

# Oxidační stres u Alzheimerovy choroby a jeho důsledky

Chmátalová Z., Skoumalová A.

Ústav lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK v Praze.

## SOUHRN

Oxidační stres je do určité míry fyziologickým důsledkem řady biochemických a bioenergetických pochodů a doprovází aerobní organismy po celý jejich život. Podílí se na přirozeném stárnutí organismu a významnou úlohu zastává v imunologické odpovědi. Každý organismus má vyvinutý komplexní antioxidační systém, který ho chrání před radikálovým poškozením. Selhání tohoto vysoce specializovaného systému může vést k nevratnému poškození biomolekul a závažně tím poškodit jejich fyziologické funkce. Radikálové poškození a ztráta funkcí mozkových buněk je charakteristická pro neurodegenerativní onemocnění jako Alzheimerova choroba (ACH). To je důvod, proč se zvýšený oxidační stres považuje za iniciální impulz vzniku tohoto závažného progresivního onemocnění. Článek podává přehled patobiochemických mechanismů oxidačního stresu v mozkové tkáni doprovázejících rozvoj Alzheimerovy choroby.

*Klíčová slova:* oxidační stres, volné radikály, Alzheimerova choroba.

## SUMMARY

**Chmátalová Z., Skoumalová A.: Role of oxidative stress in Alzheimer's disease and related consequences**

Oxidative stress is to some extent a physiological consequence of biochemical and bioenergetic processes and accompanies aerobic organisms throughout their lives. Oxidative stress contributes to the natural aging and plays an important role in the immune response. Each organism has developed a complex system of antioxidant defense which protects it against the free radical damage. The failure of this highly specialized system can lead to irreversible damage to biomolecules and thereby seriously damage their physiological functions. Radical damage and loss of functions of brain cells is characteristic of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease. This is the reason why the increased oxidative stress is thought to be the initial impetus for developing this progressive disease. This article brings an overview of pathobiochemical mechanisms of oxidative stress in the brain tissue that accompany progression of Alzheimer's disease.

*Keywords:* oxidative stress, free radicals, Alzheimer's disease.

## Úvod

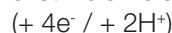
Oxidačním stresem se popisuje stav, kdy je porušena fyziologická rovnováha mezi oxidanty a antioxidy ve prospěch oxidantů. Volné radikály, které jsou v případě oxidačního stresu produkovány ve zvýšené míře, jsou schopny napadat všechny typy makromolekul (cukry, proteiny, lipidy, DNA), což ve svém důsledku může vést k poškození funkce buněk a tkání. Celá řada nemocí je doprovázena nadprodukcí volných radikálů a oxidačním stresem. Mezi tyto nemoci se řadí také neurodegenerativní nemoci včetně Alzheimerovy choroby (ACH). Cílem tohoto článku je podat přehled patobiochemických mechanismů oxidačního stresu provázejících rozvoj ACH a poukázat na důsledky radikálového poškození mozku.

## Biochemické mechanismy rozvoje oxidačního stresu

Produkce volných radikálů je nedílnou fyziologickou složkou každého aerobního organismu. Reaktivní sloučeniny vznikají v mitochondriích jako vedlejší produkty dýchacího řetězce a tvorby ATP, kdy je kyslík sledem reakcí redukován až na vodu za vzniku energie. Další významnou úlohu zastává oxidační stres při imunitní odpovědi organismu na infekci nebo poškození tkání a buněk. Efektorové buňky imunitního systému jsou

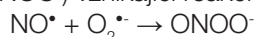
schopné, po ingestci cizorodých nebo nefunkčních buněk, ve svém nitru navodit podmínky oxidačního stresu, a tím pohlčené partikule rozložit a zlikvidovat.

Volné radikály jsou molekuly s jedním nebo více nepárovými elektrony ve vnějších molekulových orbitalech. Jsou velmi reaktivní, což je způsobeno jejich snahou o dosažení stabilnější elektronové konfigurace přijetím dalšího elektronu nebo vodíkového atomu. Nejvýznamnější a nejčastější skupinou radikálů vznikajících v lidském organismu jsou radikály kyslíkové, vznikající v důsledku oxidační fosforylace v mitochondriích, označované také jako reaktivní formy kyslíku (ROS). Konkrétně se jedná o superoxidový radikál ( $O_2^{\bullet-}$ ) a hydroxylový radikál ( $OH^{\bullet}$ ). Meziproduktem tvorby ROS je peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ), který z chemického hlediska není radikálem, ale mezi reaktivní sloučeniny ho řadíme. Ačkoliv peroxid vodíku nemá nepárový elektron, je silným oxidačním činidlem, schopným oxidace velkého množství biomolekul.

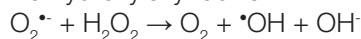


Superoxidový radikál vystupuje jako „primární“ reaktivní sloučenina schopná velmi rychlé interakce s okolními molekulami a tvorby „sekundárních“ reaktivních sloučenin. Během oxidačního stresu vznikají dále reaktivní sloučeniny odvozené od dusíku (RNS). RNS mohou vznikat jak přímou interakcí, tak i reakcí katalyzovanou enzymaticky nebo ionty přechodných kovů. Nejvýznamnější jsou oxid dusnatý (NO) a peroxyinitrit

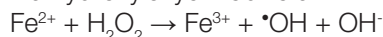
(ONOO<sup>-</sup>) vznikající reakcí dle rovnice:



Oxidační poškození polypeptidů, nukleových kyselin a sacharidových molekul není majoritně způsobeno přímou reakcí superoxidu s těmito strukturami, nýbrž je výsledkem kaskády následných reakcí. Superoxidový radikál podléhá tzv. Haber-Weissově reakci, při které vzniká hydroxylový radikál:



Další významnou reakcí je tzv. Fentonova reakce, při které dochází k oxidaci železnatých kationtů a opět vzniku hydroxylových radikálů:



Hydroxylový radikál je nejreaktivnějším kyslíkovým radikálem schopným přímé oxidace lipidů, uhlovodíkových řetězců, proteinů i DNA.

Oxid dusnatý je syntetizován různými typy buněk enzymatickou oxidací z L-argininu a je důležitým mediátorem řady fyziologických procesů. Ačkoliv je volným radikálem s nepárovým elektronem, nepatří NO mezi příliš reaktivní sloučeniny a s většinou biomolekul nereaguje. Velmi ochotně a rychle ovšem reaguje s molekulárním kyslíkem, přechodnými kovy a superoxidem. Reakcí se superoxidem vzniká peroxyinitrit, velice účinný oxidant, který oxiduje membránové lipidy, uhlovodíkové řetězce, proteiny i DNA. Navíc může vystupovat i jako nitrační činidlo podporující adici nitroskupiny na aromatický nebo indolový cyklus v proteinech obsahujících tyrozin, tryptofan nebo fenylalanin [1].

Vzhledem k tomu, že tvorba reaktivních sloučenin je fyziologickým důsledkem oxidačního metabolismu, disponují aerobní organizmy i velmi efektivním a komplexním systémem antioxidační ochrany. Halliwell definoval antioxidy jako látky, které se vyskytují v malých koncentracích v porovnání se substráty oxidovatelnými, jako jsou lipidy, proteiny a DNA a které zpomalují nebo brání oxidaci těchto substrátů [2]. Antioxidy tedy odstraňují a „neutralizují“ ROS/RNS i jejich prekurzory, zpomalují jejich tvorbu a váží do komplexů ionty přechodných kovů, které se na vzniku ROS/RNS podílejí [3]. Udržují tak rovnováhu mezi produkcí a detoxifikací ROS/RNS, aby nedocházelo k poškození biomolekul.

## Oxidační stres a Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je závažné neurodegenerativní onemocnění doprovázené ztrátou funkčních neuronů a vznikem mozkových lézí. Patofyziologickým znakem ACH je hyperfosforylace tau proteinu, který následně ztrácí své stabilizační funkce pro mikrotubuly. Druhým charakteristickým znakem ACH je formování nedegradovatelných amyloidních plaků v mozkové tkáni, které mají přímý neurotoxický efekt a navíc působí imunogenně, čímž prohlubují oxidační stres a poškození mozkové tkáně volnými radikály. Amyloidní plaky vznikají v důsledku změny konformace amyloidního proteinu na  $\beta$  skládaný list. Tato změna konformace může být silně potencována oxidačním stresem a radikálovým poškozením řídicích molekul. Onemocnění se manifestuje postupnou ztrátou kognitivních funkcí a negativní změnou osobnosti postiženého.

Poškození biologických struktur volnými radikály může vážně ohrozit fyziologické funkce a životaschopnost buněk. ROS/RNS poškození může být také spouštěcím podnětem pro buněčnou odpověď imunitního systému, kdy dochází k tvorbě sekundárních reaktivních sloučenin a celý proces může vyústit v apoptózu nebo vytvoření nekrotických ložisek. Produkty nebo meziproducty vznikající v důsledku oxidačního stresu lze využít jako užitečné biomarkery pro zhodnocení oxidační zátěže organismu. Bylo prokázáno, že rychlost biologického stárnutí dobře reflektuje množství ukládaných oxidovaných biomolekul ve většině tkání [4].

Mozková tkáň je oproti ostatním tkáním v těle více náchylná k oxidačnímu poškození. Důsledkem oxidačního poškození jsou zvýšené hladiny oxidačně pozměněných biomolekul a metabolitů, aktivované kompenzační mechanismy reagující na oxidační stres a poruchy metabolismu v mitochondriích. Tyto změny jsou u oxidačního poškození charakteristické, ačkoliv zdroj volných radikálů i cílové struktury oxidačního poškození se mohou u jednotlivých neurodegenerativních onemocnění lišit [5].

## Citlivost nervových buněk k radikálovému poškození je dána několika faktory

1. Neurony CNS využívají jako výhradní energetický zdroj ATP vznikající sledem reakcí oxidační fosforylace. Asi 20 % z celkové bazální spotřeby kyslíku připadá na mozek, ačkoliv tento orgán tvoří pouze přibližně 2 % celkové hmotnosti lidského těla.
2. Dospělý mozek využívá jako energetický substrát téměř výhradně glukózu.
3. Membrány nervových buněk jsou bohaté na polynenasycené mastné kyseliny (PUFA, polyunsaturated fatty acids), které lehce podléhají oxidaci hydroxylovými radikály.
4. Mozková tkáň obecně se vyznačuje vysokou koncentrací kovových iontů, které zde vystupují jako katalyzátory.
5. V mozku jsou nízké hladiny antioxidačních enzymů v porovnání s jinými tkáněmi.

Roli oxidačního stresu v patogenezi neurodegenerativních chorob podporuje fakt, že neurony jsou postmitotické buňky, ve kterých se oxidační poškození kumuluje v průběhu celého života. To by vysvětlovalo pozvolna progredující charakter onemocnění i propuknutí až v pokročilém věku jedinců [6].

## Význam iontů přechodných kovů u Alzheimerovy choroby

S amyloidními plakami, charakteristickým patologickým znakem Alzheimerovy choroby (ACH), je asociovaná i zvýšená koncentrace kovových iontů. Rajendran et al. (2009) zjistili, že koncentrace kovových iontů v plácích je podstatně vyšší než v okolní tkáni, a to konkrétně: železo (85 ppm oproti 42 ppm), měď (16 ppm oproti 6 ppm) a zinek (87 ppm oproti 34 ppm) [7].

Železo se v organismu může vyskytovat ve dvou oxidačních stavech, a to buď jako kationty železnaté ( $\text{Fe}^{2+}$ ) nebo železité ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Železnaté ionty nejsou ve vodném

prostředí stálé a reagují s molekulárním kyslíkem za vzniku iontů železitých a superoxidového radikálu. Další prooxidačně významnou reakcí, které se  $\text{Fe}^{2+}$  účastní, je Fentonova reakce, při níž vznikají vysoce reaktivní hydroxylové radikály. Tento oxidační potenciál železa se proto organismus snaží minimalizovat jeho vazbou na proteiny. Za podmínek oxidačního stresu organismu, kdy vzniká nadměrné množství radikálů, dochází k uvolnění chelatovaných iontů železa i k oxidaci  $\text{Fe}^{2+}$  iontů, které jsou součástí metaloenzymů. To prohlubuje oxidační stres zvýšenou tvorbou radikálů a navíc dochází k porušení funkcí daných metaloenzymů.

Porucha metabolismu železa se velkou měrou podílí na vzniku a progresi Alzheimerovy choroby nejen prohloubením oxidačního stresu, poškozením biomolekul, zvýšenou agregací amyloidu a fosforylací tau proteinu. K negativním efektům patří i porušení buněčného cyklu neuronů a zánětlivý proces, které mohou vést k buněčné apoptóze [8].

Měď se s velkou afinitou váže na amyloid přes histidinové (His13, His14, His6) a tyrozinové (Tyr10) zbytky [9]. S velkou afinitou se váží i ionty železa. Amyloidní plaky mají značný redukční potenciál, redukuje vázané kovové ionty za oxidace amyloidu a jako vedlejší produkt vzniká peroxid vodíku, který může generovat volné radikály a působit neurotoxicky. Jako účinné redukčans nemusí sloužit pouze amyloid, ale může jím být i například cholesterol, mastné kyseliny nebo kyselina askorbová. Oxysteroly a produkty peroxidace lipidů, jako 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), pak přispívají k polymerizaci amyloidu a patogenezi ACH.

Zinek v mikromolárních koncentracích je považován spíše za protektivní prvek, který zpomaluje cytotoxické působení amyloidu destabilizací vznikajících agregátů [10]. Kompetuje s ionty mědi o vazná místa na amyloidu a předchází tak sekundární tvorbě volných radikálů [11] přes peroxid vodíku. Po navázání zinku se mírně mění konformace molekuly amyloidu a měď se již vázat nemůže. Naproti tomu vysoké koncentrace zinku svojí vazbou na amyloid urychlují tvorbu fibrilárních amyloidních agregátů a působí tak neurotoxicky. Během zánětlivé imunologické odpovědi organismu na přítomnost amyloidu navíc dochází k porušení rovnovážných koncentrací zinečnatých iontů a vyplavení iontů, které prohlubuje oxidační poškození buněk.

## **Biomolekuly jako terče oxidačního poškození**

### **Oxidační poškození sacharidů**

Oxidační změny molekul cukrů jsou úzce provázané s následným poškozením proteinů. Monosacharidy mohou být oxidovány za katalýzy přechodnými kovy za vzniku volných radikálů, peroxidu vodíku a reaktivních dikarboxylových sloučenin, které následně reagují s proteiny vytvořením kovalentních vazeb za vzniku tzv. koncových produktů glykace (AGEs). Nejčastěji reagujícími sacharidovými molekulami jsou glukóza, fruktóza, deoxyglukóza, glyoxal, metylglyoxal a glyceralddehyd-3-fosfát [12]. Glukóza je, pravděpodobně díky

své energetické významnosti, nejméně reaktivním cukrem. Reaktivita sacharidů vzrůstá od hexózy k triózám a dikarboxylovým sloučeninám až o několik řádů [13].

Druhý mechanismus vzniku AGEs vychází z neenzymatické kondenzace proteinové aminoskupiny, konkrétně N-koncové aminoskupiny a postranních řetězců lyzinu a argininu, s reaktivní karboxylovou skupinou. Tato neenzymatická glykace, nazývaná též jako Maillardova reakce, probíhá ve třech krocích. Po vazbě aldehydové skupiny na aminoskupinu vzniká nejprve aldimin, neboli Schiffova báze a tato reakce je reverzibilní. Poté dochází k intramolekulárnímu přesmyku za vzniku stabilního ketoaminu, tzv. Amadoriho produktu. Rovnováha této reakce je silně posunuta doprava a k rozkladu Amadoriho produktů téměř nedochází. Amadoriho produkty mohou být následně dále oxidovány, což zvýší jejich reaktivitu a mohou tak dále reagovat s dalšími proteiny za vzniku AGEs, stabilních produktů obsahujících různé heterocykly a vykazujících fluorescenční vlastnosti. Vznik AGEs značně urychluje přítomnost kovových iontů, především železa a mědi, a tato katalýza dává vzniknout i dalším ROS.

Glykace se významnou měrou podílí na patogenezi ACH. Již v 80. letech Monnier a Cerami (1981) navrhli, že ireverzibilní nefyziologické propojování proteinů s dlouhým poločasem pomocí AGEs významně přispívá k postupnému poklesu funkcí buněk a tkání během stárnutí. Agregace proteinů navíc brání jejich degradaci a přispívá k jejich hromadění v intracelulárním (neurofibrilární tangly, NFTs) a extracelulárním (amyloidní plaky) prostoru [14].

Hlavní komponentou NFTs je s mikrotubuly asociovaný protein (MAP)-Tau. Tento MAP-Tau protein je přednostně glykovaný ve vazném místě pro tubulin. Pozměnění vazného místa ztěžuje vazbu Tau na tubulin, což naopak usnadňuje agregaci Tau proteinu, vytváření stabilních vláknitých struktur a tvorbu NFTs [15]. NFTs a modifikované proteiny se tím pak stávají rezistentní vůči proteolytické degradaci, pravděpodobně díky velkému počtu disulfidových, dityrozinových a AGE-spojů a také díky inhibičnímu efektu AGE proteinových aduktů na proteazomy.

Tvorba AGEs extracelulárně byla prokázána v různých korových oblastech u ACH v asociaci s amyloidními plakami. AGEs byly detekovány i v difúzních plácích, nikoliv však v jádrech amyloidu [16]. Toto zjištění podporuje fakt, že AGEs potencují tvorbu amyloidních plaků, avšak během vyžívání plaku nebo jeho interakce s aktivovanými mikroglieami AGEs epitopy mizí. Konverze monomerních amyloidů na polymerizované vysokomolekulární plakami potencovaná AGEs zatím prokázána nebyla. Nicméně tvorba nukleárních center amyloidních plaků je tvorbou AGEs významně urychlena a k urychlení polymerizace přispívá i přítomnost iontů mědi a železa [17]. Všechna tato zjištění vedou k závěru, že ačkoliv AGEs nejsou primární příčinou patogeneze ACH, představují hnací sílu nadměrné tvorby a ukládání amyloidu a tvorby senilních plaků.

### **Oxidační poškození lipidů**

Polynenasycené mastné kyseliny tvořící fosfolipidovou dvojvrstvu nervových buněk jsou snadným terčem oxidačního poškození, protože obsahují dvojnou vazbu,

kteře snadno poskytují k reakci své delokalizované  $\pi$  elektrony. Dvojně vazby navíc oslabují vazby C-H nacházející se v jejich nejbližším okolí, a tím usnadňují abstrakci  $H^{\bullet}$  z řetězce mastné kyseliny. Peroxidace membránových lipidů může mít pro buňku i její blízké okolí zničující následky. Lipoperoxidace membrán vede k pozměnění jejich biologických vlastností. Mění se fluidita membrány, může dojít k inaktivaci membránových receptorů nebo vázaných enzymů, což může negativně ovlivnit fyziologické fungování celé buňky. Oxidačně pozměněná buňka může navíc přispět k amplifikaci oxidačního poškození vlastními oxidačními produkty, které jsou reaktivní a mohou se kovalentně vázat na jiné důležité biologické struktury, a tím je nevratně poškodit. Mezi polynenasycené mastné kyseliny podléhající oxidaci patří například kyseliny linolová, linolenová, arachidonová, klupadonová, eikosapentaenová a další.

Lipoxidace nebo také lipoperoxidace je radikálová řetězová reakce. Probíhá ve třech klasických stupních označovaných obecně jako iniciace, propagace a terminace. Iniciační reakce zahajuje reakční kaskádu. Spočívá v ataku uhlovodíkového řetězce reaktivní sloučeninou, odnětí vodíkového atomu jedné z metylenových skupin řetězce ( $-CH_2-$ ) a vytvoření nového radikálu ( $-CH^{\bullet}-$ ). Uhlíkový radikál způsobí intramolekulární přesmyk a vznikne konjugovaný dien. Tento konjugovaný dien není příliš stálý a reaguje s kyslíkem za vzniku peroxy radikálu ( $-COO^{\bullet}-$ ). Vzniklý peroxy radikál vykazuje dostatečnou reaktivitu a může odejmout vodíkový atom z jiné mastné kyseliny, a tím přispět k propagaci řetězové reakce. Konečným krokem řetězové lipoxidace jsou terminační reakce, při kterých již nevzniká další radikálová molekula, nýbrž lipoperoxidy. Mezi terminační reakce řadíme reakce, při nichž spolu reagují dva radikály nebo reakci radikálu s molekulou antioxidantu.

Lipoperoxidy jsou za fyziologické teploty stabilní molekuly. Jejich rozklad je realizován katalýzou iontů přechodných kovů nebo komplexních sloučenin těchto kovů. Pokud rozklad katalyzují ionty, mechanismus je stejný jako u Fentonovy reakce. Molekuly, jako je například hemoglobin nebo cytochrom, se Fentonovy reakce neúčastní, ačkoliv na usnadnění rozkladu lipoperoxidů se podílejí. Dekompozici lipoperoxidů usnadňují i ionty železa ve feritinu a hemosiderinu, ionty správně vázané v transferinu a laktoferinu ovšem nikoliv [18].

Reakcí ROS/RNS s lipidy membrán vznikají různé, poměrně stálé koncové produkty lipoperoxidace. Jsou to především  $\alpha,\beta$ -nenasycené reaktivní aldehydy jako malondialdehyd (MDA), HNE, 2-propenal nazývaný též akrolein a různé izoprostany. Tyto sloučeniny jsou oproti volným radikálům stabilní, mohou difundovat a reagovat daleko od místa svého vzniku. Mohou tedy vystupovat jako „druhý posel“ oxidačního poškození a vyvolat primární reakci v místech, které původně oxidačním stresem zasažené nebyly.

MDA vzniká v malém množství i fyziologicky jako vedlejší produkt během rozkladu nenasyčených lipidů při metabolismu kyseliny arachidonové. Nadbytek MDA vznikající v důsledku tkáňového poškození je pro tkáň nebezpečný. MDA Michaelovou adicí snadno reaguje s volnými aminokyselinovými konci proteinů za tvor-

by MDA modifikovaných proteinů. Tím může docházet k ovlivnění fyziologických funkcí daného proteinu a zároveň se tento protein stává imunogenním.

HNE je nejvíce zastoupeným produktem oxidace  $\omega$ -6 polynenasycených mastných kyselin, tedy kyseliny arachidonové, linolové a linolenové. HNE je vysoce reaktivní a vystupuje jako sekundární mediátor radikálového poškození. HNE reaguje s lipidy a fosfolipidy za tvorby tzv. koncových produktů lipoxidace [19], reaguje i s nukleovými kyselinami a kovalentně se váže Michaelovou adicí především na histidin, lyzin a cystein peptidů a proteinů. Inhibuje glykolýzu, syntézu proteinů, DNA i RNA, inaktivuje enzymy, stimuluje fosfolipázu C a chemotaxi neutrofilů, ovlivňuje agregaci trombocytů a expresi genů. Navíc je významným mediátorem stresem vyvolané apoptózy a buněčné proliferace [20].

Kromě přímého poškození membránových fosfolipidů volnými radikály se na poškození a smrti buněk podílí i HNE nepřímým mechanismem. Montine et al. (1996) [21] prokázali, že HNE je toxický pro neurony a astrocyty a usnadňuje zesíťování tau proteinu do vysokomolekulárních struktur s konjugovaným ubiquitinem. HNE se váže na glutamátový transporter GLT-1 [22], snižuje aktivitu acetylcholintransferázy, poškozuje cholinergní neurony a zhoršuje zrakově-prostorové schopnosti.

Bylo provedeno velké množství studií, které prokázaly zvýšenou míru lipoperoxidace v mozku pacientů s ACH v porovnání se skupinou jejich zdravých vrstevníků. Z toho vyplývá, že oxidační poškození lipidů není přirozeným důsledkem fyziologického stárnutí organismu [22] a zvýšené koncentrace HNE nebo akroleinu je možné detekovat v mozku u pacientů s ACH i mozku pacientů v prodromální fázi onemocnění (MCI, mild cognitive impairment) [23].

### Oxidační poškození proteinů

Proteiny jsou díky svému velkému zastoupení v organismu nejčastějším terčem oxidačního poškození. K poškození může docházet na všech strukturálních úrovních – od primární struktury až po kvartérní. Davies et al. (1999) uvádějí, že proteiny zachytí 50 % – 75 % všech tvořených ROS/RNS [24]. Poškození může být způsobeno buď přímo reaktivními sloučeninami, nebo nepřímo reakcí s reaktivními produkty primárního oxidačního poškození. Mechanismy reakcí se liší, ale vedou k pozměnění peptidových řetězců, rozštěpení nebo naopak zesíťování řetězců [24]. Následky oxidačního pozměnění proteinů jsou nevratné a negativně ovlivňují fyziologické funkce proteinů. Může docházet k poruchám jejich enzymatických, strukturálních a vazných vlastností, k ovlivnění exprese proteinů a jejich metabolismu, dysregulaci buněčné signalizace a indukci apoptózy či nekrózy. Oxidační změny zvyšují náchylnost proteinů k agregaci a pozměnění jejich imunogenicity [25].

Oxidované proteiny jsou nejčastěji metabolizovány a degradovány v proteazomech a lysozomech. Některé oxidační změny na proteinech zapříčiňují jejich obtížnou nebo nemožnou degradaci. Takové proteiny agregují a akumulují se uvnitř buněk nebo v extracelulárním



prostoru [26]. Hromadění poškozených nedegradovatelných proteinů může vést k úplné inhibici proteazomů [27], čímž se koncentrace oxidovaných proteinů a proteinů s chybnou konformací ještě zvyšuje. Nakonec dochází k metabolickému rozvratu uvnitř buňky a spuštění apoptotických či nekrotických mechanismů.

Velký vývoj proteomiky umožnil podrobné zkoumání a kvantifikaci oxidačně poškozených nebo pozměněných proteinů v organismu vystavenému fyziologickému i patologickému oxidačnímu stresu. Je možné detekovat karbonylované, nitrované, 4-hydroxynonenalem nebo glutationem kovalentně modifikované proteiny v mozku pacientů s ACH a kontrolních dobrovolníků. Metody redoxní proteomiky většinou spojují analytické metody dvoudimenzionální (2D) gelové elektroforézy s metodami blotování (2D-Western blotting) a hmotnostní spektrometrií. Redoxní proteomika přináší velmi dobré a pokročilejší výsledky ve srovnání s tradičními chemickými metodami, i když i u těchto vysoce specializovaných metod je někdy problematické překonat některé omezující faktory (solubilizace membránových proteinů, nízké meze detekce) [28].

Bylo prokázáno, že u Alzheimerovy choroby jsou regionální rozdíly ve výskytu patologických znaků a nahromadění oxidačně pozměněných proteinů. Například hipokampus pacientů s ACH vykazuje vyšší míru oxidačního poškození než například mozeček [29].

Proteinové enzymy, které byly identifikovány jako oxidačně modifikované, jsou enolázy, triázofosfátizomeráza, fosfoglycerátmutáza 1, kreatinkináza, laktátdehydrogenáza, akonitáza, ATP-syntáza nebo aldoláza [29]. Tyto enzymy se účastní přímo či nepřímo energetického metabolismu v buňce a jejich modifikace vede k poruchám metabolismu cukrů, jež jsou hlavním zdrojem energie pro mozkové buňky, a tedy k nedostatečné tvorbě ATP. Následkem snížené produkce ATP dochází k porušení buněčné homeostázy, zániku funkčních synapsí mezi neurony a poškození mozkových funkcí. Nedostatek ATP negativně ovlivňuje ATP-dependentní iontové kanály, aktivní glukózové a glutamátové přenašeče nebo buněčnou signalizaci. Změny akčních potenciálů a narušení iontové rovnováhy, především napěťově řízených  $Ca^{2+}$  kanálů, v kombinaci s oxidačním stresem poškozenou fosfolipidovou asymetrií buněčné membrány, kdy se na vnější straně objevuje fosfatidylserin, mohou být silným signálem pro zahájení apoptózy [30].

Další skupinu oxidačně modifikovaných proteinů tvoří mitochondriální poriny (VDAC). VDAC se účastní přenosu různých metabolitů, mezi nimi i ATP dovnitř mitochondrie. Navíc VDAC poriny hrají důležitou roli v zahájení a řízení apoptózy, protože regulují vyplavování některých apoptotických faktorů, jako je cytochrom c, apoptózu indukující faktor nebo kaspázy. Oxidační poškození VDAC, především VDAC-1, tedy může značně přispívat k poškození synaptické plasticity a spojení, vedoucí až k apoptotické smrti buněk.

Ubikvitin C-terminální hydroláza 1 (UCHL-1) je součástí degradační dráhy proteinů v proteazomech, protože zabraňuje agregaci proteinů v intracelulárním prostoru. Oxidační poškození UCHL-1 způsobuje aku-

mulaci poškozených a agregovaných proteinů uvnitř buněk a nadměrnou ubikvitinylaci proteinů, což přispívá k degeneraci funkčních synapsí a poškození funkcí mozku [30].

DRP-2,  $\beta$ -aktin a  $\alpha$ -tubulin jsou cytoskeletální proteiny nezbytné pro udržení fyziologického uspořádání mozkových buněk, jejich vlastní komunikaci a axonální transport. Oxidační poškození těchto strukturních proteinů může významně přispět ke zkrácení dendritických výběžků, ztrátě interneuronálních spojů, zhoršení axonálního transportu a ztrátě strukturní integrity tkáně u pacientů s ACH [31].

Na nedostatečném vedení vzruchů, zapříčiněném sníženou tvorbou acetylcholinu, se podílí oxidační poškození neuropolypeptidu h3, fosfatidyletanolamin vázajícího proteinu a cholinergního neurostimulačního peptidu hipokampu. Jsou to molekuly podléjící se na tvorbě acetylcholintransferázy a jsou důležité i pro udržení asymetrie fosfolipidových membrán. Bylo prokázáno, že poškození neuropolypeptidu h3 velmi dobře koreluje se ztrátou cholinergních neuronů u pacientů s ACH [28].

Pin-1 izomeráza je zapojena do buněčného cyklu a také se podílí na správném spojování a skládání proteinů, transkripci, intracelulárním transportu, signalizaci a apoptóze. Dále bylo zjištěno, že Pin-1 se váže na  $A\beta$ -prekurzorový protein a ovlivňuje tvorbu amyloidu a svým působením na kinázy a fosfatázy reguluje i fosforylaci tau proteinu [22]. To je důvod, proč oxidační poškození nezpůsobí pouze změny v buněčném cyklu, ale může být zodpovědné i za tvorbu neurofibrilárních tanglů a produkci amyloidu a přispívat tak k silnější progresi onemocnění.

Oxidační poškození jednotlivých proteinů se u ACH a MCI mírně liší. Tyto rozdíly bohužel nejsou dostatečně signifikantní. Oxidační poškození konkrétních skupin proteinů se v jednotlivých fázích onemocnění překrývá a vykazuje i značné interindividuální rozdíly. To je důvod, proč nelze prozatím výsledky paušalizovat a využít redoxní proteomiku jako diagnostický nástroj.

### Poškození nukleových kyselin

Oxidačnímu poškození podléhá ribonukleová (RNA) i deoxyribonukleová kyselina (DNA). RNA je pouze jednovláknová a její báze nejsou chráněné vodíkovými vazbami ani histony, proto je RNA k oxidačnímu poškození náchylnější. Nukleové kyseliny jsou nejčastějším terčem hydroxylových radikálů a reakcí vznikají různě modifikované báze či cukerné zbytky. Hydroxylové radikály ale nejsou jedinými radikály, které s nukleovými kyselinami reagují. Poškození a modifikaci nukleových kyselin mohou způsobit všechny kyslíkové nebo dusíkové reaktivní sloučeniny a poškození nezahrnuje pouze modifikaci řetězce kyseliny, ale také rozštěpení řetězce, nefyziologické vazby DNA-DNA, DNA-RNA i DNA-protein, případně výměnu sesterských chromatid. Důležitou roli v míře poškození hrají i reparativní mechanismy, kterými je pozměněná nukleová kyselina opravována.

Markery oxidačního poškození DNA u pacientů s ACH jsou 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanozin, 8-hydroxyadenin nebo 5-hydroxyuracil detekovatelné ve zvýšených koncentracích v temporálním, parietálním

i frontálním laloku [32]. Mitochondriální DNA vykazuje vyšší koncentraci poškozené DNA než jaderná DNA, což odpovídá i míře oxidačního poškození funkcí mitochondrií u pacientů s ACH [33].

## Závěr

Oxidační stres může vážně poškodit všechny typy makromolekul v organismu a narušit tak rovnováhu fyziologického fungování buněk. Patologické procesy v mozku u ACH jsou provázány oxidačním stresem, což dokazuje kumulace nejrůznějších produktů radikálového poškození makromolekul a následná dysfunkce vedoucí k neurodegeneraci. Zatím není možné jednoznačně říci, zda je oxidační stres primární příčinou rozvoje ACH či vzniká sekundárně jako odezva na patologické změny v mozku. Nicméně prozatímni znalosti o mechanismech radikálového poškození a s tím spojené negativní dopady na fyziologické fungování jednotlivých biologických struktur jasně ukazují, že oxidační stres se na vzniku a pozdější progresi onemocnění jasně spoluúčastní.

## Seznam zkratk

AGEs	koncové produkty glykace (Advanced Glycation End-products)
ACH	Alzheimerova choroba
ATP	adenozintrifosfát
A $\beta$	amyloid beta
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DRP-2	dystrophin related protein 2
é	elektron
H <sup>+</sup>	vodíkový kationt
H <sup>•</sup>	vodíkový radikál
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxid vodíku
HNE	4-hydroxy-2-nonenal
MAP-Tau	s mikrotubuly asociovaný Tau protein (microtubule associated Tau protein)
MCI	mírný kognitivní deficit (mild cognitive impairment)
MDA	malondialdehyd
NFTs	neurofibrilární tangly (neurofibrillary tangles)
NO	oxid dusnatý
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	superoxidový radikál
OH <sup>•</sup>	hydroxylový radikál
ONOO-	peroxynitrit
Pin-1	peptidylprolyl cis-trans izomeráza (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase)
RNA	ribonukleová kyselina
RNS	reaktivní sloučeniny dusíku
ROS	reaktivní sloučeniny kyslíku
UCHL	ubikvitin C-terminální hydroláza
VDAC	napětově řízené mitochondriální poriny (voltage-dependent anion channel)

## Literatura

1. **Markesbery, W. R., Carney, J. M.** Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol*, 1999, 9, p. 133-146.
2. **Halliwell, B.** How to Characterize a Biological Antioxidant. *Free Radic Res*, 1990, 9 (1), p. 1-32.
3. **Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., Offen, D.** Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 2001, 40, p. 959-975.
4. **Linton, S., Davies, M.J., Dean, R. T.** Protein oxidation and ageing. *Exp Gerontol*, 2001, 36, p. 1503-1518.
5. **Behl, C., Moosmann, B.** Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radic Biol Med*, 2002, 33(2), p. 182-191.
6. **Coyle, J. T., Puttfarcken, P.** Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science*, 1993, 262 (5134), p. 689-695.
7. **Rajendran, R., Ren, M. Q., Ynsa, M. D., Casadesus, G., Smith, M. A., Perry, G., Halliwell, B., Watt, F.** A novel approach to the identification and quantitative elemental analysis of amyloid deposits-insights into the pathology of Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 382, p. 91-95.
8. **Jomova, K., Valko, M.** Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 2011, 283, p. 65-87.
9. **Hung, Y. H., Bush, A. I., Cherny, R. A.** Copper in the brain and Alzheimer's disease. *J Biol Inorg Chem*, 2010, 15, p. 61-76.
10. **Garai, K., Sengupta, P., Sahoo, B., Maiti, S.** Selective destabilization of soluble amyloid  $\beta$  oligomers by divalent metal ions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, 345, p. 210-215.
11. **Cuajungco, M. P., Goldstein, L. E., Nunomura, A., Smith, M. A., Lim, J. T., Atwood, C. S., Huang, X., Farrag, Y. W., Perry, G., Bush, A. I.** Evidence that the beta-amyloid plaques of Alzheimer's disease represent the redox-silencing and entombment of abeta by zinc. *J Biol Chem*, 2000, 275, p. 19439-19442.
12. **Thornalley, P. J.** Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys*, 2003, 419, p. 31-40.
13. **Iwata, H., Ukeda, H., Maruyama, T., Fujino, T., Sawamura, M.** Effect of carbonyl compounds on red blood cells deformability. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 321, p. 700-706.
14. **Monnier, V. M., Cerami, A.** Nonenzymatic browning in vivo: possible proces for aging of long-lived proteins. *Science*, 1981, 211, p. 491-493.
15. **Ledesma, M. D., Bonay, P., Colaco, C., Avila, J.** Analysis of Microtubule-associated Protein Tau Glycation in Paired Helical Filament. *J Biol Chem*, 1994, 269 (34), p. 21614-21619.
16. **Girones, X., Guimera, A., Cruz-Sanchez, C. Z., Ortega, A., Sasaki, N., Makita, Z., Lafuente, J. V., Kalaria, R., Cruz-Sanchez, F. F.** N epsilon-carboxymethyllysine in brain aging, diabetes mellitus, and Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*, 2004, 36, p. 1241-1247.
17. **Srikanth, V., Maczurek, A., Phan, T., Steele, M., Westcott, B., Juskiw, D., Münch, G.** Advanced glycation end products and their receptor RAGE in Alzheimer's disease. *Neurobiol aging*, 2011, 32, p. 763-777.
18. **Gutteridge, J. M. C.** Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*, 1995, 41 (12), p. 1819-1828
19. **Esterbauer, H., Schaur, R. J., Zollner, H.** Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, 1991, 11, p. 81-128.
20. **Carini, M., Aldini, G., Facino, R. M.** Mass spectrometry for detection of 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE) adducts with peptides and protein. *Mass spectrom Rev*, 2004, 23, p. 281-305.

21. **Montine, T. J., Amarnath, V., Martin, M. E., Strittmatter, W. J., Graham, D. G.** E-4-hydroxy-2-nonenal is cytotoxic and cross-links cytoskeletal proteins in P19 neuroglial cultures. *Am J Pathol*, 1996, 148 (1), p. 89-93.
22. **Butterfield, D. A., Mohammad-Abdul, H., Opii, W., Newman, S. F., Joshi, G., Ansari, M. A., Sultana, R.** Role of Pin-1 in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 2006, 98, p. 1699-1706.
23. **Williams, T. I., Lynn, B. C., Markesbery, W. R., Lovell, M. A.** Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein, neurotoxic markers of lipid peroxidation, in the brain in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 2006, 28(8), p. 1094-1099.
24. **Davies, M. J., Fu, S., Wang, H., Dean, R. T.** Stable markers of oxidant damage to proteins and their implication in study of human diseases. *Free Radic Biol Med*, 1999, 27, p. 1151-1161.
25. **Stadtman, E. R., Levine, R. L.** Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acids residues in proteins. *Amino Acids*, 2003, 25, p. 207-218.
26. **Grune, T., Merker, K., Sandig, G., Davies, K. J. A.** Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 305, p. 709-718.
27. **Grune, T., Jung, T., Merker, K., Davies, K. J. A.** Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and „aggregosomes“ during oxidative stress, aging, and disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36, p. 2519-2530.
28. **Sultana, R., Perluigi, M., Butterfield, D. A.** Oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease (AD), mild cognitive impairment and animal models of AD: role of Abeta in pathogenesis. *Acta Neuropathol*, 2009, 118, p. 131-150.
29. **Sultana, R., Boyd-Kimball, D., Poon, H. F., Cai, J., Pierce, W. M., Klein, J. B., Merchant, M., Markesbery, W. R., Butterfield, D. A.** Redox proteomics identification of oxidized proteins in Alzheimer's disease hippocampus and cerebellum: an approach to understand pathological and biochemical alterations in AD. *Neurobiol Aging*, 2006, 27, p. 1564-1576.
30. **Castegna, A., Aksenov, M., Aksenova, M., Thongboonkerd, V., Klein, J. B., Pierce, W. M., Booze, R., Markesbery, W. R., Butterfield, D. A.** Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatinine kinase BB, glutamin synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Radic Biol Med*, 2002, 33, p. 562-571.
31. **Spires, T. L., Meyer-Luehmann, M., Stern, E. A., McLean, P. J., Skoch, J., Nguyen, P. T., Bacskai, B. J., Hyman, B. T.** Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. *J Neurosci*, 2005, 25, p. 7278-7287.
32. **Gabbita, S. P., Lovell, M. A., Markesbery, W. R.** Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 1998, 71, p. 2034-2040.
33. **Sultana, R., Butterfield, D. A.** Role of oxidative stress in the progression of Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis*, 2010, 19, p. 341-353.
34. **Butterfield, D. A.** Amyloid  $\beta$ -peptide(1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. *Free Radic Res*, 2002, 36, p. 1307-1313.

Článek vznikl za finanční podpory GA UK (projekt číslo 236213) a 2. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Do redakce došlo 14. 5. 2014

Adresa pro korespondenci  
Mgr. Zuzana Chmátalová  
Plzeňská 221,  
156 06 Praha 5  
e-mail: zuzana.chmatalova@lfmotol.cuni.cz