

Role přirozených antioxidačních mechanismů v prevenci chronických chorob

Jaroslav Zelenka

Souhrn

Předložená práce je zaměřena na stěžejní téma posledních patnácti let mého výzkumu. V úvodu seznamuje s volnými radikály a reaktivními kyslíkovými sloučeninami a popisuje vlastnosti těch nejdůležitějších z hlediska fungování lidského organismu ve zdraví i nemoci. Následuje oddíl představující hlavní antioxidační systémy, počínaje enzymy, přes nízkomolekulární zhášedce, popis transkripční regulace antioxidační odpovědi, až po přírodní látky, které mohou potenciálně hrát roli v regulaci antioxidační odpovědi. Největší důraz je ale kladen na endogenní systémy a poznatky o jejich vlivu na zdraví vyplývající z klinických studií.

Dále je diskutována oxidačně-redukční signalizace, její mechanismy a nejvýznamnější dráhy, které ovlivňuje. Všechny uvedené poznatky jsou vsazeny do rámce patogeneze chronických nepřenositelných chorob, které populárně nazýváme civilizační choroby. Podrobněji jsou popsány děje, které společně stojí u vzniku většiny těchto chorob, tedy chronický zánět, vyčerpání kmenových buněk a mitochondriální dysfunkce. V časových souvislostech je uveden přehled nejvýznamnějších teorií, které se snaží globálně vysvětlit fenomén stárnutí, dlouhověkosti a chronických chorob, především klasická hypotéza volných radikálů, její velmi vlivná modifikace zahrnující mitochondrie a konečně moderní a svým způsobem revoluční hypotéza mitochondriální hormeze.

Následuje diskuse hlavních výstupů, na jejichž vzniku jsem se podílel, z hlediska přínosu k poznání endogenních antioxidačních systémů i jejich role v patogenezi chronických chorob a stárnutí. Začíná mou nejvýznamnější prvoautorskou prací, kde byla zavedena metoda pro stanovení hladin antioxidantu bilirubinu ve tkáních a buňkách. Představuje i práce, které tuto metodu aplikovaly, aby popsaly aktivní regulaci metabolismu bilirubinu za různých situací souvisejících s oxidačním stresem. Dále přechází k tématice mitochondrií a objasnění mechanismu, kterým bilirubin reguluje oxidačně-redukční signalizaci. Doplnuje ji charakterizací stejného jevu u dvou dalších tetrapyrólů, které jsou již dnes dostupné jako součást potravinových doplňků, fykokyanobilinu a chlorofylu. V poslední části je představen laktát jakožto přirozený induktor mitochondriální hormeze a jeho další účinky jak ve fyziologii, tak v patogenezi nádorových chorob.

Závěrem celé práce je, že přirozené hladiny bilirubinu a laktátu, dvou bezpečných, tělu vlastních metabolitů, modulují mitochondriální produkci reaktivních kyslíkových sloučenin žádoucím směrem, který může být využit v prevenci chronických chorob a zpomalení stárnutí.

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval všem svým učitelům, vedoucím a kolegům, kteří mě navigovali na spletné cestě biochemií.

Největší dík patří prof. Ing. Tomáši Rumlovi, CSc. a prof. MUDr. Liboru Vítovi, Ph.D. MBA za vedení, podporu a velkorysost.

Speciální dík patří bývalým i současným studentům, kteří pro změnu důvěřovali mému vedení, především RNDr. Aleši Dvořákovi, Ph.D., Mgr. Lukáši Alánovi, Ph.D., Ing. Martině Koncošové a Ing. Nikole Vrzáčkové.

Nejsrdečnější dík patří mé milé manželce, rodičům a dětem, kteří mi vždy vytvářeli dokonalé rodinné zázemí, bez kterého by mě moje práce nemohla tolik těšit.

Seznam zkratek

AP-1	Activator protein 1
ARE	Antioxidant response element
DAMP	Danger associated molecular pattern
GPR81	G-protein coupled receptor 81
HIF	Hypoxia-inducible factor
Hmox	Hemoxygenase
HPLC	High performance liquid chromatography
I κ B	Inhibitor κ B
Keap-1	Kelch-like ECH-associated protein-1
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
NF κ B	Nuclear factor κ B
NLRP3	NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3
NOX	NADPH oxidasa
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NQO1	NADPH: chinon oxidoreduktasa 1
PGC1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α
ROS	Reactive oxygen species
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
SOD	Superoxiddismutasa

Obsah

1 Úvod

2 Odpověď na oxidační stres

2.1 Role kyslíku v evoluci života

2.2 Reaktivní kyslíkové sloučeniny

2.2.1 Základní triáda ROS

2.2.2 Exogenní zdroje oxidačního stresu

2.2.3 Další zdroje oxidačního stresu

2.3 Antioxidační mechanismy

2.3.1 Antioxidační enzymy

2.3.2 Zhášení radikálových reakcí

2.3.3 Nízkomolekulární zhášecí

2.3.4 Thiolové antioxidanty

2.3.5 Transkripční regulace

2.3.6 Přírodní antioxidanty

2.4 Oxidačně-redukční signalizace

2.5 ROS a chronické choroby

3 Přehled řešené problematiky

3.1 Bilirubin – od toxinu k antioxidantu

3.2 Tetrapyroly a mitochondrie

3.3 Laktát a mitohormeze

4 Závěr

5 Literatura

6 Přílohy

1 Úvod

S koncepcí oxidačního stresu jsem se podobně jako většina laické veřejnosti setkal poprvé v raných devadesátých letech. Do té doby panující neurčitá tvrzení o potřebnosti vitamínů a možnost koupit si Celaskon byly náhle převálcovány masivní a dobře cílenou kampaní farmaceutických firem. Ze všech médií v čele s „lifestyle“ časopisy se člověk dozvídal o existenci zákeřných volných radikálů, oxidačního stresu a hlavně možnosti proti nim bojovat tabletkami s antioxidanty, tedy se selenem, β -karotenem, askorbátem a tokoferolem, ke kterým se později přidala myriáda „antioxidačních“ přírodních preparátů.

Pojídání antioxidantů mělo zajistit zpomalení stárnutí, zlepšení imunity a ochranu proti chronickým chorobám včetně nádorového bujení. Významným bonusem pro postkomunistickou populaci byl příslib, že tyto doplňky stravy zmírní i poškození zdraví vyvolané kouřením cigaret, konzumací alkoholu a znečištěným ovzduším. Přímocarost tohoto konceptu lidem učarovala a i Češi tehdy pomohli vytvořit trh, jehož celosvětový objem byl v roce 2017 odhadován na 50 miliard USD, a který stále prudce roste a růst zřejmě bude.

Když se kolem roku 2005 stal oxidační stres předmětem mého odborného zájmu, zjistil jsem, že situace je ve skutečnosti mnohem komplikovanější. Klinické a epidemiologické studie nenašly mezi požíváním vitamínových preparátů a zdravím žádný vztah. V některých případech byla dokonce nalezena vyšší úmrtnost u jedinců, kteří vitamíny konzumovali. Objevil jsem též práce popisující oxidačně-redukční signalizace v buňce, kdy volné radikály slouží jako nepostradatelný signál rozhodující o tak zásadních jevech, jako je buněčné dělení, metabolismus a imunitní odpověď. Jedním z paradoxů byla i studie ukazující, že vysoké dávky vitamínu C prakticky vymazávají prospěšné zdravotní účinky sportu, který je naopak doprovázen značným oxidačním stresem.

Ale nejvíc fascinující pro mě byl fakt, že žádná z těchto kontroverzí neměla ani malou odezvu mezi veřejností a už vůbec ne v marketingových sděleních společností prodávajících antioxidanty. Byznys s nadějí jede dál, a i když se některé koncepty ukázaly být užitečné a jiné škodlivé, veřejnost zatím nemá šanci tyto poznatky racionálně využít v péči o své zdraví.

A právě proto se domnívám, že studium oxidačního stresu a jeho vlivu na lidské zdraví má smysl i šedesát let od vyslovení první hypotézy na toto téma. Hlavně v posledních deseti letech se v tomto odvětví odehrálo mnoho převratů a boření paradigmat. Jsem rád, že jsem mohl toto dobrodružství sledovat a aktivně se ho účastnit. Předkládaná práce popisuje aktuální stav názorů na roli oxidačního stresu v patogenezi chronických chorob a můj příspěvek k nim.

2 Odpověď na oxidační stres

2.1 Role kyslíku v evoluci života

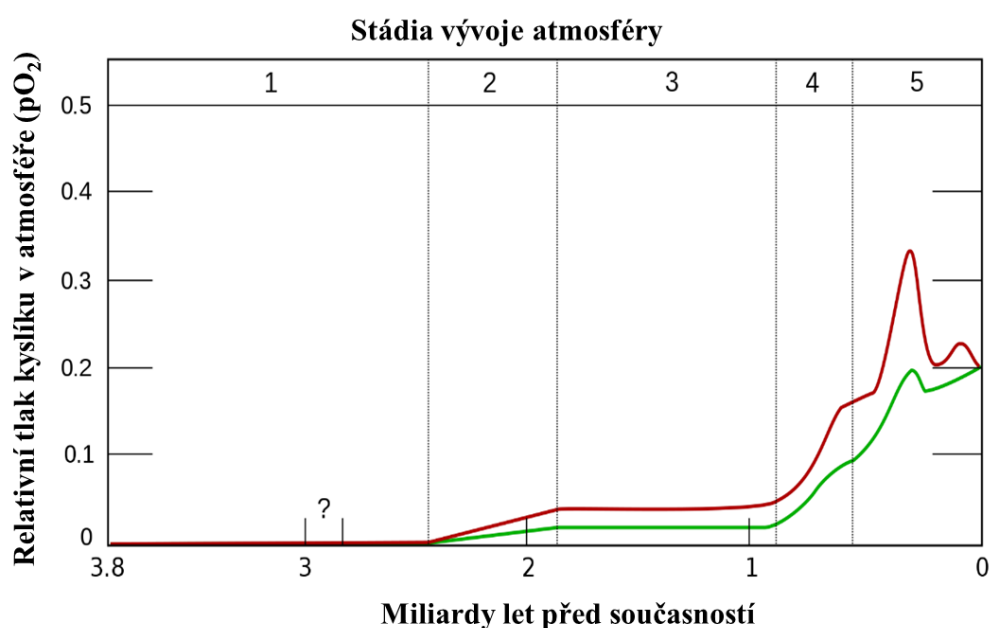
Dýchání považujeme téměř za symbol života a málokdo pochybuje o důležitosti kyslíku. Realita je však mnohem komplexnější. Biologické molekuly jsou ve své podstatě reduktanty, zatímco molekulární kyslík je jedním z nejsilnějších oxidantů. Okamžité oxidaci veškerého biologického materiálu atmosférickým kyslíkem brání pouze kinetická bariéra daná vysokou aktivační energií této reakce. V živých organismech však probíhá celá řada procesů, které tuto aktivační bariéru mohou snížit, čímž dochází k oxidačnímu poškození. To mění strukturu i funkci všech biologických molekul včetně DNA. A protože některé oxidované base v DNA mohou být při replikaci zaměněny za jiné, přispívá oxidační poškození i ke vzniku mutací a v konečném důsledku k evoluci života.

Fosilní doklady i biochemické uspořádání organismů naznačují, že život vznikl a dlouhou dobu se vyvíjel v prostředí prakticky neobsahujícím molekulární kyslík. Jednou z nejpřevratnějších biochemických událostí v evoluci života bylo objevení se fotolýzy vody jakožto součásti fotosyntézy. Nahrazení relativně vzácného sulfanu všudypřítomnou vodou v roli donoru elektronů pro fotosyntézu znamenalo explozivní rozšíření sinic a také počátek masivního uvolňování kyslíku do oceánu i atmosféry. Zpočátku kyslík okamžitě spontánně reagoval s železnatými a manganatými ionty rozpuštěnými v oceánu, čemuž dnes vděčíme za existenci mimořádně hodnotných páskových sedimentárních rud těchto kovů. Později se však zásoby vhodných reduktantů vyčerpaly a hladina kyslíku v oceánu i atmosféře postupně stoupala. Přítomnost kyslíku a s ní související oxidační poškození se od té doby stali významnými činiteli ovlivňujícími evoluci, ekologii a fyziologii všech organismů na Zemi (Dowling a Simmons, 2009).

Část organismů zůstala striktními anaeroby a reagovala ústupem do anoxických nik, jako jsou hlubiny oceánů, bahno a později též útroby živočichů. Valná většina se však na přítomnost kyslíku adaptovala a dokonce ho použila ve svůj prospěch. Klíčovou roli v tom hrály těžké kovy v čele se železem. Na jedné straně se tyto esenciální biogenní prvky staly méně dostupné, protože sedimentovaly ve formě nerozpustných oxidů, na druhé straně se staly nebezpečnou pátou kolonou kyslíku v buňce. Právě těžké kovy mohou skrze oxidačně-redukční cyklování katalyzovat oxidační poškození a tato vlastnost je důležitou součástí jejich toxicity.

Je možné, že regulovaná oxidace metabolických odpadních látek a současná redukce kyslíku na vodu, které jsou podstatou dýchání, se původně vyvinuly jako antioxidační mechanismus,

který měl buňky chránit před toxickými účinky kyslíku a těžkých kovů. Postupem času se však dýchání stalo tak vydatným zdrojem energie, že zřejmě umožnilo vznik složitěji organizované eukaryotní buňky a při dalším vzrůstu koncentrace kyslíku v atmosféře i vznik mnohobuněčných organismů (Obr. 1). Existence našeho extrémně složitě a intenzivně pracujícího mozku spotřebovávajícího 20% veškerého kyslíku rozváděného krevním oběhem je tak možná pouhým vedlejším produktem nouzového řešení, jež dávným mikroorganismům umožnilo vyrovnat se s toxickým plynem, který se znenadání objevil v oceánu (Markoš, 2008).



Obr. 1: Předpokládané hladiny kyslíku v pravěké atmosféře. Dvě křivky představují horní a dolní hranici odhadu. Upraveno podle Holland, 2006.

2.2 Reaktivní kyslíkové sloučeniny

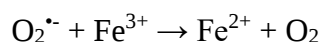
Oxidační poškození biologických molekul obvykle nezpůsobuje molekulární kyslík ve své základní tripletní formě, ale ve formě některé z takzvaných reaktivních kyslíkových sloučenin (ROS), z nichž některé jsou svou podstatou též volné radikály, tedy molekuly obsahující nespárovaný elektron. Ne všechny ROS jsou volné radikály a ne všechny volné radikály v živých organismech obsahují nespárovaný atom kyslíku. Tyto pojmy tedy není vhodné zaměňovat, i když ke vzniku volných radikálů dochází typicky v souvislosti s reakcemi iniciovanými ROS (Dröge, 2002).

2.2.1 Základní triáda reaktivních kyslíkových sloučenin

Základním a nejdůležitějším ROS v biologických systémech je superoxidový radikál-anion ($O_2^{\cdot-}$). Vzniká jedoelektronovou redukcí molekulárního kyslíku. Může být protonován na hydroperoxylový radikál ($HO_2^{\cdot}$) jež je vzhledem ke svému $pK_a = 4,88$ za fyziologických podmínek vzácný. Mezi volnými radikály patří spíše k těm stabilnějším a s menší reaktivitou. Hlavními zdroji $O_2^{\cdot-}$ v lidském těle jsou membránové komplexy mitochondriálního dýchacího řetězce, kde $O_2^{\cdot-}$ vzniká částečnou redukcí molekulárního kyslíku transportovanými elektrony především na komplexu I a komplexu III. Únik $O_2^{\cdot-}$ z reakčního centra komplexu IV (cytochrom c oxidasy) je kupodivu vzácný. Superoxid je produkován i záměrně enzymem NADPH oxidasou (EC 1.6.3.1) za spotřeby redukčního ekvivalentu NADPH. I některé další enzymatické reakce mohou produkovat $O_2^{\cdot-}$, nejznámější je oxidace hypoxanthinu enzymem xanthin oxidasou (EC 1.17.3.2). Ve vodném prostředí $O_2^{\cdot-}$ spontánně nebo za katalýzy disproportionuje na kyslík a peroxid vodíku (Phaniendra et al., 2015).

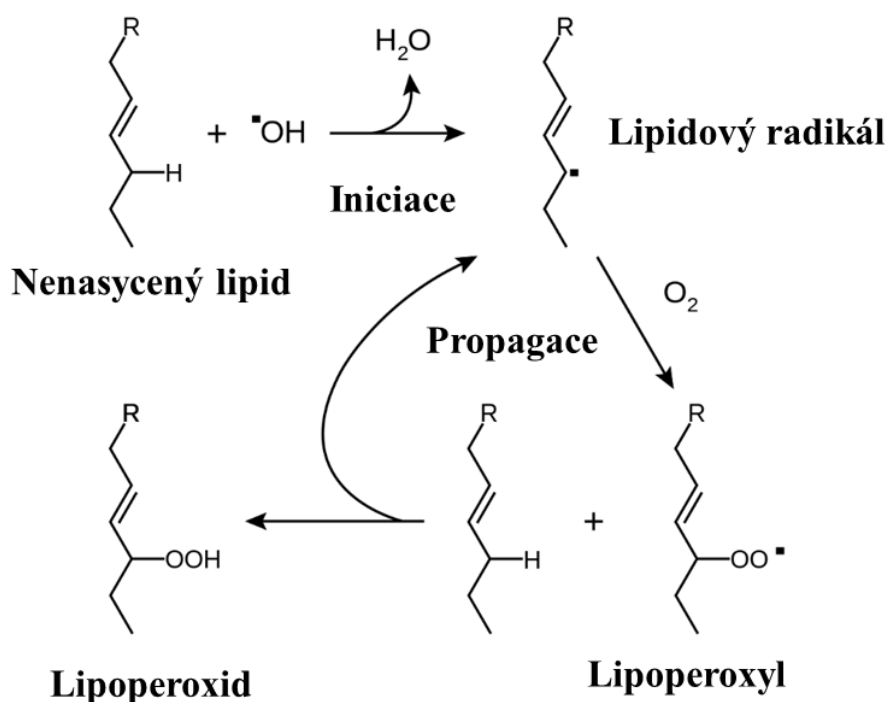
Peroxid vodíku je dalším z ROS, nejedná se však o volný radikál. Je nejstabilnějším, nejméně reaktivním a nejhojnějším ROS v biologických systémech. Může spontánně nebo za enzymové katalýzy oxidovat thiolové skupiny cysteinů a slouží i jako substrát pro řadu dalších reakcí, například jodaci tyrosinu při syntéze hormonu thyroxinu. Hlavním zdrojem H_2O_2 v buňce je disproportionace $O_2^{\cdot-}$. Dalším významným producentem H_2O_2 je enzym ER oxidoreduktasa (EC 1.8.4.X) lokalizovaný v endoplasmatickém retikulu, kde je H_2O_2 využíván jako substrát při tvorbě disulfidových můstků během sbalování proteinů (Yoboue et al., 2018). Ve specializovaných buněčných organelách, peroxisomech, vzniká H_2O_2 činností acyl-CoA oxidasy (EC 1.3.3.6) jakožto součásti alternativní β -oxidace mastných kyselin s velmi dlouhým nebo větveným řetězcem (Reddy a Hashimoto, 2001). Zde může být H_2O_2 dále využit jako substrát pro některé detoxikační reakce, například oxidaci alkoholu (Alberts et al., 2002).

V přítomnosti iontů těžkých kovů, především železa, mohou $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 podstupovat komplex reakcí včetně Haber-Weissovy reakce a Fentonovy reakce podle rovnic:



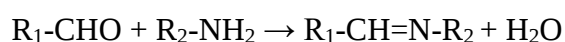
Klíčovým produktem těchto reakcí je další zástupce ROS a volných radikálů, hydroxylový radikál ($HO^{\cdot}$). Ten je extrémně nestabilní a reaktivní. Reaguje s širokým spektrem organických

molekul včetně proteinů, lipidů a DNA. Je hlavní příčinou oxidačního poškození živých organismů. Nejnebezpečnější je jeho schopnost iniciovat radikálové řetězové reakce organických molekul, které se potom samy propagují, čímž mnohonásobně zmnožují výsledné oxidační poškození (Phaniendra et al., 2015). Typickým příkladem takové řetězové reakce je peroxidace polynenasycených mastných kyselin v buněčných membránách a lipoproteinech znázorněná na Obr. 2.



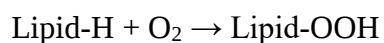
Obr. 2: Schéma řetězové reakce peroxidace lipidů. Upraveno podle Young a McEneny, 2001.

Produktem jsou lipoperoxidy a epoxidy, které podstupují další reakce, například různé přesmyky, nebo rozpad molekuly za vzniku aldehydů (malondialdehyd, akrolein, 4-hydroxynonenal). Aldehydy jsou silně elektrofilní a poměrně reaktivní takže reagují s nukleofilními skupinami v proteinech a DNA (thioly, aminy) mechanismem Michaelovy adice a také tvorbou Schiffovy báze podle rovnice:



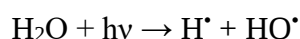
Tím dochází k dalšímu poškození biologických molekul, které nazýváme elektrofilní stres, a které na oxidační stres přímo navazuje (Young a McEneny, 2001).

Není bez zajímavosti, že lipoperoxidy jsou v buňkách produkovány i záměrně jako meziprodukty při syntéze signálních molekul, především eikosanoidů (Ježek et al., 2015). Syntéza probíhá přímou oxygenací za katalýzy enzymy ze třídy lipoxygenas (EC 1.3.11.XX) podle rovnice:



2.2.2 Exogenní zdroje oxidačního stresu

Kromě endogenních zdrojů mohou $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 a $\text{HO}^{\cdot}$ vytvářet i neméně významné zdroje vnější. V první řadě to je ionizující záření pocházející ze slunce, z radioaktivních prvků v čele s radonem, či z různých umělých zdrojů (Einor et al., 2016). Vysoká energie ionizujícího záření způsobuje radiolýzu vody za vzniku volných radikálů podle rovnice:



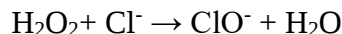
Účinky ionizujícího záření na organismus jsou tedy do značné míry zprostředkovány ROS.

Dalším zdrojem ROS pocházejícím z vnějšího prostředí jsou různé těžké kovy. Některé (Cu, Cr, Pb) se můžou účastnit oxidačně-redukčního cyklu podobného Fentonově reakci a generovat tak radikál $\text{HO}^{\cdot}$. Další (Hg, Cd, As) se vážou na nukleofilní skupiny v organických molekulách, především thiolových skupinách proteinů, čímž jednak napodobují působení ROS, a dále nepřímo zvyšují tvorbu endogenních ROS. Proto je odpověď organismu na intoxikaci těžkými kovy podobná odpovědi na oxidační stres (Sarafian et al., 1996).

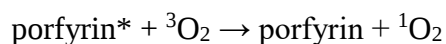
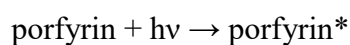
Zdrojem ROS se mohou stát i xenobiotika. Například molekuly obsahující chinonový konjugovaný systém mohou v intracelulárním prostředí cyklovat mezi oxidovaným, redukováným a semichinonovým stavem přičemž dochází k částečné redukci molekulárního kyslíku za vzniku $\text{O}_2^{\cdot-}$. Produkce ROS je závislá na interakci toxinů s různými enzymovými systémy v buňce (Bolton et al., 2000). V tomto ohledu zaujímá přední místo enzymová rodina cytochromů P450 (EC 1.14.XX.XX), která za normálních okolností katalyzuje hydroxylaci xenobiotik i některých endogenních látek (sterolů, eikosanoidů) za spotřeby molekulárního kyslíku a redukčního ekvivalentu NADPH. Některá xenobiotika však hydroxylaci nepodléhají a v průběhu katalytického cyklu místo toho dojde k tvorbě $\text{O}_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 . V tomto ohledu jsou mimořádně efektivní a tím nebezpečné polychlorované bifenylly (Zangar et al., 2004).

2.2.3 Další zdroje oxidačního stresu

Mezi ROS řadíme také chlornan, který je syntetizován enzymem myeloperoxidasou (EC 1.11.2.2) jako antimikrobiální agens v rámci imunitní odpovědi podle rovnice:

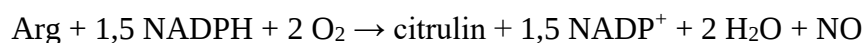


Dalším důležitým ROS je singletní kyslík ($^1\text{O}_2$), který je vůči organickým molekulám mnohem reaktivnější než „normální“ tripletní kyslík ($^3\text{O}_2$). V organismu vzniká procesem přenosu energie na $^3\text{O}_2$ označovaným jako sensibilizace. Typický pochod vedoucí ke vzniku $^1\text{O}_2$ je fotosensibilizace za účasti světla a molekuly porfyrinu podle rovnic:



Singletní kyslík v organismu reaguje s proteiny a lipidy za tvorby peroxidů a epoxidů. Vysoká koncentrace porfyrinů v krvi při vrozených metabolických poruchách, porfyriích, je kvůli tomu doprovázena nesnášenlivostí světla, které způsobuje skrze fotosensibilizaci a vznik $^1\text{O}_2$ značné oxidační poškození pokožky. Fotosensibilizační účinek má také hypericin z třezalky (*Hypericum perforatum*) a mnoho dalších látek přítomných v léčivých bylinách. Proto se nedoporučuje kombinovat pití bylinkových čajů a slunění. Tento mechanismus se používá též při fotodynamické léčbě tumorů, kdy kombinace fotosensibilizující látky a světla vyvolá cílené ničení nádorové tkáně (Abrahamse a Hamblin, 2016).

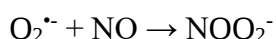
Při studiu oxidačního stresu je nezbytné vzít v potaz také reaktivní dusíkaté sloučeniny (RNS). Jejich prototypem a biologicky nejvýznamnějším zástupcem je oxid dusnatý (NO), který je zároveň možné považovat za volný radikál (Phaniendra et al., 2015). Je to poměrně málo reaktivní molekula s krátkým biologickým poločasem, která v těle funguje jako parakrinní hormon. Jeho výlev spouští vazodilataci, zlepšuje prokrvení a snižuje krevní tlak. Využívá se při léčbě ischemické choroby srdeční (nitroglycerin) a erektilní dysfunkce (sildenafil). Je syntetizován z aminokyseliny argininu enzymem NO synthasou (EC 1.14.13.39) podle rovnice:



Oxid dusnatý následně oxiduje buď spontánně nebo za katalýzy proteinem krevní plasmy, ceruloplasminem, na dusitanový a především dusičnanový anion. Tento proces může probíhat i opačně a je zdrojem základní hladiny NO v těle. Dusičnany, jejichž hlavním zdrojem je zelenina, jsou z krve velmi účinně extrahovány slinnými žlázami a následně v milimolárních

množstvích vylučovány ve slinách. V ústní dutině přicházejí do kontaktu se symbiotickými bakteriemi, které je redukují na dusitany. Ty jsou opět vstřebány trávicím traktem a v organismu redukovány na NO celou řadou oxidoreduktas. Dokladem významu této dráhy je pozorování, že pravidelné používání antibakteriální ústní vody vede k signifikantnímu nárůstu krevního tlaku (Weitzberg et al., 2010).

Oxid dusnatý je také primárním substrátem pro vznik dalších RNS. Jeho reakce s $O_2^{\cdot-}$ vede ke vzniku peroxodusitanu podle rovnice:



Peroxodusitan je vysoce reaktivní a nestabilní. Může se přeměňovat na celou řadu dalších RNS a přímo či nepřímo způsobuje oxidaci cysteinů a nitraci tyrosinů v proteinech, nitraci nenasycených mastných kyselin v lipidech, a také nitraci bází v DNA (Dröge, 2002).

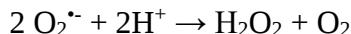
Seznam ROS, RNS, volných radikálů a elektrofilů tímto výčtem zdaleka není vyčerpán. To ale ani nebylo cílem. Podstatné je, že výše uvedené substance jsou nejběžnější, nejdůležitější a nejvíce prozkoumané, takže jejich znalost poslouží jako opora pro další výklad.

2.3 Antioxidační mechanismy

Všechny živé organismy včetně člověka a s výjimkou několika striktně anaerobních mikrobů disponují celou baterií vysoce diverzifikovaných antioxidačních mechanismů, které zneškodňují ROS a chrání proti oxidačnímu poškození. Tyto antioxidační mechanismy zahrnují specializované enzymy a nízkomolekulární sloučeniny hydrofilního i hydrofobního charakteru. Některé antioxidanty jsou přijímány potravou a jiné zase mají charakter metabolických odpadů, které před eliminací naposledy poslouží zájmům organismu. K antioxidačním mechanismům dále můžeme řadit i procesy, které před oxidačním poškozením chrání jen nepřímo, například skrze zvýšení dostupnosti redukčních ekvivalentů NADPH, či snížení chemické aktivity těžkých kovů či eliminaci xenobiotik generujících ROS. Důležité je, že až na výjimky jsou všechny komponenty antioxidační mašinerie provázány a fungují jako jeden koordinovaný celek, čímž mnohonásobně zvyšují efektivitu svého působení. V odpověď na oxidační stres je navíc vždy zesílena syntéza více souvisejících složek antioxidačního systému, často spolu s dalšími mechanismy, které opravují a odstraňují již poškozené proteiny, lipidy i DNA.

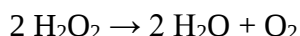
2.3.1 Antioxidační enzymy

První mezi antioxidačními enzymy je superoxiddismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), která katalyzuje disproportionaci superoxidu podle rovnice:



Objasnění její katalytické aktivity (McCord a Fridovich, 1969) je považováno za počátek biologického výzkumu ROS. U člověka obsahuje SOD ve svém aktivním místě buď ionty Zn^{2+} a Cu^{2+} , nebo ion Mn^{2+} . Je exprimována ve třech izoformách: jako cytoplasmaticky lokalizovaná SOD1 (Cu/Zn SOD), jako mitochondriálně lokalizovaná SOD2 (Mn SOD) a jako extracelulárně lokalizovaná SOD3 (Cu/Zn SOD). Z hlediska enzymové kinetiky je SOD považována za enzym s nejvyšším poměrem mezi konstantami k_2 a K_M , což v praxi znamená, že $\text{O}_2^{\cdot -}$ který uchvátí, už nepustí, a že rychlost katalýzy je limitována jen četností srážek $\text{O}_2^{\cdot -}$ a enzymu (Zelko et al., 2002). SOD je životně důležitá pro všechny aerobní organismy. Delece jakéhokoli genu pro SOD u experimentálních zvířat vede k vyšší citlivosti k oxidačnímu stresu. Delece SOD1 navíc ke zrychlenému stárnutí a delece genu pro SOD2 k smrti v neonatálním období. Nadexprese SOD nemá žádné zřetelné fyziologické účinky. Polymorfismus v genu SOD1 u člověka je silně asociován s výskytem amyotrofní laterální sklerózy (Miao a St Clair, 2009).

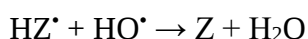
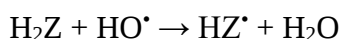
Dalším enzymem, který pro neutralizaci ROS nepotřebuje žádný nízkomolekulární ligand, je katalasa (EC 1.11.1.6), jež disproportionuje H_2O_2 podle rovnice:



Katalasa je značně populární jako kvalitativní diagnostický ukazatel a školní pomůcka díky schopnosti rozkládat poměrně koncentrované roztoky H_2O_2 za vzniku bublinek molekulárního kyslíku. Nicméně v prostředí buňky hraje významnou roli zřejmě jen v místech s velmi vysokými koncentracemi H_2O_2 jako jsou peroxisomy. Ačkoli vyniká nejvyšší známou konstantou k_2 mezi enzymy ($>10^7 \text{ s}^{-1}$), její K_M je v řádu $10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$, což ve fyziologických podmínkách znamená zoufale nízkou afinitu k substrátu. V peroxisomu však zřejmě může katalyzovat i oxidaci alkoholů, fenolů a aldehydů pomocí H_2O_2 (Alberts et al., 2002). Katalasa je jediný antioxidační enzym, jehož nadprodukce u laboratorních myší vedla ke zpomalení stárnutí a prodloužení života (Schriner et al., 2005).

2.3.2 Zhášení radikálových reakcí

Další antioxidační systémy už jsou založeny na spontánní nebo enzymově katalyzované interakci ROS s nízkomolekulárními látkami. V tomto kontextu je třeba definovat pojem zhášec (scavenger) volných radikálů. Jedná se o sloučeninu, která dokáže efektivně přecházet do formy stabilního a málo reaktivního radikálu (Huang et al., 2005). Zhášec při reakci s volným radikálem přejde do radikálového stavu a setrvá v něm do doby, než se setká s dalším volným radikálem, čímž dojde k jeho kompletní oxidaci např. podle rovnice:

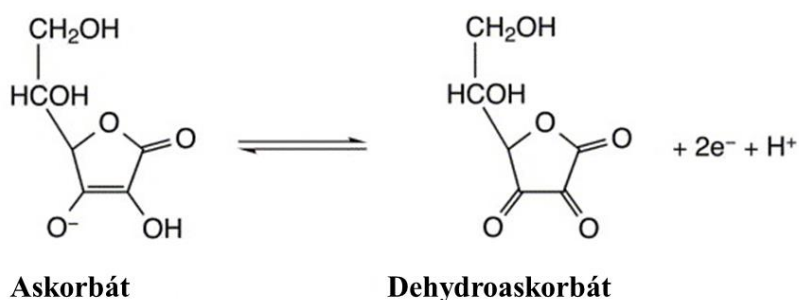


Úkolem zhášeců v buňce je eliminace volných radikálů a především terminace radikálových řetězových reakcí. Účinnost zhášeců může být dále dramaticky zvýšena jejich regenerací (redukci), což umožní mnohonásobné využití každé jejich molekuly při současné spotřebě redukčních ekvivalentů NADPH. Efektivní je též modifikace odpadních molekul metabolismu do podoby zhášeče, který je po použití vyloučen. V literatuře je pojem zhášec a antioxidant nevhodně zaměňován a dochází kvůli tomu k řadě nedorozumění. Mezi antioxidačními mechanismy aerobních organismů skutečně nalezneme celou řadu nízkomolekulárních zhášeců. To ale ještě neznamená, že všechny látky, které v *in vitro* testech vykazují vlastnosti zhášeců, se chovají skutečně antioxidačně. Záleží především na reaktivitě a stabilitě zhášeče a jeho schopnosti interagovat s dalšími komponentami antioxidačního systému. Právě díky schopnosti existovat ve stavu volného radikálu mohou některé zhášeče za určitých okolností naopak iniciovat radikálové řetězové reakce a vyvolávat oxidační poškození. Vlastnosti zhášeče má i ethanol (Trevithick et al., 1999) a celá řada flavonoidů, které se ale v prostředí organismu chovají spíše prooxidačně. Proto je pro správné pochopení jejich účinku nezbytné studovat potenciální antioxidanty vždy ve fyziologickém kontextu (McCubrey et al., 2017).

2.3.3 Nízkomolekulární zhášeče

Některé z esenciálních látek v potravě se chovají jako zhášeče. Nejznámějším zástupcem této skupiny je vitamín C, tedy askorbát. Patří mezi vitamíny rozpustné ve vodě a člověk spolu s ostatními lidoopy a morčaty patří mezi nemnoho organismů, které si ho nedovedou samy syntetizovat. Přírodním zdrojem askorbátu je především čerstvá, zamražená či kysaná zelenina, ovoce a syrové maso. Tepelná úprava zvláště v kontaktu s kovy askorbát z potravin efektivně eliminuje. V trvanlivých potravinách se askorbát přirozeně nevyskytuje, pokud do

nich není přidán jako aditivum (E300, E301). V organismu se účastní jako kofaktor oxidačně-redukčních reakcí katalyzovaných enzymovou rodinou dioxygenas závislých na 2-oxoglutarátu. Mezi nejznámější patří hydroxylace prolinu prokolagen-prolin dioxygenasou (EC 1.14.11.2) jakožto součást maturace kolagenu a demethylace 5-methylcytosinových bází v DNA TET methylcytosin dioxygenasami (EC 1.14.11.X) jakožto součást epigenetické regulace. Volný askorbát spontánně reaguje s celou řadou ROS a volných radikálů přičemž je oxidován na dehydroaskorbát (Obr. 3). Dehydroaskorbát je následně regenerován enzymem glutathion: dehydroaskorbát oxidoreduktasou (EC 1.8.5.1) za oxidace thiolové skupiny tripeptidu glutathionu (Bigley et al., 1981). Askorbát ale může sloužit i jako redukční činidlo pohánějící Fentonovu reakci a během spontánní oxidace askorbátu kyslíkem vzniká H_2O_2 . I proto je askorbát v nefyziologicky vysokých dávkách považován za čistý prooxidant. Klinické studie zatím neprokázaly žádný pozitivní vliv suplementace askorbátem na mortalitu, výskyt kardiovaskulárních chorob a rakoviny, ani na odolnost k nachlazení. Nitrožilní infuze askorbátu je experimentální léčbou některých druhů nádorových chorob (Mastrangelo et al., 2018).



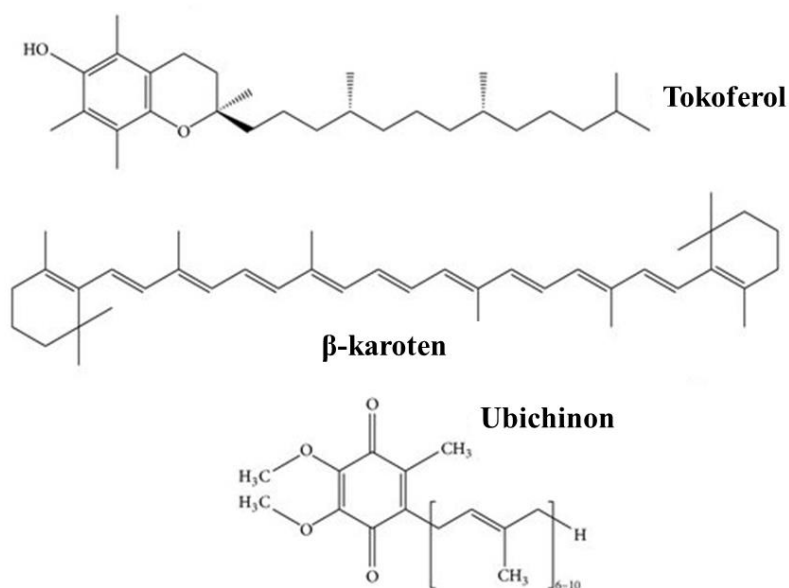
Obr. 3: Schéma oxidace askorbátu na dehydroaskorbát. Upraveno podle Rice, 2000.

Klasickým zástupcem antioxidačních vitamínů rozpustných v tucích je vitamín E, α -tokoferol (Obr. 4). Jeho hlavním zdrojem jsou tučné potraviny rostlinného i živočišného původu. V poslední době se spekuluje o možnosti, že zastává spíše signalizační funkci a jeho funkce zhášecí je zanedbatelná, ale tento pohled zatím není předmětem všeobecného konsensu (Azzi, 2007). Díky svému hydrofobnímu řetězci se koncentruje v membránách a lipidových kapénkách, kde zajišťuje terminaci lipoperoxidace reakcí s lipidovými radikály za vzniku semichinonové formy. Ta může být následně regenerována interakcí s askorbátem, ubiquinonem či glutathionem. V literatuře je možné nalézt celou řadu *in vitro* a *in vivo* publikací popisujících protektivní účinky různých tokoferolů a tokotrienolů, ale velké epidemiologické studie zatím konzistentně ukazují spíše na vyšší mortalitu a vyšší riziko rakoviny u suplementovaných jedinců (Ristow a Schmeisser, 2011). Syntetickým ve vodě rozpustným

analogem α -tokoferolu postrádajícím hydrofobní řetězec je Trolox, který je využíván jako standard při *in vitro* testování účinnosti nových zhášeců (Huang et al., 2005).

Do skupiny antioxidačních vitamínů rozpustných v tucích se trochu nepřesně řadí i široká skupina karotenoidů. Některé z nich jsou v organismu oxidačně štěpeny za vzniku vitamínu A, retinolu. Jedná se tedy o provitaminy a jejich analoga. Jejich zdrojem je především červená a zelená zelenina a některé ovoce. V našich podmínkách je dominantním karotenoidem v potravě lykopen z rajčat, rajského protlaku a kečupu, přičemž na rozdíl od β -karotenu (Obr. 4) neslouží jako prekursor retinolu. Svou strukturou se karotenoidy řadí mezi terpenoidy. Jejich molekuly jsou silně hydrofobní a disponují rozsáhlým systémem konjugovaných dvojných vazeb. Díky tomu mohou sloužit jako terminátory ale též iniciátory lipoperoxidace. Zprávy o jejich účincích obsahují značné kontroverze. Vysoké dávky karotenoidů výrazně zvyšují riziko karcinomu plic u kuřáků (Ristow a Schmeisser, 2011). Nízké dávky s žádným rizikem spojeny nejsou, ale nepřinášejí ani žádné zdravotní benefity. V *in vitro* systémech se karotenoidy samotné chovají jako prooxidanty, v kombinaci s tokoferolem jsou ale účinnější zhášecí než samotný tokoferol. Pro jejich funkci je tedy zřejmě kritický přenos radikálu na tokoferol, který efektivně funguje jen při fyziologických hladinách karotenoidů (Dao et al., 2017).

Ubichinon (Obr. 4) neboli koenzym Q₁₀ je látka podobná vitamínům, nicméně naše tělo si jej dokáže samo syntetizovat. Svou strukturou povrchně připomíná tokoferol. Svým hydrofobním polyisoprenovým ocáskem je zanořen v lipidové dvojvrstvě, zatímco jeho polární hlavička se může nacházet ve stavu chinonu, chinolu nebo semichinonového radikálu. Jeho hlavní funkcí je přenos elektronů z komplexu I a komplexu II na komplex III mitochondriálního dýchacího řetězce. Zde se hodí stabilita jeho radikálové semichinonové formy, neboť může elektrony přenášet jednotlivě. Panuje podezření, že právě ubichinon může předávat nespárovaný elektron na molekulu kyslíku a tím významně přispívat k produkci O₂^{•-} mitochondriálním dýchacím řetězcem. Ubichinon je v menším množství zastoupen i v membránách jinde v buňce, kde slouží jako terminátor lipoperoxidace. Ubisemichinon může interagovat s tokoferolem nebo být redukován na ubichinol enzymem NADPH: chinon oxidoreduktasa 1 (NQO1, EC 1.6.99.2) za spotřeby redukčního ekvivalentu NADPH. Přestože je oblíbeným potravinovým doplňkem, klinické studie nenalezly u suplementovaných jedinců žádný vliv na zdraví.



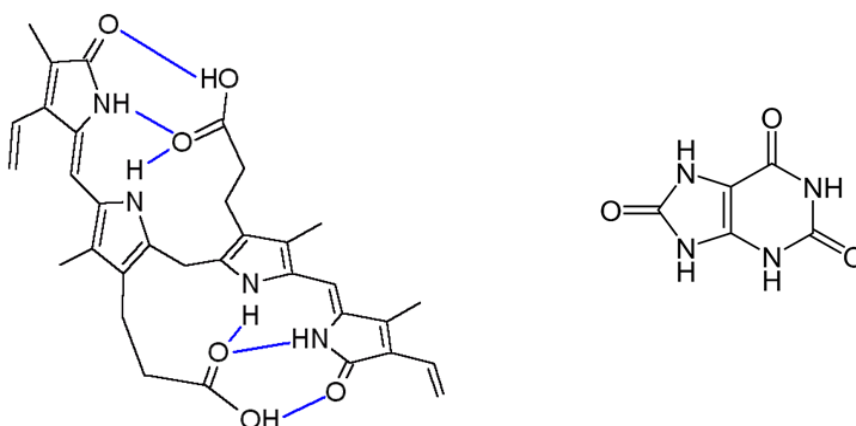
Obr. 4: Struktura tokoferolu, β -karotenu a ubichinonu. Upraveno podle Zhang, 2016.

Základní podmínkou efektivního fungování zhášeců volných radikálů je dostatečná koncentrace v místě účinku. Jejich syntéza ale stojí energii a zdroje, proto se organismu vyplatí hledat náhradní řešení, byť sebou mohou nést určitá rizika. Až do osmdesátých let dvacátého století bylo jednou ze záhad biochemie, proč lidské tělo v krevní plasmě akumuluje ve značných množstvích potenciálně nebezpečné metabolické odpady, kyselinu močovou a bilirubin, když jiní živočichové tyto sloučeniny buď vůbec neprodukují, nebo je z těla eliminují mnohem účinněji. Především díky úsilí skupiny prof. Bruce Amese se nakonec ukázalo, že oba odpady jsou velmi dobrými antioxidanty a zřejmě se svým účinkem podílejí na relativní dlouhověkosti lidoopů včetně člověka (Ames et al., 1981; Stocker et al., 1987).

Kyselina močová (Obr. 5) a její anion urát jsou produktem oxidační degradace purinových bází. Vznikají postupnou oxidací z xanthinu a hypoxanthinu enzymem xanthinoxidasou. Většina savců urát oxidačně štěpí enzymem urátokidasou na allantoin. Lidoopi tuto schopnost ztratili, a proto jim v krvi cirkuluje poměrně špatně rozpustný urát. Ten může za určitých okolností precipitovat v kloubech za vzniku bolestivé dny, nebo v močových cestách za vzniku neméně bolestivých močových kamenů. Urát je velmi účinným hydrofilním zhášecem volných radikálů a významně se podílí na antioxidační kapacitě krevní plasmy (Ames et al., 1981). Nicméně i kolem jeho působení panují určité kontroverze. Většina chronických chorob je provázána vzestupem urikémie. Zatímco někteří odborníci to považují za projev snahy organismu kompenzovat oxidační stres, který chorobu doprovází, jiní naopak považují hyperurikémii za

příčinu vzniku chronických chorob kvůli možnosti, že urát podobně jako další zlášeče může za patologických podmínek fungovat jako iniciátor radikálových reakcí (Sautin a Johnson, 2008).

Ještě zajímavějším antioxidačním odpadem je bilirubin (Obr. 5). Ten ovšem zároveň patří mezi hlavní okruhy mého zájmu, proto o něm bude podrobně pojednáno v oddíle 3.1. Na tomto místě se patří uvést, že je produktem oxidační degradace hemu enzymem hemoxygenasou (Hmox, EC 1.14.99.3) a následné redukce vznikajícího ve vodě rozpustného a málo toxického biliverdinu enzymem biliverdinreduktasou (EC 1.3.1.24) za spotřeby NADPH. Samotný bilirubin má velkou afinitu k proteinům a fosfolipidům, ale je špatně rozpustný ve vodě a tucích. V krevní plasmě je transportován navázaný na albumin, je vychytáván játry, konjugován s kyselinou glukuronovou a následně aktivně transportován do žluče. Ve trávicím traktu probíhá činnost střevních bakterií jeho dekonjugace a redukce za vzniku urobilinoidů, které dodávají charakteristické zbarvení stolici a po resorpci do krve též moči. V perinatálním období dochází k výraznému nárůstu hladin bilirubinu vlivem obměny fetálního hemoglobinu za dospělý. To může v kombinaci s dalšími podmínkami, jako je sepsa a nedonošenost vést k bilirubinové encefalopatii, která v lepším případě končí mírným kognitivním poškozením a v horším případě smrtí (Zelenka, 2004). Zajímavé je, že až na pár výjimek produkují bilirubin jen savci, zatímco ostatní živočichové vylučují biliverdin. Náklady a rizika s tím spojené jsou zřejmě bohatě vyvážené schopností bilirubinu působit jako lipofilní zlášeč volných radikálů (Stocker et al., 1987). V literatuře se uvádí, že ROS oxidují bilirubin na biliverdin, který může být opět zredukován enzymem biliverdinreduktasou. Pravděpodobná je i interakce bilirubinu s dalšími zlášeči, především s tokoferolem, ubichinonem a askorbátem.

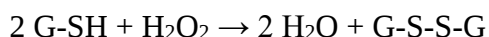


Obr. 5: Struktura bilirubinu s vyznačenými vodíkovými můstky (vlevo, vlastní práce) a struktura kyseliny močové (vpravo, volně dostupné dílo).

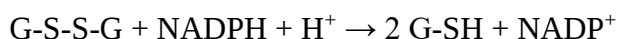
2.3.4 Thiolové antioxidanty

Klasickým cílem oxidačního poškození jsou thiolové skupiny ve volném a peptidicky vázaném cysteinu. Jejich reaktivita s ROS se liší v závislosti na prostředí, kde se zrovna nacházejí. Mohou být převedeny do stavu radikálu, nebo oxidovány na disulfidové můstky a dále přes sulfenáty a sulfináty až na sulfonáty. V organismu se vyskytují všechny oxidované formy, ale majoritní jsou disulfidy.

Reaktivita cysteinových thiolů je využita i v antioxidační ochraně organismu. Hlavním ve vodě rozpustným intracelulárním antioxidantem je tripeptid glutathion (γ -glutamylcysteinylglycin). Je syntetizován bez účasti informace kódované v nukleových kyselinách. Klíčovým krokem v jeho syntéze je vytvoření sekundární amidové vazby mezi aminoskupinou cysteinu a γ -karboxylovou skupinou glutamátu enzymem glutamát:cysteinligasou (EC 6.3.2.2) za spotřeby energetického ekvivalentu ATP. Vykonává tři hlavní úkoly: Jednak je sám o sobě velmi účinným zhášecem radikálových reakcí, dále přímo odstraňuje H_2O_2 a elektrofilu, a konečně regeneruje ostatní zhášecí včetně askorbátu, a také oxidované thioly v buněčných proteinech (Hatem et al., 2017). Jeho prototypickou reakcí je redukce H_2O_2 na vodu buď spontánně nebo za katalýzy enzymem glutathionperoxidasou (EC 1.11.1.9) podle rovnice:

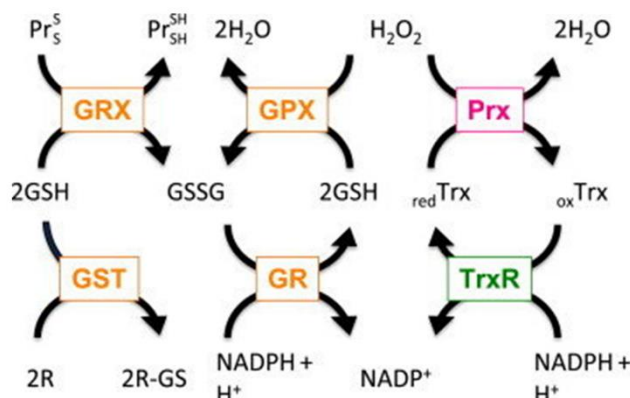


Následuje regenerace glutathion disulfidu enzymem glutathionreduktasou (EC 1.8.1.7) za spotřeby redukčního ekvivalentu NADPH podle rovnice:



V lidském organismu najdeme osm izoenzymů glutathionperoxidasy. Jednotlivé izoformy se liší svou lokalizací a substrátovou specifitou. Například izoforma 1 je intracelulární, izoforma 3 se nachází v krevní plasmě a obě jsou specifické pro peroxid vodíku. Naproti tomu izoforma 4 dokáže redukovat lipoperoxidy a nachází se v blízkosti plasmatických membrán. Izoforma 4 je jediná, jejíž úplné vyřazení je pro organismus letální. Naopak haploinsuficience u myši mírně prodlužuje střední dobu dožití (Ran et al., 2007). Některé izoformy glutathionperoxidasy též patří mezi nemnoho proteinů, které mají ve svém reakčním centru selenocystein (Mariotti et al., 2012). Pro jeho syntézu je potřeba stopový prvek selen, a proto je selen často součástí „antioxidačních“ doplňků stravy. Klinické studie však nenalezly žádný vztah mezi suplementací selenem a lidským zdravím nebo mortalitou (Ristow a Schmeisser, 2011).

S antioxidační rolí glutathionu souvisí i jeho využití jako substrátu pro obrovskou a v buňkách hojně zastoupenou rodinu enzymů glutathion-S-transferas (EC 2.5.1.18). Jejich úkolem je katalyzovat konjugaci glutathionu s různými elektrofilu endogenního i exogenního původu. Ta v optimálním případě vede k deaktivaci elektrofilu a usnadní jeho následné vyloučení močí a žlučí. Mezi substráty glutathion-S-transferas patří kromě celé řady xenobiotik i aldehydy a lipoperoxidy.



Obr. 6: Vzájemné vztahy mezi glutaredoxinem (GRX), glutathion-S-transferasou (GST), glutathionperoxidasou (GPX), glutathionreduktasou (GR), peroxiredoxinem (Prx), thioredoxinem (Trx) a thioredoxinreduktasou (TrxR). Převzato z Espinosa-Diez et al., 2015.

Další důležitý antioxidační systém založený na cysteinových thiolech sestává z rodiny enzymů peroxiredoxinů (EC 1.11.1.15) a proteinu thioredoxinu. Peroxiredoxin katalyzuje redukci ROS včetně H_2O_2 podobně jako glutathionperoxidasa, jen s tím rozdílem, že jeho substrátem je místo glutathionu protein thioredoxin. Thioredoxin je malý protein, který kromě toho, že slouží jako substrát některých enzymových reakcí, sám o sobě dokáže redukovat disulfidové můstky proteinů, čímž přechází do oxidovaného stavu. Následně je regenerován enzymem thioredoxinreduktasou (EC 1.8.1.9) za spotřeby redukčního ekvivalentu NADPH. Thioredoxinreduktasa je dalším z enzymů obsahujících ve svém aktivním místě selenocystein (Mariotti et al., 2012). Thioredoxinům jsou podobné glutaredoxiny. I zde se jedná o malé všudypřítomné proteiny, které spontánně redukují disulfidové můstky proteinů. Rozdíl je ten, že oxidované glutaredoxiny jsou regenerovány glutathionem bez potřeby enzymové katalýzy. Všechny zmíněné komponenty tohoto systému jsou v buňkách velmi hojně zastoupeny v několika izoformách a podle všeho se neúčastní jen antioxidační ochrany, ale jsou klíčové pro oxidačně-redukční signalizaci, podrobněji popsanou v kapitole 2.4 (Espinosa-Diez et al., 2015).

2.3.5 Transkripční regulace

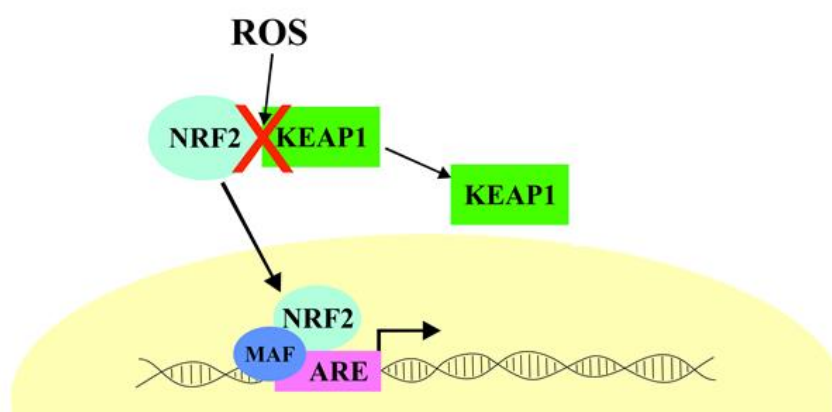
Antioxidační odpověď buňky je koordinovaně regulována i na transkripční úrovni. Syntéza antioxidačních enzymů i dalších komponent může být řízena celou řadou transkripčních faktorů, mezi nimiž prominentní místo zastává faktor s krkolomným názvem *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2). Jedná se o faktor s motivem leucinového zipu, který nasedá na DNA ve formě heterodimeru s proteiny Maf. Jeho cílem je „element antioxidační odpovědi“ (ARE), který se nalézá v promotoru několika stovek genů (Obr. 7). Mezi nimi jsou všechny klíčové geny antioxidační odpovědi kódující enzymy SOD, NQO1, Hmox a enzymy účastnící se syntézy, regenerace a funkce glutathionu. Kromě toho Nrf2 aktivuje i transkripci genů pro některé membránové transportéry a metabolické enzymy, čímž usnadňuje například syntézu glutathionu a regeneraci NADPH (Espinosa-Diez et al., 2015).

Transkripce řízená Nrf2 je výrazně stimulována v podmínkách oxidačního stresu, který je rozpoznán díky elegantnímu oxidačně-redukčnímu mechanismu její regulace. Nově syntetizovaný Nrf2 je přítomen v cytoplasmě navázán na Kelch-like ECH-associated protein-1 (Keap-1), který stimuluje jeho ubikvitinylaci a následnou degradaci v proteasomu. Represor Keap-1 obsahuje několik cysteinů s vysoce reaktivními thioley, jejichž oxidace vlivem ROS nebo kovalentní modifikace elektrofilu vede k uvolnění Nrf2, který je následně translokován do jádra, kde teprve začne stimulovat transkripci genů obsahujících ARE. Jaderná translokace Nrf2 je typicky stimulována H₂O₂, oxidem arsenitým a těžkými kovy. Genetická aktivace Nrf2 vede k vyšší rezistenci organismů k oxidačnímu poškození, radiaci, těžkým kovům a působení karcinogenů. Připisuje se jí též protizánětlivé působení a schopnost potlačit obezitu, diabetes mellitus 2. typu a aterosklerózu (da Costa et al., 2019). Induktor Nrf2 dimethylfumarát je schválen jako léčivo proti roztroušené skleróze. Zesílená transkripce řízená Nrf2 je též typická pro nádorovou tkáň, které tím uděluje větší schopnost invadovat do okolí, tvořit metastázy i odolávat chemoterapii (Zelenka et al., 2018).

Prototypickým cílem Nrf2 je izoforma 1 enzymu Hmox (Hmox-1). Zatímco izoforma Hmox-2 je konstitutivní a zajišťuje základní homeostázu hemu ve všech buňkách, gen pro Hmox-1 je vysoce inducibilní nejen skrze Nrf2 ale též v podmínkách hypoxie, teplotního šoku, zánětu a nadbytku svého substrátu, hemu. Indukce Hmox-1 má intenzivní antioxidační, antiapoptotický a protizánětlivý efekt zdokumentovaný v tisících pracích na desítkách laboratorních modelů i v celé řadě klinických studií. Enzym Hmox-1 oxidačně štěpí hem za vzniku biliverdinu, oxidu uhelnatého a volného iontu Fe²⁺. Oxid uhelnatý patří mezi plynné hormony a má výrazné

vazodilatační a protizánětlivé účinky. V nízkých koncentracích stimuluje angiogenezi. Výzkum, na němž jsem se podílel, též ukázal, že netoxické dávky oxidu uhelnatého zpomalují progresi nádorů pankreatu u experimentálních zvířat (Vítek et al., 2014). Ion Fe^{2+} je potenciálně nebezpečný katalyzátor Fentonovy reakce, ale v buňce je rychle navázán na ferritin a tím inaktivován. O významu indukce Hmox-1 v odpovědi na oxidační stres se dosud intenzivně debatuje. Předpokládá se, že v podmínkách vyšší produkce ROS je životně důležité z buňky odstranit volný a labilně vázaný hem, jehož koncentrace mohou v buňce ve stresových podmínkách narůstat, a který je též nebezpečným katalyzátorem Fentonovy reakce. V savčích buňkách hraje sekundární roli i nadprodukce žláseče bilirubinu (Ryter a Choi, 2016).

V nedávné době se ukázalo, že i Hmox-1 ovlivňuje transkripci. Série prací z laboratoře prof. Phyllis Dennery ukázala, že Hmox-1 je v podmínkách oxidačního stresu štěpena na C-terminálním konci cysteinovými proteasami a vzniklá zkrácená forma je translokována do jádra. V jádře nefunguje jako klasický transkripční faktor, ale zesiluje aktivitu některých transkripčních faktorů v čele s rodinou dimerických faktorů známých jako Aktivační protein 1 (AP-1), které jsou centrálními mediátory odpovědi buněk na stres, zánět a růstové stimuly. Další důležitou funkcí jaderné Hmox-1 je stabilizace Nrf2 v jádře, čímž je prodloužena a zesílena jeho transkripční aktivita. Navíc AP-1 i Nrf2 jsou transkripčními faktory pro Hmox-1, takže její jaderná translokace vlastně v pozitivní zpětnovazební smyčce zesiluje její vlastní transkripci (Biswas et al., 2014).



Obr. 7: Schéma aktivace transkripčního faktoru Nrf2. Upraveno podle Zelenka et al., 2018.

2.3.6 Přírodní antioxidanty

Velmi důležitou kapitolou ve výzkumu oxidačního stresu a zdrojem mnoha nadějí je obrovská skupina přírodních látek rekrutovaná vesměs ze sekundárních metabolitů rostlin, které se v *in vitro* studiích chovají jako zhášecí. Jedná se především o polyfenolové látky, například resveratrol z vinných slupek, kurkumin z kurkumy (kari), a nespočet flavonoidů, jejichž nejznámějšími zástupci jsou antokyany, kvercetin, a silymarin. Jako zhášecí se mohou chovat i konjugované dvojné vazby terpenoidů a látky obsahující síru, především allylisothiokyanát z brukvovitých rostlin a alicin z česneku. Celá řada *in vitro* a *in vivo* studií ukázala, že tyto látky mohou mít cytoprotektivní, protinádorový a protizánětlivý efekt. Výsledky klinických studií jsou zatím spíše nekonzistentní. Ekologické studie ukázaly, že konzumace ovoce, zeleniny a čaje může mít ochranný efekt proti civilizačním chorobám, ale to je pouze nepřímý důkaz. Zásadním problémem je, že tyto látky se relativně špatně vstřebávají z trávicího traktu do krevního oběhu, takže jejich maximální dosažitelné koncentrace jsou zanedbatelné v porovnání s endogenními zhášecí, které jsou navíc regenerovány specifickými enzymy. V tomto ohledu je zajímavé, že v organismu se tyto látky často chovají spíše jako zdroj ROS. Polyfenolové látky mohou podléhat oxidačně-redukčnímu cyklování, látky obsahující síru mohou elektrofilně modifikovat proteiny. Díky tomu všechny prototypické přírodní antioxidanty indukují už v nízkých hladinách transkripci řízenou Nrf2/Hmox-1. Je tedy možné, že jejich potenciálně pozitivní účinky jsou spíš důsledkem zesílení endogenní antioxidační odpovědi a nikoliv jejich vlastního zhášecího efektu (McCubrey et al., 2017; Zelenka et al., 2018).

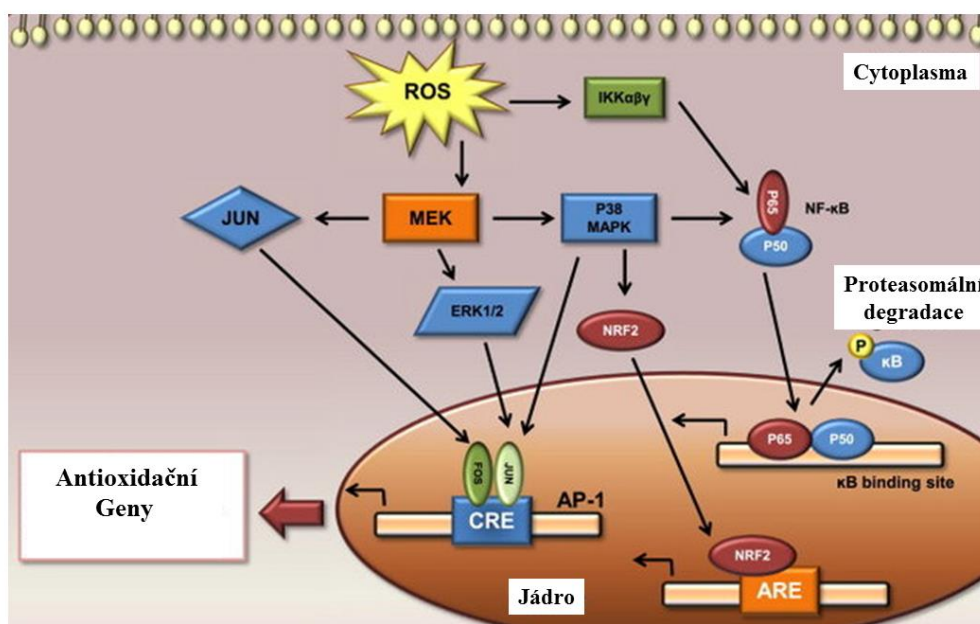
2.4 Oxidačně-redukční signalizace

Výše zmíněná regulace aktivity transkripčního faktoru Nrf2 skrze oxidační nebo elektrofilní modifikace cysteinů v represoru Keap-1 je klasickým případem situace, kdy ROS a volné radikály slouží jako signál. Malá velikost a krátký poločas činí z ROS citlivě reagujícího a rychle se šířícího posla. Hladiny ROS v buňce navíc korelují s mnoha důležitými ději, především s intenzitou metabolismu, imunitní odpovědi nebo stresu (Dröge, 2002).

Celá řada důležitých signalizačních drah v buňce je řízena nebo modifikována hladinami ROS. Koncentrace ROS je nejčastěji měřena vhodně umístěnými thiolovými skupinami cysteinů v kinasách a transkripčních faktorech. Ty mohou alostericky měnit svou aktivitu poté, co jsou jejich cysteiny oxidovány ROS nebo elektrofilně modifikovány produkty oxidace lipidů. Jednotlivé cysteiny se navíc mohou podstatně lišit svou reaktivitou a tím jemně odstupňovat nebo i obrátit význam signalizace v závislosti na druhu a koncentraci ROS nebo elektrofilu.

Důležitou roli v celé soustavě hraje opětovná regenerace těchto cysteinů pomocí glutathionu nebo systému peroxiredoxin/thioredoxin (Espinosa-Diez et al., 2015). Hovoříme proto o oxidačně-redukční (redox) signalizaci, neboť konečná rovnováha mezi oxidačně aktivovaným a redukčně inaktivovaným signálním proteinem nezáleží jen na hladině ROS, ale i na dostupnosti redukovaných thiolů v buňce. V tomto ohledu jsou důležité jak absolutní hladiny, tak i rovnováha mezi oxidovanou a redukovanou formou glutathionu a peroxiredoxinu/thioredoxinu. Ta se při oxidačním stresu posouvá ve prospěch oxidovaných komponent, ale za normálních okolností by měla být stálá. Organismus proto udržuje oxidačně-redukční homeostázu thiolových antioxidantů, která je do určité míry nezávislá na homeostáze redukčních ekvivalentů NAD^+/NADH a $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ (Forman et al., 2014).

Oxidačně-redukční signalizace je nejprobádanější u kinas a fosfatas zapojených do signalizačních kaskád, které regulují všechny klíčové děje v buňce. Prototypickým případem je rodina proteinkinas aktivovaných mitogenem (MAPK, Obr. 8). Ta skrze kaskádu fosforylací přenáší signál z receptorů na povrchu buňky až k transkripčním faktorům a reguluje děje jako proliferace, diferenciace a apoptóza. ROS působí aktivačně přinejmenším na tyto tři známé členy kaskády MAPK známé pod zkratkami Erk1/2, JNK a p38 MAPK. Výsledek je závislý na intenzitě oxidačního podnětu. Mírné zvýšení hladiny ROS stimuluje proliferaci a inhibuje apoptózu, velké zvýšení funguje opačně (Burhans a Heintz, 2009; Gào a Schöttker, 2017).



Obr. 8: Schéma signalizačních drah aktivovaných oxidačně-redukční signalizací. Upraveno podle Espinosa-Diez et al., 2015.

ROS naopak inhibují fosfatasy, které působí ve fosforylačních kaskádách jako negativní zpětná vazba. Příkladem je homolog fosfatas a tensinu (PTEN), který defosforyluje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát. PTEN skrze svou aktivitu nepřímo snižuje aktivitu důležitého signálního proteinu Akt (známého též jako proteinkinasa B), který přenáší signál od insulinového receptoru směrem ke kinasovému komplexu zvanému mechanistický cíl rapamycinu (mTOR). Ten slouží jako křižovatka signálních drah přijímající na jedné straně informace o zásobení živinami a růstovými faktory a na druhé straně stimulující proteosyntézu, růst a proliferaci buňky. V tomto případě tedy ROS opět, i když nepřímo, stimulují aktivitu Akt a mTOR a tím i proliferaci buněk.

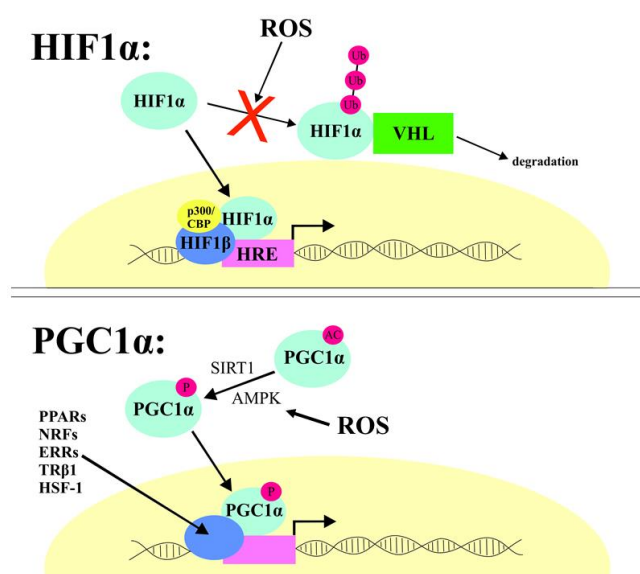
Oxidačně-redukčním mechanismem jsou modulovány i aktivity transkripčních faktorů a enzymů. Významným příkladem je transkripční komplex zvaný jaderný faktor kappa B (NFκB). Ten je, podobně jako Nrf2, za normálních okolností lokalizován v cytoplasmě v komplexu se svým represorem IκB. Pokud je IκB fosforylován, uvolňuje se a NFκB je translokován do jádra, kde řídí transkripci genů důležitých pro proliferaci, inhibici apoptózy a pro indukci imunitní odpovědi včetně zánětu. Kinasy regulující aktivitu NFκB i samotný proteinový komplex mohou být cílem ROS (Obr. 8). I v tomto případě platí, že mírné zvýšení hladin ROS působí stimulačně a extrémní zvýšení je inhibiční (Gào a Schöttker, 2017).

S imunitní odpovědí souvisí i oxidačně-redukční aktivace komplexu proteas z rodiny kaspas zvaného NLRP3 inflamatom. Ten je za normálních okolností v buňce přítomen v inaktivní formě, ale po aktivaci mitochondriálními ROS je sestaven do aktivní formy. Aktivní inflamatom funguje jako proteasa štěpící proformy cytokinů IL-1β a IL-18 na aktivní molekuly, které jsou následně exkretovány z buňky a stimulují zánět a imunitní odpověď. Role ROS je v případě imunitní odpovědi opravdu klíčová, protože transkripčním faktorem pro protein NLRP3 i pro oba cytokiny je NFκB, takže při oxidační stimulaci dochází k amplifikaci aktivity celé signální dráhy (Swanson et al., 2019).

Konečně ROS se zásadně podílejí i na signalizaci, která reguluje odpověď buňky na metabolický stres. Klíčovým zdrojem ROS jsou v tomto případě mitochondrie. Ukazuje se, že jakákoliv nerovnováha mezi vstupy a výstupy mitochondriálních respiračních komplexů, ať už se jedná o přebytek redukčního ekvivalentu NADH, nedostatek kyslíku – hypoxii, nebo příliš vysoký membránový potenciál, vede k zvýšení produkce mitochondriálních ROS. Tento signál pak v závislosti na kontextu může stimulovat dva klíčové transkripční faktory, které se účastní regulace metabolické homeostázy: Hypoxií indukovaný faktor (HIF) nebo faktor známý pod zkratkou PGC1α (Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1α).

HIF dělíme do izoform 1, 2 a 3, které ve formě heterodimeru podjednotek α a β stimulují transkripci stovek genů. Podjednotky β jsou přítomny spíše konstitutivně, podjednotky α podléhají přísné regulaci. Prototypický zástupce HIF1 α je za normálních okolností přítomen v cytoplasmě, kde dochází k hydroxylaci jeho prolinů prolylhydroxylasami za spotřeby kyslíku. Hydroxylovaný HIF1 α je rozeznán proteinem Von Hippel-Lindau, který katalyzuje jeho ubiquitinylaci a proteolytickou degradaci. V případě snížení hladiny kyslíku v buňce je omezena hydroxylace prolinů, HIF1 α je stabilizován a translokován do jádra, kde jím řízená transkripce stimuluje glykolýzu na úkor respirace, tvorbu nových cév, ale také zánět a proliferaci buněk. Z hlediska oxidačně-redukční signalizace je klíčová schopnost ROS inaktivovat katalytická centra prolylhydroxylas a tím zesilovat transkripci řízenou HIF1 α i v přítomnosti kyslíku.

Naproti tomu PGC1 α reaguje na zvýšenou potřebu respirace, například na zvýšený katabolismus mastných kyselin a laktátu a stimuluje mitochondriální biogenezi. Na rozdíl od HIF1 α je jeho působení celkově protizánětlivé a proliferaci spíše tlumí. Byl objeven jako koaktivátor rodiny transkripčních faktorů Peroxisome proliferator-activated receptor, které jsou důležité v metabolismu lipidů, a jejichž farmakologická modulace má protidiabetické a protizánětlivé účinky. Později se však ukázalo, že může tvořit aktivní komplex s celou řadou dalších faktorů, a je ve skutečnosti jedním z klíčových faktorů metabolické adaptace ve zdraví i nemoci. I v případě PGC1 α hrají ROS stimulační roli a zvyšují jeho aktivitu. Na rozdíl od HIF ale přesný mechanismus není určen. Je však známo, že aktivita PGC1 α je stimulována i Nrf2 a některými kinasami (Zelenka et al., 2018).



Obr. 9: Role ROS v aktivaci faktorů HIF1 α a PGC1 α . Upraveno podle Zelenka et al., 2018.

2.5 ROS a chronické choroby

Oxidační stres i oxidačně-redukční signalizace hrají důležitou a komplexní úlohu v patogenezi chronických neinfekčních chorob, kterým se někdy populárně říká civilizační nemoci (Ceriello a Motz, 2004). Jsou to choroby, jejichž incidence narůstá s věkem, přítomností obezity a konzumním životním stylem. V současné době představují v Česku i ve světě hlavní příčinu úmrtí a největší zátěž z hlediska zdravotních nákladů. Jejich společným činitelem je přítomnost chronického zánětu. Řadíme mezi ně především širokou skupinu kardiovaskulárních chorob, jež jsou důsledkem rozvoje aterosklerózy. Dále některé typy nádorových onemocnění, především karcinom plic, tlustého střeva, prsu, pohlavních orgánů a pankreatu. Dále diabetes mellitus 2. typu, alkoholovou i nealkoholovou steatohepatitidu, chronickou obstrukční plicní nemoc, osteoporózu, artrózu velkých kloubů a neurodegenerativní onemocnění. Z této palety se trochu vymykají alergie, atopie a nespecifické střevní záněty, které jsou běžnější v mladším věku, ale jinak jsou též provázeny chronickým zánětem. Velmi běžným a nebezpečným typem civilizační choroby je tzv. metabolický syndrom, kterým podle odhadů trpí třetina české populace. Jedná se o přítomnost obezity a alespoň dvou dalších rizikových faktorů, které všechny souvisejí s chronickým zánětem: vysokých hladin triacylglycerolů, nízkých hladin HDL cholesterolu, vysokého tlaku a insulinové rezistence. Osoby s metabolickým syndromem mají několikanásobně vyšší pravděpodobnost, že se u nich objeví infarkt myokardu, diabetes mellitus 2. typu, nádorové choroby a řada dalších civilizačních chorob. Jejich předpokládaná doba života je oproti zdravým jedincům kratší až o desítky let (O'Neill a O'Driscoll, 2015).

V současné době je za kritickou komponentu vzniku civilizačních chorob považován chronický zánět. Na rozdíl od akutního zánětu, který je důležitým homeostatickým mechanismem doprovázejícím regeneraci poškozené tkáně, chronický zánět probíhá s malou intenzitou a chybí u něj závěrečné rozlišení. Často se též jedná o zánět sterilní, který není indukován přítomností patogenu, ale nefyziologickým stavem vlastního organismu. Důležitými spouštěči sterilního zánětu jsou hypoxické adipocyty přeplněné tukem u obézních osob, částice popílků v bronchiolách kuřáků a jaterní buňky poškozené alkoholem. Významnou roli při vzniku a udržování chronického zánětu hrají molekulární struktury asociované s poškozením (DAMP). Důležité místo mezi DAMP zaujímají produkty oxidačního poškození biologických molekul, například oxidovaný cholesterol nebo oxidovaná mitochondriální DNA. Spuštění zánětu je řízeno faktorem NFκB a inflammasomem. Důležitým regulátorem zánětlivé signalizace je mitochondriální produkce ROS, především $O_2^{\cdot-}$. Ta je těsně propojena s produkcí $O_2^{\cdot-}$ enzymem NADPH oxidasou. Oba systémy se dosud neznámým způsobem pozitivně ovlivňují, takže vyšší

produkce ROS v mitochondriích spustí vyšší aktivitu NADPH oxidasy a naopak. NADPH oxidasa je jedním z klíčových enzymů v imunitní odpovědi. Superoxid, který vytváří, se podílí nejen na prozánětlivé oxidačně-redukční signalizaci, ale funguje i jako mikrobicidní činidlo, především po konverzi na peroxodisitan nebo chlornan. Zánět je tedy vždy doprovázen oxidačním stresem a naopak oxidační stres zvyšuje pravděpodobnost vzniku zánětu. Chronický zánět způsobuje postupnou remodelaci a ztrátu funkce zasažené tkáně, a navíc zvyšuje pravděpodobnost, že se v ní objeví nádorové bujení (Rao et al., 2018; Swanson et al., 2019).

Pro vznik nádorového bujení je potřeba prostředí podporující proliferaci buněk a mutace v jejich genomu. ROS mohou plnit obě role skrze oxidačně-redukční signalizaci a skrze oxidační poškození jaderné DNA. I u etablovaných nádorů hrají ROS důležitou roli a proto jsou jejich hladiny v nádorových buňkách obvykle vyšší, než v okolní tkáni. Vysoké hladiny ROS stimulují proliferaci a angiogenezi, ale též indukují antioxidační odpověď, čímž zvyšují odolnost rakovinných buněk, která je důležitou podmínkou pro jejich schopnost prorůst do okolní tkáně a tvořit metastázy. Právě výsev metastáz je příčinou 90% úmrtí na nádorové choroby (Hattem et al., 2017; Zelenka et al., 2018).

Pravděpodobnost vzniku většiny civilizačních chorob roste s věkem. Je to tím, že k jejich vzniku je třeba hodně času a taky tím, že stárnutí je doprovázeno postupným rozvojem chronického zánětu. Hypotéza o souvislosti mezi stárnutím a oxidačním poškozením byla vyslovena v samých počátcích výzkumu oxidačního stresu. V roce 1956 Dr. Denham Harman interpretoval vyšší hladiny markerů oxidačního poškození u stárnoucích jedinců jako důsledek celoživotního působení ROS. Předpokládal, že postupná oxidace biologických molekul je základem degenerativních změn vedoucích ke stárnutí a v konečném důsledku k růstu mortality s věkem (Harman, 1956). Založil tak názorovou linii, která předpokládala, že vyšší hladiny antioxidantů by mohly bránit oxidačnímu poškození a tím zpomalovat stárnutí a v konečném důsledku prodlužovat život. Tato hypotéza až donedávna dominovala výzkumu stárnutí a dodnes je významnou oporou farmaceutického marketingu. Během doby prošla řadou úprav, jak se vyvíjel stav poznání.

Sám Harman ji o šestnáct let později modifikoval, aby zahrnovala úlohu mitochondrií jakožto hlavního zdroje ROS v organismu a též hlavního cíle oxidačního poškození. Tento posun souvisel s nálezem morfologicky abnormálních a dysfunkčních mitochondrií ve svalové a nervové tkáni stárnoucích jedinců. Mitochondrie mají svou vlastní DNA (mtDNA), která se replikuje nezávisle na jaderné. Předpokládalo se, že blízkost respiračních komplexů jakožto zdrojů ROS a relativní nechráněnost způsobují vysokou rychlost mutageneze mtDNA, která

vede k tvorbě vadných respiračních komplexů produkujících ještě více ROS. Tím vzniká *circulus vitiosus* vedoucí ke ztrátě funkčnosti mitochondrií a zaplavení organismu ROS (Harman, 1972). Tuto hypotézu podpořily výsledky studií provedených na transgenních myších s vloženou variantou DNA polymerasy γ , které chyběla opravná funkce a zvyšovala tak míru mitochondriální mutageneze. Transgenní myši skutečně žily kratší dobu a vykazovaly některé charakteristiky lidského stárnutí, jako třeba ztrátu chlupů, vznik vrásek, úbytek leukocytů a srdeční nedostatečnost. Zajímavé je, že u tohoto modelu se nenašla vyšší míra oxidačního poškození. Nejnovější práce na toto téma však ukázala vyšší hladiny H_2O_2 ve tkáních stárnoucích transgenních myší (Logan et al., 2014).

Důležitým aktérem stárnutí jsou kmenové buňky. Stárnutí je všeobecně definováno jako úbytek funkčních buněk, především těch kmenových. Všechny ostatní projevy, tedy vyšší míra oxidačního poškození, chronický zánět, mitochondriální dysfunkce a akumulace nedegradovatelného materiálu tomu jen sekundují. S přibývajícím věkem se replikační potenciál kmenových buněk postupně vyčerpává a s vyšší frekvencí se objevují buňky nesoucí nebezpečné mutace v onkogenech a tumorových supresorech. Vyčerpané a podezřelé buňky se diferencují do buněk senescentních, které se dále nedělí, zato vysílají do okolí signály stimulující proliferaci a zánět. Mezi signální molekuly senescentních buněk patří i ROS. Cílem je zřejmě upozornit na sníženou reparační kapacitu tkáně a potenciálně nebezpečné buňky. Ve tkáních starých jedinců je množství senescentních buněk mnohonásobně vyšší než u mladých jedinců a imunitní systém je nestíhá odklízet. Jejich signalizace pak přispívá k rozvoji chronického zánětu a případně též nádorovému bujení. Signálem pro přechod do stavu senescence může být i příliš silná signalizace podporující proliferaci a mitochondriální dysfunkci, tedy následky vyšší hladiny ROS. Skutečně, kmenové buňky s defektní SOD2 přecházely do senescence mnohem rychleji (Velarde et al., 2012).

Přestože tato data zapadala přesvědčivě do konceptu hypotézy o mitochondriální příčině stárnutí, nedařilo se z ní vyvodit pozitivní důsledky. Nadexprese antioxidantních enzymů a suplementace antioxidanty nevedly u experimentálních modelů až na několik výjimek ke zpomalení stárnutí ani k prodloužení života (Schriner et al., 2005). Klinické studie hodnotící suplementaci antioxidanty na lidských dobrovolnících byly rovněž naprostým zklamáním (Ristow a Schmeisser, 2011). Objevily se též negativní výsledky. Suplementace antioxidanty vedla u myších modelů k rychlejšímu metastatickému šíření nádorů a suplementace askorbátem u sportujících lidských dobrovolníků zase smazávala pozitivní účinky fyzické aktivity (Ristow et al., 2009). Manipulace, které laboratorním modelům konzistentně prodlužovaly život a

chránily před chronickými chorobami, ovlivňovaly spíš signalizační kaskády a v hodnocení jejich vlivu na hladiny ROS se publikace rozcházely. Jednalo se především o kalorickou restrikcii, kdy byl modelům snížen příjem potravy na cca 60% normální hodnoty, a o utlumení signalizační dráhy mTOR. V obou případech byla snížena aktivita signálních drah, které jsou za normálních okolností stimulovány oxidačně-redukční signalizací a naopak posílena antioxidační odpověď. Úplně poslední verze mitochondriální teorie stárnutí tedy kalkuluje s myšlenkou, že rozhodující není oxidační poškození, ale oxidační signalizace, která je úměrná produkci ROS v mitochondriích (Barja, 2019).

Mezitím však došlo k nečekaným objevům úplně jiných mechanismů oddalujících stárnutí a prodlužujících život. Na několika různých modelech počínaje kvasinkami, přes octomilky, hlísty, až po myši bylo zaznamenáno prodloužení života a vyšší odolnost ke stresu. Společným jmenovatelem byla tentokrát vyšší produkce ROS v mitochondriích, která spouštěla stresovou odpověď. Modely byly založeny na malých dávkách mitochondriálních toxinů nebo mutacích, které jen mírně poškozovaly funkčnost mitochondrií. Kompenzační odpověď na stres v těchto modelech přebila účinek mitochondriálního poškození a vedla k výslednému pozitivnímu vlivu na zdraví. Tím připomínala jev známý toxikologům jako hormeze, kdy silná reakce organismu na mírnou zátěž (intoxikaci) zlepšuje stav organismu oproti kontrole bez zátěže. Mechanismus prodlužující život zmíněné skupině modelů byl Dr. Michaelem Ristowem nazván mitochondriální hormeze, ve zkratce mitohormeze (Ristow a Schmeisser, 2011). Hladiny ROS u těchto modelů byly tak vysoké, že je organismus interpretoval nikoliv jako signál, ale jako problém. Na druhou stranu nezpůsobovaly zásadní poškození. Odpověď v tomto případě zahrnovala třeba aktivaci faktorů Nrf2 a PGC1 α . Důležitou součástí mitohormeze je zvýšená biogeneze a kontrola kvality mitochondrií a snížená signalizace směrem k mTOR (Owusu-Ansah et al., 2013). Tím se stávají v zásadě analogické ostatním modelům s oddáleným stárnutím. Aktivace stresové odpovědi je antagonistická k signálním kaskádám, které jsou za jiných okolností stimulovány oxidačně-redukční signalizací, především těch stimulujících proliferaci a zánět. Za prototyp mitohormeze u člověka je považován sport. Ten je doprovázen oxidačním a energetickým stresem a v zásadě stimuluje podobné dráhy, jako mitohormeze u experimentálních modelů. Sport je také velmi robustní prevencí chronických chorob a sportovci žijí déle než sedavá populace (Merry a Ristow, 2016).

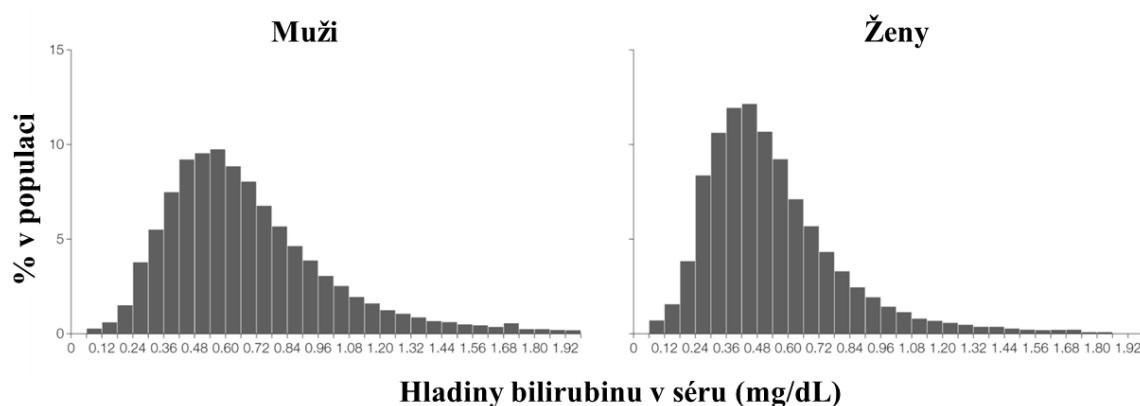
V konečném důsledku se tedy nevylučuje, že jak mitohormeze, tak snížené hladiny mitochondriálních ROS mohou prodlužovat život a chránit proti civilizačním chorobám. V obou případech je jejich signalizační účinek antagonistický k mírně zvýšeným hladinám

ROS, které jsou spouštěči chronického zánětu, mitochondriální dysfunkce a vyčerpání kmenových buněk. Bohužel, velká část české i světové populace udržuje hladinu ROS ve svých organismech právě v nebezpečné zóně mírného zvýšení. Dosahují toho kontinuálním přísunem velmi výživné stravy, sedavým životním stylem, intoxikací cigaretovým kouřem a alkoholem (Ceriello a Motz, 2004). Pomoci by jim mohla farmakologická manipulace s produkcí ROS v jejich mitochondriích. A právě hledání cesty k takové manipulaci bylo hlavní ambicí mého dosavadního výzkumu.

3 Přehled řešené problematiky

3.1 Bilirubin – od toxinu k antioxidantu

Žloutenka způsobená hromaděním bilirubinu v krvi, sklérách a podkožní tkáni je již po staletí považována za důležitý symptom jaterní nedostatečnosti. Jakmile je narušeno množství jaterního parenchymu nebo jeho energetický metabolismus, projeví se to nedostatečnou schopností bilirubin konjugovat s glukuronosylovými zbytky a následně exportovat do žluče. Bilirubin se hromadí v krvi a odtud přestupuje i do periferní tkáně. Existují i některé vrozené poruchy konjugačních a exportních mechanismů, které vedou k různě těžké žloutence bez zjevného jaterního poškození. Vedle vzácných a těžkých syndromů jako je Crigler-Najjarův a Rotorův syndrom stál donedávna v ústraní nejběžnější a nejmírnější polymorfismus v promotoru pro UDP glukuronosylasu, který spolu s dalšími dosud neodhalenými faktory způsobuje mírné zvýšení sérových hladin nekonjugovaného bilirubinu, Gilbertův syndrom, vyskytující se u zhruba 7% normální populace (Obr. 10).

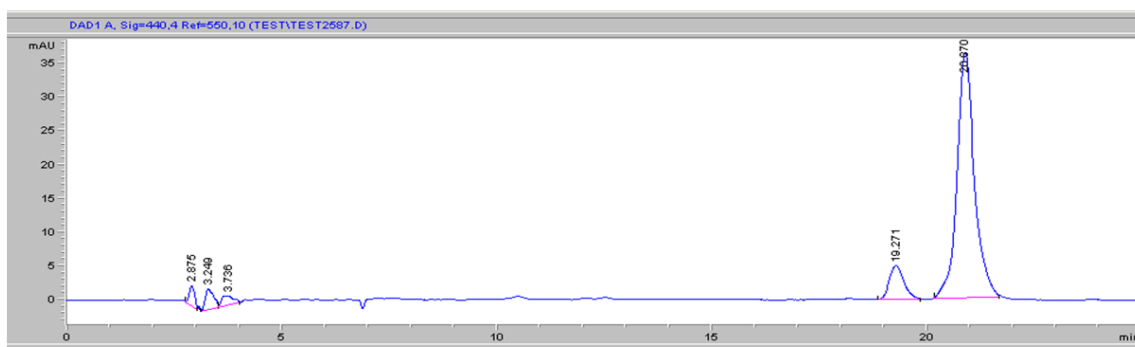


Obr. 10: Distribuce hladin bilirubinu v populaci. Za hyperbilirubinemii jsou považovány hladiny vyšší než 1 mg.dl^{-1} ($17 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Upraveno podle Horsfall et al., 2011.

V době, kdy jsem nastoupil na postgraduální studium, stále převládal názor, že bilirubin je pouze nebezpečný metabolický odpad, jehož hromadění v těle je v lepším případě nežádoucí a v horším neurotoxické, jako třeba při novorozenecké žloutence. Nicméně už se začaly objevovat i práce, které bilirubinu přisuzovaly roli antioxidantu, a můj tehdejší školitel Libor Vítek překvapivě ukázal, že lidé s Gilbertovým syndromem mají menší prevalenci aterosklerózy, tedy nejčastější příčiny invalidity a smrti na světě (Vítek et al., 2002). V té době se předpokládalo, že bilirubin se v těle vyskytuje převážně v krevní plasmě navázaný na albumin, a tam také jediné může plnit svou antioxidační funkci. V literatuře se objevovaly

názory, že reálné koncentrace bilirubinu v buňkách jsou zanedbatelné a proto jeho biologické účinky je nutné vysvětlovat pouze antioxidačním působením na lipoproteiny.

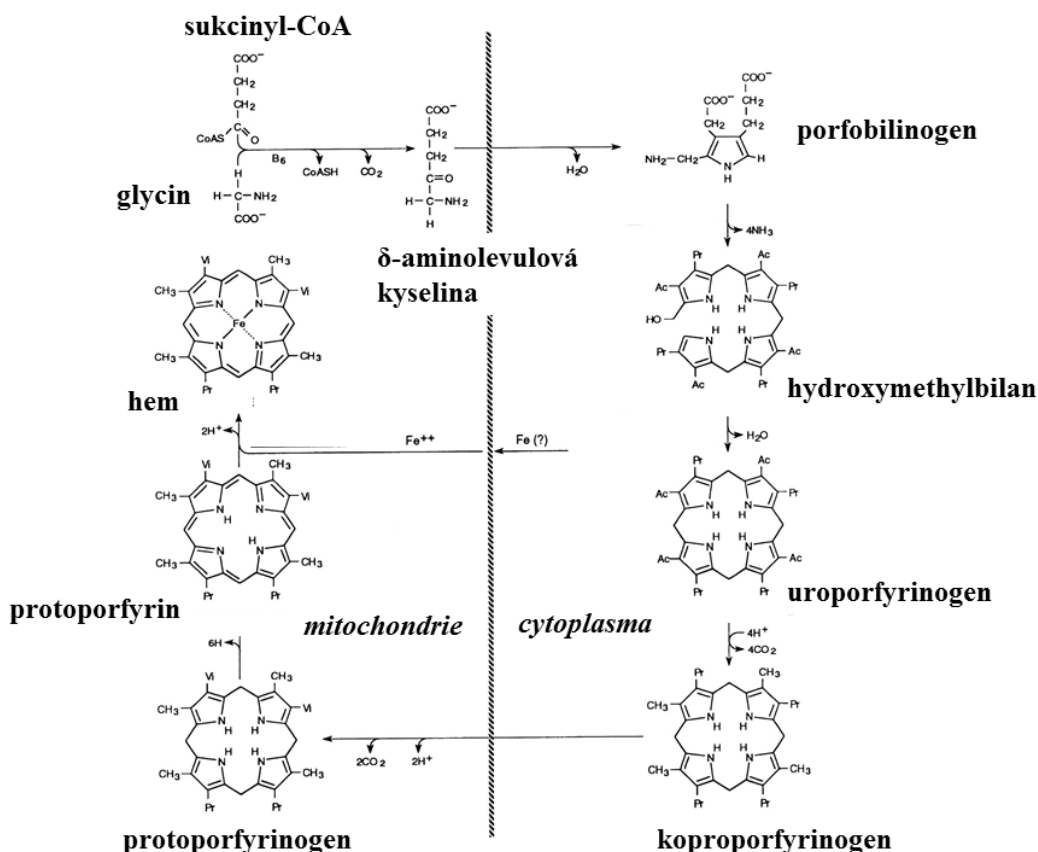
Této situaci nahrávala některá specifika bilirubinu. Vedle relativně nízkých koncentrací také extrémní nestabilita. Na světle, při pH odlišném od 7 a v přítomnosti těžkých kovů se bilirubin okamžitě oxiduje a rozpadá na nedefinovatelnou směs degradačních produktů. Ve formě kyseliny je rozpustný pouze v chloroformu a dimethylsulfoxidu, ve formě soli zase jen ve vodě. Proto v té době existovalo jen několik dosti hrubých metod jeho stanovení v séru nebo *in vitro* systémech, ale reálně žádná metoda, která by dokázala určit jeho koncentraci v buňkách a tkáních. Mým prvním úspěchem bylo zavedení právě takové metody (**Příloha 1**). Využil jsem k tomu poznatek, že bilirubin je antioxidant a také jeho specifickou dvojí rozpustnost ostře závislou na pH. Použil jsem modifikaci klasické Folchovy extrakce následovanou HPLC stanovením (Obr. 11). Touto metodou jsem poprvé stanovil koncentraci bilirubinu ve tkáních laboratorních potkanů kmene Wistar a také potkanů kmene Gunn s vrozenou hyperbilirubinemií. Ukázalo se, že koncentrace bilirubinu se mezi jednotlivými tkáněmi liší až o čtyři řády a ne vždy koreluje s hladinou v séru. Do dnešní doby byla tato metoda použita ke změření hladin bilirubinu u různých laboratorních modelů včetně potkanů a myši s novorozeneckou žloutenkou (Gazzin et al., 2012; Bortolussi et al., 2014; Bockor et al., 2017).



Obr. 11: Originál chromatogramu s píkem bilirubinu v 19 minutě a píkem vnitřního standardu mesobilirubinu ve 21 minutě.

Mým primárním zájmem však bylo antioxidační působení bilirubinu a snaha zjistit, jestli je jeho hladiny ve tkáni možné modifikovat a tím modulovat antioxidační kapacitu buněk. V té době probíhaly zásadní objevy protektivních účinků Hmox-1. Nicméně jestli může indukce Hmox-1 zvyšovat intracelulární hladiny bilirubinu zůstávalo sporné. Diskutovala se především otázka, jestli je v buňce dost hemu na to, aby mohlo vzniknout významné množství biliverdinu, a jestli vzniklý bilirubin ihned nedifunduje do krve (Sheftel et al., 2007). Moje kolegyně Lucie

Muchová tehdy zjistila, že léky statiny využívané jako kardioprotektiva indukují v srdcích potkanů Hmox-1. Já jsem změřil koncentraci bilirubinu v srdeční tkáni a ukázalo se, že u tkání s vyšší expresí Hmox-1 je signifikantně zvýšená (**Příloha 2**). Zbývalo vyřešit záhadu, odkud se bere zdroj hemu pro nadprodukci bilirubinu.



Obr. 12: Schéma syntézy hemu, upraveno podle Ponka, 1997.

Metoda fungovala i na tkáňových kulturách, a tak jsem měl možnost změřit, že indukce Hmox-1 je doprovázena zvýšením intracelulárních hladin bilirubinu, zatímco oxidační stres jeho hladiny snižuje, zřejmě skrze nevratnou oxidaci (**Příloha 3**). Co bylo klíčové, indukce Hmox-1 byla doprovázena zvýšením aktivity synthasy kyseliny δ-aminolevulové (EC 2.3.1.37), která určuje rychlost syntézy hemu (Obr. 12). Podařilo se tedy prokázat, že součástí indukce Hmox-1 skutečně je zvýšení intracelulárních hladin bilirubinu díky současné vyšší syntéze hemu. Tento jev se podařilo potvrdit i v pokusu na laboratorních potkanech se septickým šokem, který je doprovázen indukcí Hmox-1 a žloutenkou.

Naše pozornost se upřela i na žloutenku. Experimenty na tkáňových kulturách ukázaly, že za standardních podmínek koreluje intracelulární hladina bilirubinu s hladinou extracelulární. Žloutenka byla do té doby považována za pasivní vedlejší produkt jaterní dysfunkce. Naše

hypotéza byla, že se jedná o aktivní adaptivní mechanismus, kterým játra chrání periferní tkáň při oxidačním stresu. Použili jsme model oxidačního stresu způsobeného vysokými hladinami žlučových kyselin při obstrukční cholestáze. Ta je zároveň doprovázena žloutenkou. Ukázalo se, že systémové zvýšení hladin bilirubinu bylo mnohem vyšší než zvýšení v játrech a bylo doprovázeno výrazným nárůstem antioxidační kapacity krevní plasmy, zatímco v játrech byly zvýšeny ukazatele lipoperoxidace a bilirubin byl zřetelně konzumován. To nás vedlo k tvrzení, že žloutenka je adaptivní a protektivní reakcí na oxidační stres v játrech (**Příloha 4**). Tento poznatek vyvolal otázku, zda by bylo možné iatrogeně zvýšit hladiny bilirubinu v těle skrze inhibici konjugčních a exportních mechanismů a současnou indukci Hmox-1. Nejnovější příspěvek na toto téma ukazuje, že podávání některých derivátů silymarinu z Ostropestřce mariánského skutečně dokáže zvýšit tkáňové a sérové hladiny bilirubinu (Šuk et al., 2019).

3.2 Tetrapyroly a mitochondrie

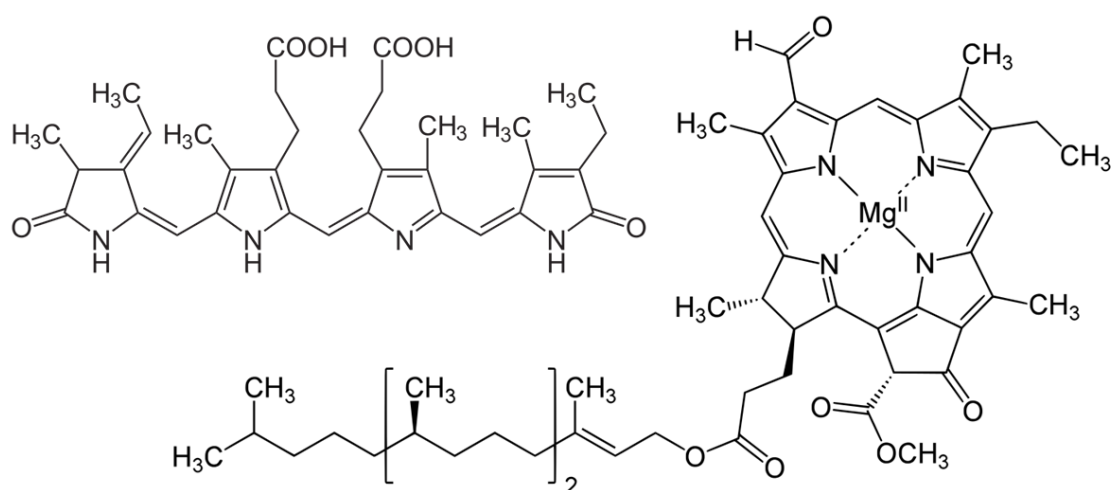
Série prvních čtyř prací pomohla ukázat, že bilirubin je skutečně aktivním a významným činitelem antioxidační obrany organismu. Jenže výsledky *in vivo* a klinických studií naznačovaly, že mezi antioxidanty zaujímá zvláštní místo. Zatímco suplementace jinými antioxidanty nevykazovala u lidí žádný efekt, nebo byla dokonce asociována s vyšší mortalitou, u bilirubinu tomu bylo úplně jinak. Vyšší hladiny bilirubinu u subjektů s Gilbertovým syndromem i v rámci přirozené variability byly silně, konzistentně a jednoznačně asociovány s nižší prevalencí aterosklerózy a incidencí jejích následků – ischemické choroby srdeční, infarktu a mrtvice. Stejně tak incidence některých druhů rakoviny byla nižší. Nižší zátěž dvěma nejčastějšími příčinami úmrtí se projevila i v nižší mortalitě subjektů s vyššími hladinami bilirubinu. Vyšší hladiny bilirubinu byly též asociovány s nižším krevním tlakem, nižší prevalencí obezity, diabetu, plicních chorob a autoimunitních chorob. Bilirubin působil též protizánětlivě a zlepšoval přežívání potkanů vystavených septickému šoku, ischemii a alogenní transplantaci (Horsfall et al., 2011; Wagner et al., 2015).

Nabízelo se, že bilirubin je více než pouhý zhášec. Využil jsem tedy svého přestupu na pracoviště zabývající se mitochondriální molekulární fyziologií a snažil se zjistit, jestli bilirubin nějak neovlivňuje mitochondriální respiraci, membránový potenciál a produkci ROS. Inspirací mi byly práce, které ukazovaly, že extrémní hladiny bilirubinu mohou snižovat membránový potenciál a inhibovat respiraci (Keshavan et al., 2004). Spolu s tehdejšími doktorandem Alešem Dvořákem jsme adaptovali řadu metodik pro použití k výzkumu bilirubinu a zjistili, že jeho popisovaný vliv na membránový potenciál a respiraci jsou artefakty. Nicméně se ukázalo, že bilirubin inhibuje produkci mitochondriálních ROS a tento jev výrazně ovlivňuje celkové

buněčné hladiny H_2O_2 i rovnováhu mezi oxidovanou a redukovanou formou glutathionu. To znamenalo významný zásah do oxidačně-redukční signalizace, který mohl vysvětlovat široké spektrum protektivních účinků bilirubinu (**Příloha 5**).

Nižší produkce mitochondriálních ROS je zároveň svatým grálem příznivců hypotézy, že stárnutí je způsobené mitochondriálními volnými radikály. Proto jsme se rozhodli porovnat stárnutí laboratorních potkanů kmene Wistar a potkanů Gunn, kteří od narození mají žloutenku. Ukázalo se, že roční a starší potkani se žloutenkou mají nižší hladiny prozánětlivých cytokinů, vyšší toleranci glukózy, méně viscerálního tuku a nižší tkáňové ukazatele buněčné senescence a mitochondriální dysfunkce. Přestože měření délky života nebylo z logistických důvodů provedeno, tyto parametry naznačují, že stárnutí u potkanů se žloutenkou bylo skutečně pomalejší, nebo přinejmenším ze zdravotního hlediska příznivější (**Příloha 5**).

Protože zánět je zásadním činitelem v patogenezi chronických chorob, rozhodli jsme se o několik let později prozkoumat rozsah protizánětlivých účinků žloutenky v plné šíři i hloubce na potkaním modelu septického šoku. Ukázali jsme, že žloutenka nesnižuje jen produkci cytokinů, ale i mobilizaci neutrofilů a poměr mezi CD4^+ a CD8^+ T-lymfocyty. Klíčovým nálezem však byla nižší míra aktivační fosforylace u faktoru $\text{NF}\kappa\text{B}$. Ta je modulována oxidačně-redukční signalizací a tak tento nálezný dále zvyšuje pravděpodobnost, že i protizánětlivé účinky bilirubinu jsou způsobeny jejím utlumením (**Příloha 6**).



Obr. 13: Struktura fykokyanobilinu a chlorofylu. Volné dílo.

Ani takto slibné výsledky nic nemění na faktu, že iatrogenní vyvolání žloutenky je a ještě nějakou dobu bude přinejmenším kontroverzní. Alternativním přístupem, jak simulovat působení bilirubinu, je podávat nějakou bezpečnou a relativně stabilní látku, která bude mít

podobné účinky. Jako vhodní kandidáti se jeví tetrapyroly zvané fykokyanobiliny nacházející se v sinicích a chlorofyl ve všech zelených částech rostlin a řas (Obr. 13). Sinice a řasy jsou součástí stravy a přírodní medicíny mnoha národů a připisují se jim kromě jiného protizánětlivé účinky, takže tyto naděje nejsou neodůvodněné.

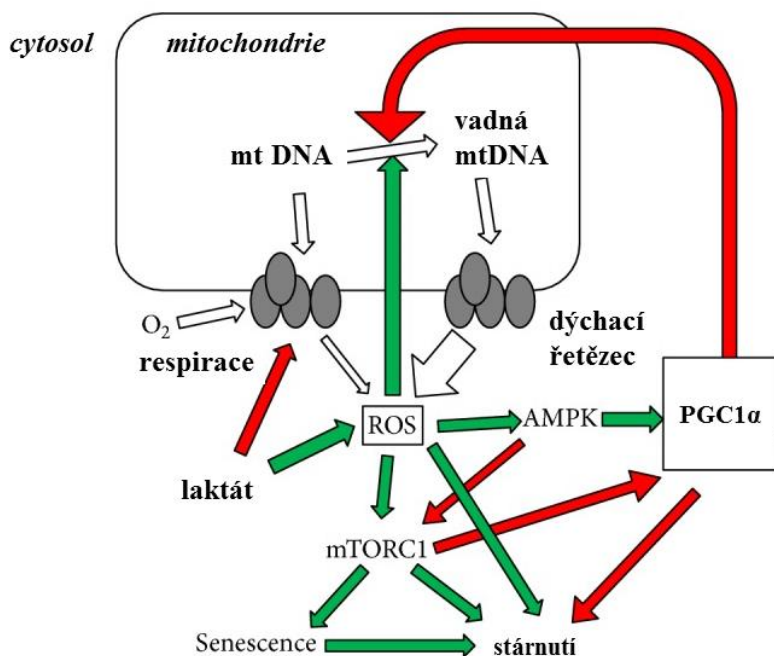
Proto jsem se s radostí podílel na výzkumu antiproliferačních účinků těchto tetrapyrolů. Ukázalo se, že fykokyanobilin i chlorofyl působí na mitochondriální produkci ROS podobně jako bilirubin a mají potenciál ovlivňovat oxidačně-redukční signalizaci. V experimentech na myších s xenotransplantovanými lidskými nádorovými buňkami způsobovaly orálně podávané extrakty ze sinic i čistý chlorofyl zpomalení růstu nádorů, což je opět v souladu s utlumením oxidačně-redukční signalizace, která vesměs stimuluje proliferaci (**Příloha 7, Příloha 8**). Atraktivita těchto výsledků spočívá ve faktu, že sinice *Spirulina* a řasa *Chlorella* jsou dostupným a oblíbeným doplňkem stravy. Otázkou samozřejmě zůstává, jestli komerčně dostupné preparáty obsahují dostatečné množství účinných tetrapyrolů.

3.3 Laktát a mitohormeze

V době před návratem na VŠCHT už mi byl známý koncept hormeze a novější mitohormeze. V analogii s velmi slibnými účinky bilirubinu jsem uvažoval, jestli by nebylo možné použít nějakou bezpečnou a pokud možno přírodní molekulu jako univerzální induktor mitohormeze, tedy jakýsi „sport v pilulce“. Při průzkumu literatury jsem narazil na pionýrskou práci ze skupiny prof. George A. Brookse, která ukazovala, že laktát zvyšuje hladiny ROS v *in vitro* kulturách svalových buněk a stimuluje mitochondriální biogenezi (Hashimoto et al., 2007). Vzhledem k tomu, že hladiny laktátu se zvyšují při tělesné námaze, hladovění a dalších formách zátěže, začal jsem o něm uvažovat jako o stresovém signálu. Podobně jako bilirubin, i laktát byl v té době vnímán jen jako pasivní produkt metabolismu, který způsobuje maximálně svalovou únavu.

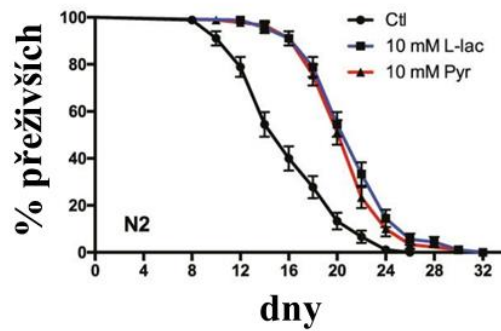
Pro zkoumání účinku laktátu jsem zvolil oblíbený *in vitro* model stárnutí, kontinuální pasážování netransformovaných kožních fibroblastů. Tyto buňky svými vlastnostmi odpovídají multipotentním kmenovým buňkám a jako takové přejdou po omezeném počtu pasáží do stavu replikační senescence, nebo u nich dojde k transformaci na nádorové buňky. Spolu s dvěma tehdejšími postgraduálními studenty jsme ukázali, že expozice laktátu skutečně zvyšuje produkci ROS v mitochondriích, ovlivňuje oxidačně-redukční rovnováhu glutathionu a ovlivňuje klíčové prvky stresové signalizace včetně faktoru PGC1 α . Dalším zajímavým zjištěním bylo, že fibroblasty vystavené pravidelným pulsům laktátu vykazovaly i ve vysoké

pasáži méně známek senescence a mitochondriální dysfunkce (**Příloha 9**). Byly tedy naplněny hlavní znaky mitohormeze a dalo se předpokládat, že samotný laktát se významně podílí na prospěšných zdravotních účincích sportu.

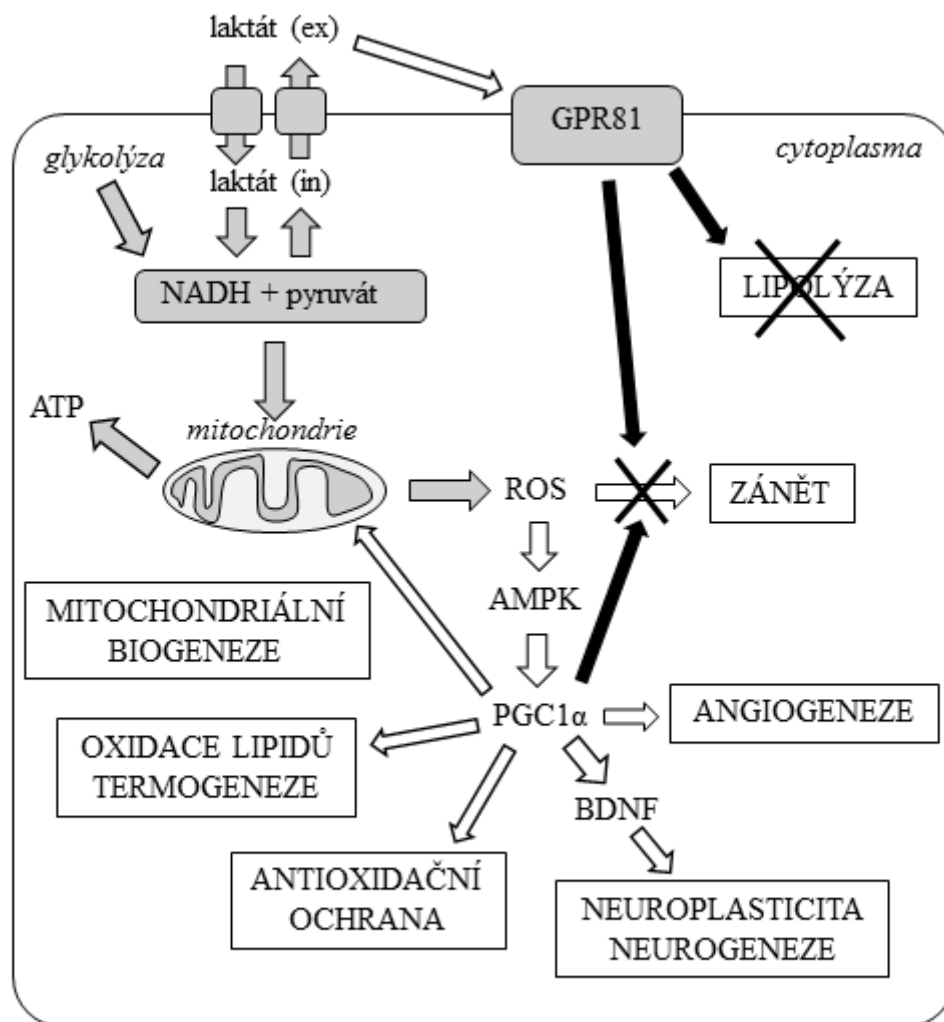


Obr. 14: Schéma signálních účinků laktátu. Bílé šipky – metabolické toky, zelené šipky – aktivující signalizace, červené šipky – inhibiční signalizace. Vlastní práce.

My sami jsme neměli přístup k technikám nezbytným pro provedení pokusu na zvířatech, takže jsme nemohli získaná data ověřit *in vivo*. Naše práce se však stala východiskem pro publikaci skupiny prof. P. J. Magistrettiho, kde pro studium účinků laktátové mitohormeze použili oblíbený *in vivo* model stárnutí, hlístice *Caenorhabditis elegans*. Ve své práci ukázali, že expozice fyziologickým hladinám laktátu prodlužovala hlísticím život a činila je odolnější k farmakologicky vyvolanému oxidačnímu stresu (Obr. 15). Kromě toho popsali výrazně neuroprotektivní účinky laktátu (Tauffenberger et al., 2019).



Obr. 15: Kaplan-Meierova křivka přežití hlístic pěstovaných za standardních podmínek (Ctl) a v prostředí laktátu (l-lac) a pyruvátu (Pyr). Upraveno podle Tauffenberger et al., 2019



Obr. 16: Schéma signálních účinků laktátu. Převzato z Příloha 10.

Po přestupu na VŠCHT mi bylo mým vedoucím Tomášem Rumlem velkoryse umožněno pokračovat ve výzkumu signalizačních a protektivních účinků laktátu. Mezitím se v literatuře začalo objevovat množství dalších prací popisujících laktát jako signální molekulu. Byl nalezen receptor pro laktát GPR81 a popsána role laktátu v indukci transkripce skrze PGC1 α . Ukázalo se, že laktát hraje roli v insulinové signalizaci, termogenezi, tvorbě a uchování paměti, angiogenezi, erytropoéze a zánětu (Obr. 16). Laktát též ovlivňuje uvolňování hormonů spouštějících stres a chuť k jídlu. Infuze hypertonického roztoku laktátu se ukazuje být velmi nadějným lékem v akutní medicíně, především při poranění hlavy a mozkové mrtvici. Tyto nejnovější poznatky jsem pro českou veřejnost shrnul v přehledovém článku (**Příloha 10**).

Jednou z důležitých oblastí, ve které zřejmě hraje laktátová signalizace klíčovou roli, je interakce mezi nádorovým mikroprostředím a agresivitou nádorových buněk. Nádory totiž obsahují vyšší hladiny laktátu než normální tkáň. Je to důsledkem tzv. metabolické transformace, kdy mitochondriální respirace nádorových buněk nestačí tempu glykolýzy (nebo pentózového cyklu) a přebytečný laktát je ve značných množstvích exportován z buňky. Ukazuje se, že hladiny laktátu v tumoru korelují s vyšší tvorbou metastáz, rezistencí k léčbě a horší prognózou pacientů. Naší hypotézou je i v tomto případě, že laktát činí nádorové buňky odolnější ke stresu skrze mechanismus mitohormeze. V současné době se spolu s doktorandkami Martinou Koncošovou a Nikolou Vrzáčkovou zabýváme možností, jak tuto signalizaci obejít a tím učinit nádorové buňky vnímavější k léčbě. Tento přístup je třeba chápat v kontextu komplexní role stresové a antioxidační odpovědi při vzniku a šíření nádorových onemocnění, který jsem shrnul v přehledovém článku (**Příloha 11**).

4 Závěr

Tato práce shrnuje nejzajímavější výsledky posledních patnácti let mého bádání. Prezentované publikace nepatří vždy mezi mé nejimpaktovanější nebo nejcitovanější, zato přinášejí naději na smysluplnou aplikaci v péči o lidské zdraví.

Hlavní ambicí bylo nalézt přirozené antioxidační mechanismy, které bude možné transformovat v účinnou a bezpečnou farmakologickou prevenci civilizačních chorob.

Dva negativně vnímané metabolické odpady lidského těla, bilirubin a laktát, byly charakterizovány jako molekuly, které dokáží při bezpečných fyziologických koncentracích přirozeně vychýlit mitochondriální produkci ROS směrem od nežádoucích hodnot.

Tím byla nalezena podstata překvapivého protektivního účinku bilirubinu, jediného antioxidantu, jehož vyšší hladiny v těle prokazatelně chrání před civilizačními chorobami.

Prezentované výsledky jsou též racionálním argumentem legitimizujícím přírodní doplňky stravy založené na řasách a sinicích.

Tématika příznivých účinků laktátu se zase trefuje do rostoucího zájmu odborné i laické veřejnosti o lidský mikrobiom, jehož schopnost produkovat laktát se zřejmě účastní jeho účinků na lidské zdraví. Stejně tak je to s preferencí rekreačních sportovních disciplín ze skupiny intenzivních intervalových tréninků (HIIT, Tabata) během nichž dochází k velkému nárůstu hladin laktátu v organismu.

Celá řada otázek souvisejících se signalizačním účinkem bilirubinu a laktátu však stále ještě není dořešena. Především stále neznáme přesný molekulární mechanismus, jímž regulují produkci ROS v mitochondriích. Velkou neznámou je také efektivní způsob podání do organismu nebo alespoň do postižené oblasti.

Prezentované výsledky tedy považujeme spíš za nalezení začátku cesty, na jejímž konci by se mohl skrývat účinný a bezpečný farmakologický prostředek k prevenci civilizačních chorob.

5 Literatura

- Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J*. 2016 Feb 15;473(4):347-64. doi: 10.1042/BJ20150942.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition, New York: Garland Science; 2002.
- Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Nov;78(11):6858-62.
- Azzi A. Molecular mechanism of alpha-tocopherol action. *Free Radic Biol Med*. 2007 Jul 1;43(1):16-21.
- Barja G. Towards a unified mechanistic theory of aging. *Exp Gerontol*. 2019 Sep;124:110627. doi: 10.1016/j.exger.2019.05.016.
- Bigley R, Riddle M, Layman D, Stankova L. Human cell dehydroascorbate reductase. Kinetic and functional properties. *Biochim Biophys Acta*. 1981 May 14;659(1):15-22.
- Biswas C, Shah N, Muthu M, La P, Fernando AP, Sengupta S, Yang G, Dennery PA. Nuclear heme oxygenase-1 (HO-1) modulates subcellular distribution and activation of Nrf2, impacting metabolic and anti-oxidant defenses. *J Biol Chem*. 2014 Sep 26;289(39):26882-94. doi: 10.1074/jbc.M114.567685.
- Bockor L, Bortolussi G, Vodret S, Iaconcig A, Jašprová J, Zelenka J, Vitek L, Tiribelli C, Muro AF. Modulation of bilirubin neurotoxicity by the Abcb1 transporter in the Ugt1-/- lethal mouse model of neonatal hyperbilirubinemia. *Hum Mol Genet*. 2017 Jan 1;26(1):145-157. doi: 10.1093/hmg/ddw375.
- Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ. Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol*. 2000;13,3,135-160.
- Bortolussi G, Zentillin L, Vaníková J, Bockor L, Bellarosa C, Mancarella A, Vianello E, Tiribelli C, Giacca M, Vitek L, Muro AF. Life-long correction of hyperbilirubinemia with a neonatal liver-specific AAV-mediated gene transfer in a lethal mouse model of Crigler-Najjar Syndrome. *Hum Gene Ther*. 2014 Sep;25(9):844-55. doi: 10.1089/hum.2013.233.
- Burhans WC, Heintz NH. The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. *Free Radic Biol Med*. 2009 Nov 1;47(9):1282-93. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.026.
- Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 May;24(5):816-23.
- da Costa RM, Rodrigues D, Pereira CA, Silva JF, Alves JV, Lobato NS, Tostes RC. Nrf2 as a Potential Mediator of Cardiovascular Risk in Metabolic Diseases. *Front Pharmacol*. 2019 Apr 12;10:382. doi: 10.3389/fphar.2019.00382.

- Dao DQ, Ngo TC, Thong NM, Nam PC. Is Vitamin A an Antioxidant or a Pro-oxidant? *J Phys Chem B*. 2017 Oct 12;121(40):9348-9357. doi: 10.1021/acs.jpcc.7b07065.
- Dowling DK, Simmons LW. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proc Biol Sci*. 2009 May 22;276(1663):1737-45. doi: 10.1098/rspb.2008.1791.
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002 Jan;82(1):47-95.
- Einor D, Bonisoli-Alquati A, Costantini D, Mousseau TA, Møller AP. Ionizing radiation, antioxidant response and oxidative damage: A meta-analysis. *Sci Total Environ*. 2016 Apr 1;548-549:463-471. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.01.027.
- Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sánchez-Pérez P, Cadenas S, Lamas S. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol*. 2015 Dec;6:183-197. doi: 10.1016/j.redox.2015.07.008.
- Forman HJ, Ursini F, Maiorino M. An overview of mechanisms of redox signaling. *J Mol Cell Cardiol*. 2014 Aug;73:2-9. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.01.018.
- Gào X, Schöttker B. Reduction-oxidation pathways involved in cancer development: a systematic review of literature reviews. *Oncotarget*. 2017 Apr 16;8(31):51888-51906. doi: 10.18632/oncotarget.17128.
- Gazzin S, Zelenka J, Zdrahalova L, Konickova R, Zabetta CC, Giraudi PJ, Berengeno AL, Raseni A, Robert MC, Vitek L, Tiribelli C. Bilirubin accumulation and Cyp mRNA expression in selected brain regions of jaundiced Gunn rat pups. *Pediatr Res*. 2012 Jun;71(6):653-60. doi: 10.1038/pr.2012.23.
- Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956 Jul;11(3):298-300.
- Harman D. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc*. 1972 Apr;20(4):145-7.
- Hashimoto T, Hussien R, Oommen S, Gohil K, Brooks GA. Lactate sensitive transcription factor network in L6 cells: activation of MCT1 and mitochondrial biogenesis. *FASEB J*. 2007 Aug;21(10):2602-12.
- Hatem E, El Banna N, Huang ME. Multifaceted Roles of Glutathione and Glutathione-Based Systems in Carcinogenesis and Anticancer Drug Resistance. *Antioxid Redox Signal*. 2017 Nov 20;27(15):1217-1234. doi: 10.1089/ars.2017.7134.
- Holland HD. The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006 Jun 29;361(1470):903-15.
- Horsfall LJ, Rait G, Walters K, Swallow DM, Pereira SP, Nazareth I, Petersen I. Serum bilirubin and risk of respiratory disease and death. *JAMA*. 2011 Feb 16;305(7):691-7. doi: 10.1001/jama.2011.124.
- Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*. 2005 Mar 23;53(6):1841-56.

- Ježek J, Dlasková A, Zelenka J, Jabůrek M, Ježek P. H₂O₂-Activated Mitochondrial Phospholipase iPLA₂γ Prevents Lipotoxic Oxidative Stress in Synergy with UCP2, Amplifies Signaling via G-Protein-Coupled Receptor GPR40, and Regulates Insulin Secretion in Pancreatic β-Cells. *Antioxid Redox Signal*. 2015 Oct 20;23(12):958-72. doi: 10.1089/ars.2014.6195.
- Keshavan P, Schwemberger SJ, Smith DL, Babcock GF, Zucker SD. Unconjugated bilirubin induces apoptosis in colon cancer cells by triggering mitochondrial depolarization. *Int J Cancer*. 2004 Nov 10;112(3):433-45.
- Logan A, Shabalina IG, Prime TA, Rogatti S, Kalinovich AV, Hartley RC, Budd RC, Cannon B, Murphy MP. In vivo levels of mitochondrial hydrogen peroxide increase with age in mtDNA mutator mice. *Aging Cell*. 2014 Aug;13(4):765-8. doi: 10.1111/accel.12212.
- Mariotti M, Ridge PG, Zhang Y, Lobanov AV, Pringle TH, Guigo R, Hatfield DL, Gladyshev VN. Composition and evolution of the vertebrate and mammalian selenoproteomes. *PLoS One*. 2012;7(3):e33066. doi: 10.1371/journal.pone.0033066.
- Markoš A. in Něco překrásného se končí, Pokorný P., Bárta M. (eds.) Dokořán 2008.
- Mastrangelo D, Pelosi E, Castelli G, Lo-Coco F, Testa U. Mechanisms of anti-cancer effects of ascorbate: Cytotoxic activity and epigenetic modulation. *Blood Cells Mol Dis*. 2018 Mar;69:57-64. doi: 10.1016/j.bcmd.2017.09.005.
- Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med*. 2009 Aug 15;47(4):344-56. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969 Nov 25;244(22):6049-55.
- McCubrey, J.A., Lertpiriyapong, K., Steelman, L.S., Abrams, S.L., Yang, L.V., Murata, R.M., Rosalen, P.L., Scalisi, A., Neri, L.M., Cocco, L., Ratti, S., Martelli, A.M., Laidler, P., Dulinska-Litewka, J., Rakus, D., Gizak, A., Lombardi, P., Nicoletti, F., Candido, S., Libra, M., Montalto, G., Cervello, M., 2017. Effects of resveratrol, curcumin, berberine and other nutraceuticals on aging, cancer development, cancer stem cells and microRNAs. *Aging (Albany NY)* 9, 1477–1536. <http://dx.doi.org/10.18632/aging>.
- Merry TL, Ristow M. Mitohormesis in exercise training. *Free Radic Biol Med*. 2016 Sep;98:123-130. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.032.
- O'Neill S, O'Driscoll L. Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obes Rev*. 2015 Jan;16(1):1-12. doi: 10.1111/obr.12229.
- Owusu-Ansah E, Song W, Perrimon N. Muscle mitohormesis promotes longevity via systemic repression of insulin signaling. *Cell*. 2013 Oct 24;155(3):699-712. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.021.
- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem*. 2015 Jan;30(1):11-26. doi: 10.1007/s12291-014-0446-0.
- Ponka P. Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. *Blood*. 1997 Jan 1;89(1):1-25.

- Ran Q, Liang H, Ikeno Y, Qi W, Prolla TA, Roberts LJ 2nd, Wolf N, Van Remmen H, Richardson A. Reduction in glutathione peroxidase 4 increases life span through increased sensitivity to apoptosis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2007 Sep;62(9):932-42.
- Rao X, Zhong J, Brook RD, Rajagopalan S. Effect of Particulate Matter Air Pollution on Cardiovascular Oxidative Stress Pathways. *Antioxid Redox Signal*. 2018 Mar 20;28(9):797-818. doi: 10.1089/ars.2017.7394.
- Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr*. 2001;21:193-230.
- Rice ME. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci*. 2000 May;23(5):209-16.
- Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehntopf M, Stumvoll M, Kahn CR, Blüher M. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 May 26;106(21):8665-70. doi: 10.1073/pnas.0903485106.
- Ristow M, Schmeisser S. Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2011 Jul 15;51(2):327-36. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.010.
- Ryter SW, Choi AM. Targeting heme oxygenase-1 and carbon monoxide for therapeutic modulation of inflammation. *Transl Res*. 2016 Jan;167(1):7-34. doi: 10.1016/j.trsl.2015.06.011.
- Sarafian TA, Bredesen DE, Verity MA. Cellular resistance to methylmercury. *Neurotoxicology*. 1996 Spring;17(1):27-36.
- Sautin YY, Johnson RJ. Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2008 Jun;27(6):608-19. doi: 10.1080/15257770802138558.
- Schriner SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Van Remmen H, Wallace DC, Rabinovitch PS. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science*. 2005 Jun 24;308(5730):1909-11.
- Sheftel AD, Kim SF, Ponka P. Non-heme induction of heme oxygenase-1 does not alter cellular iron metabolism. *J Biol Chem*. 2007 Apr 6;282(14):10480-6.
- Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*. 1987 Feb 27;235(4792):1043-6.
- Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol*. 2019 Aug;19(8):477-489. doi: 10.1038/s41577-019-0165-0.
- Šuk J, Jašprová J, Biedermann D, Petrásková L, Valentová K, Křen V, Muchová L, Vitek L. Isolated Silymarin Flavonoids Increase Systemic and Hepatic Bilirubin Concentrations and Lower Lipoperoxidation in Mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 Feb 12;2019:6026902. doi: 10.1155/2019/6026902.

- Tauffenberger A, Fiumelli H, Almustafa S, Magistretti PJ. Lactate and pyruvate promote oxidative stress resistance through hormetic ROS signaling. *Cell Death Dis.* 2019 Sep 10;10(9):653. doi: 10.1038/s41419-019-1877-6.
- Trevithick CC, Vinson JA, Caulfeild J, Rahman F, Derksen T, Bocksch L, Hong S, Stefan A, Teufel K, Wu N, Hirst M, Trevithick JR. Is ethanol an important antioxidant in alcoholic beverages associated with risk reduction of cataract and atherosclerosis? *Redox Rep.* 1999;4(3):89-93.
- Velarde MC, Flynn JM, Day NU, Melov S, Campisi J. Mitochondrial Oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin. *Aging (Albany NY).* 2012 Jan;4(1):3-12.
- Vítek L, Jirsa M, Brodanová M, Kalab M, Marecek Z, Danzig V, Novotný L, Kotal P. Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels. *Atherosclerosis.* 2002 Feb;160(2):449-56.
- Vítek L, Gbelcová H, Muchová L, Váňová K, Zelenka J, Koníčková R, Suk J, Zadinova M, Knejzlík Z, Ahmad S, Fujisawa T, Ahmed A, Ruml T. Antiproliferative effects of carbon monoxide on pancreatic cancer. *Dig Liver Dis.* 2014 Apr;46(4):369-75. doi: 10.1016/j.dld.2013.12.007.
- Wagner KH, Wallner M, Mölzer C, Gazzin S, Bulmer AC, Tiribelli C, Vitek L. Looking to the horizon: the role of bilirubin in the development and prevention of age-related chronic diseases. *Clin Sci (Lond).* 2015 Jul;129(1):1-25. doi: 10.1042/CS20140566.
- Weitzberg E, Hezel M, Lundberg JO. Nitrate-nitrite-nitric oxide pathway: implications for anesthesiology and intensive care. *Anesthesiology.* 2010 Dec;113(6):1460-75. doi: 10.1097/ALN.0b013e3181fcf3cc.
- Yoboue ED, Sitia R, Simmen T. Redox crosstalk at endoplasmic reticulum (ER) membrane contact sites (MCS) uses toxic waste to deliver messages. *Cell Death Dis.* 2018 Feb 8;9(3):331. doi: 10.1038/s41419-017-0033-4.
- Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans.* 2001 29 (Pt 2): 358–62.
- Zangar RC, Davydov DR, Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004 Sep 15;199(3):316-31.
- Zelenka J. Izolace a identifikace bilirubinreduktasy produkované klinickým izolátem *Clostridium perfringens*. Diplomová práce, VŠCHT 2004.
- Zelenka J, Koncošová M, Ruml T. Targeting of stress response pathways in the prevention and treatment of cancer. *Biotechnol Adv.* 2018 May - Jun;36(3):583-602. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.01.007.
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.* 2002 Aug 1;33(3):337-49.

Zhang ZW, Xu XC, Liu T, Yuan S. Mitochondrion-Permeable Antioxidants to Treat ROS-Burst-Mediated Acute Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:6859523. doi: 10.1155/2016/6859523.

Přílohy

1. Highly sensitive method for quantitative determination of bilirubin in biological fluids and tissues
2. Statin treatment increases formation of carbon monoxide and bilirubin in mice a novel mechanism of in vivo antioxidant protection
3. Intracellular accumulation of bilirubin as a defense mechanism against increased oxidative stress
4. Bile acids decrease intracellular bilirubin levels in the cholestatic liver
5. Hyperbilirubinemia protects against aging-associated inflammation and metabolic deterioration
6. Hyperbilirubinemia in gunn rats is associated with decreased inflammatory response in LPS-mediated systemic inflammation
7. Anti-cancer effects of blue-green alga *Spirulina platensis*, a natural source of bilirubin-like tetrapyrrolic compounds
8. Chlorophyll-Mediated Changes in the Redox Status of Pancreatic Cancer Cells Are Associated with Its Anticancer Effects
9. L-Lactate Protects Skin Fibroblasts against Aging-Associated Mitochondrial Dysfunction via Mitohormesis
10. Kyselina mléčná jako signální molekula a její preventivní a terapeutický potenciál
11. Targeting of stress response pathways in the prevention and treatment of cancer