek a chová se zde jako virus → zaplní mozkové buňky → dochází k ruptuře buněk a odumření
- projevy – rychlý rozpad osobnosti a demence



- připodobnění k rychle se vyvíjející těžké Alzheimerové chorobě (bez pohybových problémů)
- Po objevení prvních příznaků člověk umírá do několika měsíců
- **Sporadická CJD** – má incidenci 1–2 / 1 000 000. V ČR každoročně umírá více než 10 pacientů na tuto formu CJD. Obtíže nastupují okolo 65. roku věku. Onemocnění probíhá jako prudce progredující demence (v rozmezí 2–3 měsíců), objevuje se ataxie, myoklonus. Nemocný umírá do 5–12 měsíců od prvních příznaků.
- **Iatrogenní CJD** – u pacientů léčených lidským STH z kadaverózních hypofýz (dnes rekombinantně), přenosem tvrdé pleny, perikardu či rohovky. Riziko existuje i u neurochirurgických výkonů přenosem prostřednictvím instrumentária. Přenos prionů je zřejmě možný i transfuzí.
- **Familiární CJD** – je genetickou formou s mutací v genu PRNP a neuropsychiatrickou symptomatologií.
- **Nová varianta CJD** – je charakterizována psychiatrickými příznaky (úzkostí, depresi, změnami chování), progresivním mozečkovým syndromem, myoklonem, choreou a dalšími neurologickými příznaky. Na rozdíl od sporadické formy je průběh pomalejší a postihuje mladší věkové skupiny. Přenos je pravděpodobně alimentární z masa zvířat s BSE. Inkubační doba je více než 10 let, na celém světě na ni zemřelo asi 200 lidí.

### Kuru

- U domorodých kmenů na Nové Guineji – rituální kanibalismus
- Několikaletá inkubace → třes, ataxie, imobilita a následná smrt
- Po potlačení kanibalismu nemoc zmizela
- Alperova nemoc, Gerstmannův-Sträusslerův-Scheinkerův syndrom, Fatální familiární insomnie, Sporadická fatální insomnie
- Zvířecí – Scrapie, BSE, Chronické chřadnutí jelenovitých, Felinní spongiformní encefalopatie, Transmisivní encefalopatie norků

## 24. Příčiny patologické konformace bílkovin a klinické důsledky.

- Společný znak onemocnění – tvorba struktur  $\beta$ -skládaného listu, stabilizovaná oligomerizací a agregací proteinu
- Důsledek procesu:
  - 1) Vznik toxické bílkoviny: Neurodegenerativní onemocnění – chronické, progresivní onemocnění; ztráta neuronů; kumulace patologických proteinů a vznik agregátů (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba)
  - 2) Ztráta funkce: Cystická fibrosa - mutace genu pro chloridový kanál
  - 3) Ukládání: Amyloidosy – fibrily nejsou toxické, ale nerozpustné. Ukládání způsobuje poškození tkání

### Onemocnění způsobená patologickou konformací:

- **Amyloidóza** – viz. patologie

- **Alzheimerova choroba - progresivní degenerativní onemocnění mozku**, dochází k extracelulárnímu ukládání deposit  $\beta$ -amyloidu, nemoc má genetický podklad, dochází ke stárání špatně zabalených proteinů
  - **Prekurzor** - -amyloidní prekurzorový protein ( $\beta$ -APP), transmembránový protein, jeho fragment na N-konci ( $\beta$ -peptid) vytváří proteinové agregáty
  - V mozku pacienta dva různé proteinové agregáty:
    - 1) chybně složený cytoskeletární **protein tau**;
    - 2) plaky tvořené fragmenty membránového proteinu  $\beta$ -APP ( $\beta$ -amyloid, viz dále)
  - Amyloidní  $\beta$ -peptid snadno polymerizuje  $\rightarrow$  nerozpustné fibrilární struktury (**neuritické plaky**) – sporadický výskyt i u zdravých jedinců **X** u pacientů s Alzheimerovou chorobou ve velkém množství.
  - postižen hlavně hippocampus (nejvyšší výskyt plaků)- paměťové problémy, dezorientace, neschopnost se o sebe postarat
  - Reaktivní mikrogliaální buňky infiltrují plaky+ obklopení astrogliaálními buňkami  $\rightarrow$  uvolnění volných  $O_2$  radikálů a cytokinů = aseptický zánět  $\rightarrow$  odumření okolních neuronů
  - Terapie – inhibice a opravení konformačních změn, vývoj nových peptidů ( $\beta$ -sheet breakers), experimentální studie chaperonů
- **Parkinsonova choroba** – autozomálně recesivní / izolovaná juvenilní choroba způsobená mutací genu parkin, k potvrzení nutné genetické vyšetření
  - Podklad – úbytek dopaminergních neuronů v mozku (substantia nigra), buňky chřadnou + v centru se tvoří LEWYHO tělíska
  - Postižení i buněk cholinergních, serotoninergních a adrenergních
  - Postihuje i nervové buňky v mazových žlázách kůže (mastná kůže Parkinsoniků, rozvoj seborrhoické dermatitidy)
  - Výskyt zácpy, dysurie, impotence
  - Důsledek- zvýšená aktivita v globus pallidum (nadměrná stimulace thalamu), možná léčba- pallidotomie
  - Výskyt klidového třesu, jednostranný začátek příznaků, posturální instabilita

## 25. Metabolické změny v buňce při anoxii a ischemii.

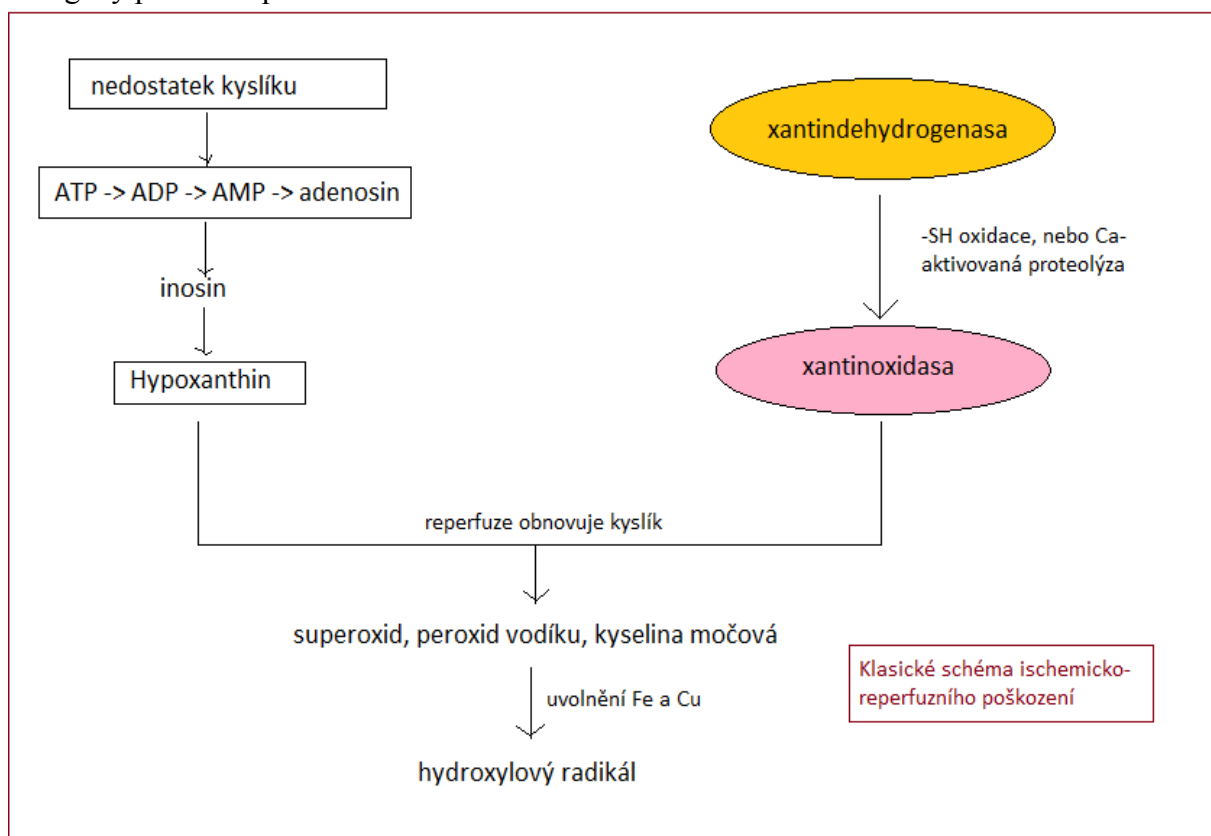
- hypoxie (anoxie) – nedostatek kyslíku
- ischemie – nedostatek kyslíku – průtok krve tkání omezen až zastaven
  - $\rightarrow$  porucha dodávky živin, porucha odstraňování zplodin metabolismu
- zvýšená degradace glykogenu a glukózy  $\rightarrow$  hromadí se laktát, klesá pH
- úbytek ATP  $\rightarrow$  nedostatek energie pro buňku
  - adenylátkináza:  $ADP + ADP \rightarrow ATP + AMP$
  - AMP odbouráván na  $P_i$  a hypoxantin
- rozvrácení iontových gradientů
  - $\uparrow H^+$  (laktát),  $\uparrow Na^+$  (směna Na/H na buněčné membráně),  $\uparrow Ca^{2+}$  (selhání ATP-dependentního čerpání do ECT a ER, porucha směny Na/Ca na buněčné membráně)

- degradace purinů – adenosin (vasodilatační účinek) → hypoxantin (hromadí se při ischemii)
  - xantinoxidáza/dehydrogenáza
    - D-forma (dehydrogenasa) – NAD-dependentní, fyziologicky převládá
    - O-forma (oxidasa) – O<sub>2</sub>-dependentní, generuje ROS
- zdravá buňka udržuje strmý Ca<sup>2+</sup> gradient na buněčné/ER membráně
  - ECT: 2,5 mmol; ICT: 0,0001-0,001 mmol
- kalcium v buňce – druhý posel důležitý ve všech životních projevech buňky
  - při koncentraci cca 1 μmol již vzniká signál
  - zdroj signálu
    - zvnějšku: napětím, nebo ligandem aktivované Ca<sup>2+</sup> kanály
    - ze zásob v ER: PI3 receptor/kanál, ryanodinový receptor/kanál – závislý na membránovém potenciálu (kosterní sval), nebo na Ca<sup>2+</sup> (srdce, CNS)
    - o typu informace signálu rozhoduje jeho lokalizace, frekvence a amplituda
- kalmodulin – protein vázající vápník – aktivuje kalcium-dependentní proteinkinasy
- účinky zvýšení intracelulárního kalcia
  - aktivace mnoha enzymů
    - Ca/kalmodulin-dependentní proteinkinasy
    - některé fosfatasy (calcineurin)
    - endoteliální a neuronální NOS
    - kalpainy (Ca-aktivované non-lysosomální proteasy)
    - fosfolipázy (způsobují poškození membrán, syntéza prostanoidů)
    - endonukleázy (způsobují fragmentaci DNA při apoptóze)
  - svalové kontrakce
  - uvolnění hormonů a neurotransmitterů
  - regulace genové exprese
  - skladba cytoskeletu (vysoké Ca → „membrane blebbing“)
  - mitochondrie – regulace respirace, indukce „mitochondrial permeability transition“
- import Ca<sup>2+</sup> do mitochondrie – Ca<sup>2+</sup> uniporter (facilitovaná difuze po spádu elektrochem. gr.)
  - metabolická regulace – mitochondriální dehydrogenasy stimulovány Ca<sup>2+</sup> (pyruvátdehydrogenasa, isocitrátdehydrogenasa, 2-oxoglutarátdehydrogenasa) – srdeční mitochondrie takto reaguje na změny spotřeby ATP (ne na depleci)
  - sekvestrace/pufrování cytoplazmatického Ca za určitých okolností
- mitochondrial permeability transition pore (MPT) – megakanál ve vnitřní mtch membráně
  - propustnost pro všechny molekuly menší než 1500 Da
  - → kolaps potenciálu vnitřní membrány, vyrovnání protonového gradientu, rozpáření nebo inhibice respirace
  - → zbobtnání mitochondrie
  - spouštění Ca<sup>2+</sup> v matrix
  - stimulace: oxidanty, depolarizace, anorganický fosfát
  - inhibice: protony (nízké pH matrix), Mg ionty, ATP, ADP, cyklosporin A
  - funkce:
    - fyziologické (reverzibilní) otevření – energeticky výhodný eflux Ca<sup>2+</sup> z mtch, kalciová signalizace

- patologické (ireversibilní) – buněčná smrt, označení starých mtch při autofagii

## 26. Reoxidační poškození tkáně.

- další poškození ischemické tkáně nastávající po obnovení průtoku krve
- významné hlavně po krátké ischemii
- při úplném zničení tkáně reperfuze lokální stav už nezhorší → může vyplavit toxiny z mrtvé tkáně do cirkulace
- záplava ROS, NO a eikosanoidů
- střevo – trombóza, torze, uskřínuté kýly
- infarkt myokardu: trombolytická léčba, angioplastika
- perinatální asfyxie
- hemoragický šok po doplnění krevního objemu
- otrava CO léčená kyslíkem
- spánková apnoe
- orgány před transplantací

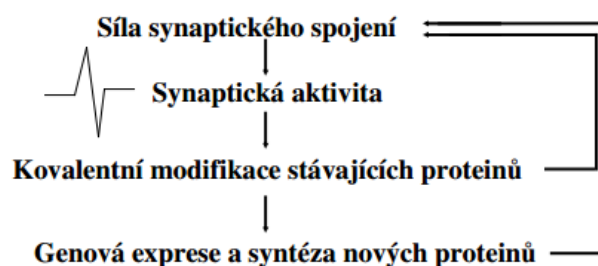


- lidské srdce ovšem neobsahuje žádnou xantinoxidázu (nachází se jen v játrech, střevě a laktující mléčné žláze, v malém množství na povrchu cévního endotelu)
- tvorba ROS během reperfuze má jiné zdroje (mitochondrie, leukocyty)
- MPT – zřejmě hlavní mechanismus reoxidačního poškození myokardu
  - ischemie – nízké pH chrání před MPT

- při reperfuzi nastávají v myokardu podmínky pro MPT kombinací faktorů: nadprodukce oxidantů, deplece adeninových nukleotidů, vysoká koncentrace  $P_i$ , vysoká koncentrace  $Ca^{2+}$ , normalizace pH
- poly(ADP-ribose)polymeráza (PARP-1)
  - enzym vázaný na chromatin – aktivovaný oxidačním poškozením DNA
  - štěpí  $NAD^+$  a přenáší poly(ADP-ribose) na jaderné proteiny
  - pomáhá při opravách DNA, podporuje přežití buňky
  - při přílišném poškození DNA → způsobí depleci  $NAD^+$  → urychlení buněčné smrti
- možná prevence ischemicko-reperfuzního poškození
  - řízená hypotermie
  - MPT inhibitory – cyklosporin A (váže cyklofilin D – součást MPT póru)
  - antioxidanty
  - PARP-1 inhibitory

## 27. Excitotoxicita v patogenezi poruch CNS.

- další významný mechanismus smrti nervových buněk
- většina excitačních synapsí v CNS používá glutamát
- glutamátové receptory
  - ionotropní – ligandem řízené iontové kanály
    - non-NMDA (AMPA, kainát) – rychlá synaptická transmise, propouští  $Na^+$
    - NMDA (N-methyl-D-aspartát) – dlouhodobé změny v síle synaptického přenosu, propouští  $Na^+$ ,  $Ca^+$
  - metabotropní – spřažené s G proteiny
  - indukce LTP (long-term potentiation)
    - nízká frekvence impulzů – aktivní pouze AMPA receptory
    - vysoká frekvence – aktivní AMPA i NMDA receptory
- excitační aktivita glutamátu hraje hlavní roli v učení, paměti a vývoji mozku
- připojení glutamátu k receptorům → influx kalcia → depolarizace
  - → vždy zvýšení hladiny IC kalcia
- smrt neuronů/kolaps normálních iontových gradientů → může způsobit masivní uvolnění glutamátu → váže se na přilehlé neurony → zvýšená koncentrace EC glutamátu → prodloužená depolarizace neuronů → prodloužený influx  $Ca^{2+}$
- postižené neurony opuchají a umírají nejčastěji nektrózou
- synaptická plasticita



- excitotoxicita při mozkové ischemii-reperfuzi
  - deplece ATP → kolaps iontových gradientů → ↑ Ca<sup>2+</sup> → nadměrné uvolňování glutamátu
  - do postsynaptických neuronů proudí Na<sup>+</sup> a Ca<sup>2+</sup>
  - ↑ Na<sup>+</sup> → osmotické bobtnání, nekróza
  - ↑ Ca<sup>2+</sup> → ↑ mitochondriální ROS, ↑ NO, ↑Ca<sup>2+</sup>-stimulované proteasy a fosfolipázy, ↑ eikosanoidy → pokračuje poškození → buněčná smrt (apoptóza nebo nekróza)
- glutamátové transportéry využívají iontových gradientů na membráně (→ při depolarizaci membrány se může transport glutamátu obrátit)

## 28. Obecné mechanismy smrti nervových buněk při neurodegenerativních chorobách.

- postupně zanikají některé populace nerv. bb. → vážné psychické a neurologické příznaky
- psychické – ztráta paměti a rozumových schopností, poruchy chování, halucinace, bludy, celkový úpadek osobnosti
- neurologické – týkají se koordinace a řízení pohybu a řeči
- většina neurodegenerativních nemocí je dědičná – dědičnost ale nehraje vždy stejnou roli
- úbytek neuronů bývá poměrně pomalý (ale záleží na konkrétním onemocnění)
- odchylky v biochemickém intraneuronálním prostředí
- jedna z hypotéz je, že se jedná v podstatě o urychlené stárnutí – ale to by samo nestačilo
- mechanismy smrti jsou komplexní
- 1. porucha funkce mitochondrií
  - Alzheimer – popsány mitochondriální poruchy: ↓aktivita cytochromoxidasy, pyruvátdehydrogenasy a α-ketoglutarátdehydrogenasy
  - Parkinson – SN neurony zvláště citlivé k působení Komplex I toxinů
- 2. oxidativní procesy – mohou vést k rychlé smrti neuronů
  - oxidativní stres – způsoben zvýšenou produkcí RONS, nebo selháním antioxidační ochrany
  - radikály peroxidují lipidy plazmatické membrány → zvyšují její permeabilitu → zhoršení neuronálních funkcí
  - při porušení rovnováhy mezi tvorbou RONS a antioxidační ochranou, může buňka zemřít
  - Alzheimer – oxidační stres již na počátku onemocnění
    - ROS – amyloid β – katalýza přechodnými kovy, indukce ROS-generujících enzymů, účinech na mitochondrie
  - Parkinson – metabolismus dopaminu a katabolismus monoaminoxidasami generuje radikály
- 3. poruchy ubiquitin-proteasomu
  - Alzheimer – nízká aktivita proteasomu (mutantní ubiquitin, některé oxidované/abnormální proteiny mohou proteasom „ucpávat“)
  - Parkinson – některé vrozené formy (mutace genu pro parkin, mutace v UCHL1)
- 4. abnormální agregované proteiny
  - Alzheimer – Amyloid β – aberantní produkt štěpení APP

- neurotoxické jsou především rané (ještě rozpustné) A $\beta$  agregáty
  - zralé plaky nejsou neurotoxické, ale produkují zánětlivou odpověď mikroglie
- Parkinson – hromadění  $\alpha$ -synukleinu přispívá ke smrti neuronů
- 5. změny metabolismu železa
  - Alzheimer – stopy Cu, Fe nezbytné jako katalyzátory agregace A $\beta$ 
    - A $\beta$  s vázanou mědí přímo produkuje ROS
    - plaky hromadí Cu, Fe (i Zn a asi i Al) v redoxně aktivních formách
  - Parkinson – Fe hromaděno v nemocné SN – pozdní děj
    - kovy katalyzují autooxidaci dopaminu → ROS + neromelanin bohatý na Fe
    - možné uvolnění redoxně aktivní Fe z neuromelaninu
- 6. excitotoxicita – viz otázka č. 27
  - i fyziologická stimulace glutamátem může být pro neuron toxická, pokud je porušena jeho produkce energie
  - určitá úroveň nervové aktivity je nezbytná pro přežití nervových buněk
  - antioapoptické signální dráhy se překrývají se signalizací synaptické plasticity

#### Alzheimerova nemoc

- demence = získaná progresivní porucha všech vyšších kognitivních funkcí
- nejčastější ze všech neurodegenerativních chorob
- nejasné oddělení od vaskulární demence (chronická ischemie mozku) a změn při normálním stárnutí mozku
- difúzní ztráta neuronů
  - patologie: senilní plaky – EC, jádro z agregovaného  $\beta$ -amyloidu  
„tangles“ – vlákna uvnitř neuronů – z hyperfosforylovaného proteinu tau
- epidemiologie
  - většina případů sporadická, dědičnost ovlivňuje predispozici
  - familiární formy (časný začátek): mutace v APP nebo presenilinech, také m. Down
  - negativní asociace s dosaženou úrovní vzdělání a pravidelnou fyzickou aktivitou
- účinná léčba dosud není

#### Parkinsonova nemoc

- progresivní porucha hybnosti (bradykinesie), pomalost pohybů, klidový třes, obtížný začátek pohybu (akinesie), svalová rigidita
- druhá nejčastější neurodegenerativní choroba
- selektivní smrt neuronů v substantia nigra (SN) → nedostatek dopaminu ve striatu
- patologie: Lewyho tělíska (zbývající SN obsahují agregovaný  $\alpha$ -synukleín) – nespecifické
- epidemiologie: téměř vždy sporadické, familiární formy s časným začátkem vzácně, někdy způsobena toxiny (MPTP)
- léčba: modulace dopaminergní transmise (funguje, ale má vedlejší účinky a časem se vytrácí)  
experimentální terapie transplantací dopamin-produkujících buněk do mozku