

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

**HYDROXYNONENAL, SYMETRICKÝ DIMETHYLARGININ –
JEJICH VÝZNAM V LIDSKÉM ORGANIZMU A PRO DIAGNOSTIKU**

AUTOR PRÁCE: ELIŠKA CHALOUPKOVÁ

VEDOUcí PRÁCE: MUDr. Vladimíra Nováková Mužáková, Ph.D.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2017

UNIVERSITY OF PARDUBICE

FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

**HYDROXYNONENAL, SYMMETRICAL DIMETHYLARGININ – THEIR
ROLE IN HUMAN ORGANISM, AND FOR DIAGNOSTICS**

AUTHOR: ELIŠKA CHALOUPKOVÁ

SUPERVISOR: MUDr. Vladimíra Nováková Mužáková, Ph.D.

BACHELOR THESIS

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Eliška Chaloupková**
Osobní číslo: **C13244**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Hydroxynonenal, symetrický dimethylarginin - jejich význam v lidském organismu a pro diagnostiku**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Seznamte se s významem hydroxynonenalu a symetrického dimethylargininu v lidském organismu (včetně jejich vzniku, výskytu, metabolismu, funkcí v organismu) a uveďte jejich úlohu v diagnostice se zaměřením na chronická zánětlivá onemocnění, např. diabetes mellitus. Proveďte literární rešerši k této problematice, při vyhledávání literárních údajů využijte databázi MEDLINE.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

MUDr. Vladimíra Mužáková, Ph.D.
Katedra biologických a biochemických věd

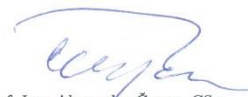
Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2015**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2016**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 15. února 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem při vypracování bakalářské práce pracovala samostatně. Veškeré literární podklady a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v níže přiloženém seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se k mé práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které k vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice

V Pardubicích dne 27. 6. 2017

.....
Eliška Chaloupková

Poděkování:

Tímto bych velmi ráda poděkovala vedoucí své bakalářské práce MUDr. Vladimíře Novákové Mužákové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a vstřícný přístup při zpracovávání této práce. Děkuji také své rodině a příteli za velkou podporu v průběhu mého studia.

Anotace

Oxidační stres vzniká v důsledku nerovnováhy mezi vznikem a odstraňováním reaktivních forem kyslíku a dusíku. Působením volných radikálů na lipidy dochází k procesu lipoperoxidace. Jako nejvýznamnější sekundární produkt vzniká 4-hydroxynonenal, který se podílí na rozvoji řady onemocnění a je považován za marker oxidačního stresu. Symetrický a asymetrický dimethylarginin vznikají methylací argininu působením enzymů ze skupiny protein-arginin-methyltransferáz a jsou degradovány pomocí enzymu dimethylarginindimethylaminohydrolázy. Oxidační stres způsobuje zvýšení exprese protein-arginin-methyltransferáz a naopak snížení aktivity dimethylarginindimethylaminohydrolázy, což vede ke zvýšení hladin asymetrického dimethylargininu. Asymetrický dimethylarginin inhibuje aktivitu syntázy oxidu dusnatého, což vede k endoteliální dysfunkci a prohlubuje oxidační stres. K nadprodukci volných radikálů dochází např. vlivem vysoké hladiny glukózy. Produkty oxidačního stresu následně přispívají k rozvoji diabetu mellitu, 4-hydroxynonenal vyvolává apoptózu β -buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu, asymetrický dimethylarginin způsobuje endoteliální dysfunkci a s ní spojené kardiovaskulární či cévní onemocnění.

Klíčová slova:

oxidační stres, volné radikály, lipoperoxidace, 4-hydroxynonenal, symetrický dimethylarginin, asymetrický dimethylarginin

Title

Hydroxynonenal, symmetrical dimethylarginin – their role in human organism, and for diagnostics

Annotation

Oxidative stress is formed from an imbalance between the formation and removal of reactive forms of oxygen and nitrogen. The effect of free radicals on lipids causes the lipoperoxidation process. The most important secondary product is 4-hydroxynonenal, which is involved in the development of many diseases and is considered a marker of oxidative stress. Symmetric and asymmetric dimethylarginine is formed by arginine methylation by enzymes from the protein-arginine-methyltransferase family and is degraded by the enzyme dimethylargininodimethylaminohydrolase. Oxidative stress causes an increase expression of protein-arginine-methyltransferase and then inhibits the activity of dimethylargininodimethylaminohydrolase, resulting in increased levels of asymmetric dimethylarginine. Asymmetric dimethylarginine inhibits the activity of nitric oxide synthase, resulting in endothelial dysfunction and increased oxidative stress. Overproduction of free radicals occurs, for example, due to high glucose levels. Oxidative stress products subsequently contribute to the development of diabetes mellitus, 4-hydroxynonenal induces apoptosis β -cells of Langerhans' pancreatic islets, asymmetric dimethylarginine causes endothelial dysfunction and with it associated cardiovascular and vascular disease.

Keywords:

Oxidative stress, free radicals, lipoperoxidation, 4-hydroxynonenal, symmetric dimethylarginine, asymmetric dimethylarginine

Obsah

Úvod.....	13
1 OXIDAČNÍ STRES.....	14
1.1 VOLNÉ RADIKÁLY.....	14
1.1.1 REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU.....	14
1.1.2 REAKTIVNÍ FORMY DUSÍKU.....	15
1.2 ANTIOXIDAČNÍ OCHRANNÝ SYSTÉM.....	17
1.3 PEROXIDACE LIPIDŮ.....	18
1.3.1 NEENZYMATICKÁ PEROXIDACE.....	18
1.3.1.1 INICIACE.....	18
1.3.1.2 PROPAGACE.....	19
1.3.1.3 TERMINACE.....	19
1.3.2 ENZYMATICKÁ PEROXIDACE.....	21
1.4 4-HYDROXYNONENAL.....	21
1.4.1 STRUKTURA 4-HYDROXYNONENALU.....	21
1.4.2 VZNIK 4-HYDROXYNONENALU.....	22
1.4.3 REAKCE MOLEKULY 4-HYDROXYNONENALU.....	22
1.4.4 FUNKCE 4-HYDROXYNONENALU.....	24
1.4.4.1 HYDROXYNONENAL JAKO SIGNÁLNÍ MOLEKULA.....	25
1.4.4.2 STRES ENDOPLAZMATICKÉHO RETIKULA.....	26
1.4.4.3 VLIV 4-HYDROXYNONENALU NA AUTOFAGII.....	27
1.4.4.4 VLIV 4-HYDROXYNONENALU NA STÁRNUTÍ BUNĚK.....	27
1.4.4.5 VLIV 4-HYDROXYNONENALU NA BUNĚČNÝ CYKLUS.....	27
1.4.5 METABOLISMUS 4-HYDROXYNONENALU.....	29
1.4.6 ÚČAST 4-HYDROXYNONENALU V PATOGENEZI RŮZNÝCH ONEMOCNĚNÍ.....	30
1.4.6.1 4-HYDROXYNONENAL, OBEZITA A METABOLICKÝ SYNDROM.....	30
1.4.6.2 4-HYDROXYNONENAL, ATEROSKLEROZA A KARDIOVASKULÁRNÍ ONEMOCNĚNÍ.....	30
1.4.6.3 4-HYDROXYNONENAL A NEURODEGENERATIVNÍ ONEMOCNĚNÍ.....	31
1.4.6.4 4-HYDROXYNONENAL A NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ.....	31
1.4.6.5 4-HYDROXYNONENAL A ZÁNĚTLIVÁ ONEMOCNĚNÍ.....	32
1.4.7 STANOVENÍ 4-HYDROXYNONENALU.....	32
1.5 VZNIK SYMETRICKÉHO A ASYMETRICKÉHO DIMETHYLARGININU.....	33
1.5.1 ODBOURÁVÁNÍ ASYMETRICKÉHO A SYMETRICKÉHO DIMETHYLARGININU.....	35
1.5.2 VÝZNAM ASYMETRICKÉHO A SYMETRICKÉHO DIMETHYLARGININU PRO ORGANISMUS.....	37
1.5.3 VLIV ASYMETRICKÉHO A SYMETRICKÉHO DIMETHYLARGININU NA SYNTÁZU OXIDU DUSNATÉHO.....	37

1.5.3.1	PŮSOBENÍ OXIDU DUSNATÉHO V ORGANISMU	38
1.5.4	ASYMETRICKÝ DIMETHYLARGININ JAKO MEDIÁTOR ENDOTELIÁLNÍ DYSFUNKCE A ATEROSKLEROZY	39
1.5.5	ASYMETRICKÝ DIMETHYLARGININ A KARDIOVASKULÁRNÍ ONEMOCNĚNÍ.....	39
1.5.5.1	ASYMETRICKÝ DIMETHYLARGININ A CÉVNÍ MOZKOVÁ PŘÍHODA.....	40
1.5.6	ASYMETRICKÝ DIMETHYLARGININ A ONEMOCNĚNÍ LEDVIN	40
1.5.7	ASYMETRICKÝ DIMETHYLARGININ A ONEMOCNĚNÍ JATER	41
1.5.8	ASYMETRICKÝ DIMETHYLARGININ A PLICNÍ HYPERTENZE	41
1.5.9	STANOVENÍ ASYMETRICKÉHO A SYMETRICKÉHO DIMETHYLARGININU	41
1.6	DIABETES MELLITUS.....	43
1.6.1	OXIDAČNÍ STRES A DIABETES MELLITUS	43
1.6.2	ZÁNĚT A DIABETES MELLITUS.....	44
1.6.3	ASYMETRICKÝ DIMETHYLARGININ V DIAGNOSTICE DIABETU MELLITU	44
Závěr	45
Zdroje	46

Seznam obrázků a tabulek

- Obrázek 1** Peroxidace lipidů
- Obrázek 2** Vznik 4-HNE z omega-6 mastných kyselin
- Obrázek 3** Struktura 4-HNE
- Obrázek 4** Reakce 4-HNE
- Obrázek 5** KEAP1-Nrf2-ARE dráha
- Obrázek 6** 4-HNE a jeho vliv na buněčný cyklus
- Obrázek 7** Metabolismus 4-HNE
- Obrázek 8** Vzorec asymetrického dimethylargininu
- Obrázek 9** Vzorec symetrického dimethylargininu
- Obrázek 10** Vzorec monomethylargininu
- Obrázek 11** Metabolismus methylargininu
- Obrázek 12** Přehled vzniku, metabolismu, transportu a vylučování ADMA a SDMA
- Obrázek 13** Chromatografická separace
-
- Tabulka 1** Přehled volných radikálů vytvořených z molekuly kyslíku
- Tabulka 2** Přehled volných radikálů vytvořených z molekuly dusíku
- Tabulka 3** Buněčné cílové struktury pro volné radikály

Seznam použitých zkratk

ADH	alkoholdehydrogenáza
ADMA	asymetrický dimethylarginin
ALDH	aldehyddehydrogenáza
CATs	transportéry kationtových kyselin
DDAH	dimethylarginindimethylaminohydrolaza
DHN	1,4-dihydroxynonen
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	enzymatická imunoanalýza
GS-HNE	glutathion-4-hydroxynonenal
GST	glutathion-S-transferáza
HNA	4-hydroxy-2-nonenová kyselina
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
MCP-1	monocytární chemotaktický protein
MDA	malondialdehyd
MMA	monomethylarginin
NADH	koenzym
NO	oxid dusnatý
NOS	syntáza oxidu dusnatého
PRMTs	enzymy ze skupiny protein-arginin-methyltransferáz
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
P53	tumor supresorový protein
RNA	ribonukleová kyselina
RNS	reaktivní formy dusíku
RONS	reaktivní formy kyslíku a dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
SDMA	symetrický dimethylarginin
TGF- β	růstový faktor beta
4-HNE	4-hydroxynonenal

Úvod

Oxidační stres přispívá ke vzniku řady onemocnění, jako např. aterosklerózy či diabetu mellitu. K jeho vzniku dochází při nerovnováze mezi tvorbou kyslíkových a dusíkových radikálů (RONS) a antioxidační ochranou organismu. Procesy související s oxidačním stresem - lipoperoxidace a methylace argininů vedou k tvorbě chemických sloučenin, které jsou pro tělo škodlivé.

Volné radikály jsou velmi reaktivní, jejich působením dochází k napadání biomolekul, jako nukleových kyselin, proteinů, ale především lipidů a dochází k jejich poškození. Primárními produkty lipoperoxidace jsou lipidové hydroperoxydy, z nichž vznikají sekundární metabolity, kdy mezi nejvýznamnější patří 4-hydroxynonenal (4-HNE). 4-HNE je důležitý bioaktivní marker peroxidace lipidů, jeho koncentrace je v krvi zvýšena při různých onemocněních spojených s oxidačním stresem.

Nadměrné množství RONS dále způsobuje zvýšení tvorby symetrického (SDMA) a asymetrického dimethylargininu (ADMA) ovlivněním enzymů ze skupiny proteinargininmethyltransferáz (PRMTs) a enzymu dimethylarginindimethylaminohydrolázy (DDAH). ADMA poté působí jako inhibitor syntázy oxidu dusnatého (NOS), což vede k endoteliální dysfunkci a následným komplikacím.

1 OXIDAČNÍ STRES

Oxidační stres vzniká v důsledku nerovnováhy mezi vznikem a odstraňováním volných radikálů (RONS), nebo-li dochází-li k porušení rovnováhy mezi tvorbou RONS a antioxidační obranou (Štípek et al., 2000). Vyšší množství RONS v těle vede k toxickému působení na buňky, které způsobuje poškození tkáně (Duan et al., 2016), a to na úrovni lipidů membrán, proteinů a DNA (Kurutas, 2016)

Nadměrná tvorba ROS bývá vyvolána např. některými metabolickými ději, uvolněním iontů železa, mědi, či dalších tranzitních prvků do oxidoredukčně aktivních forem. Dalším zdrojem radikálů je při určitých koncentracích $NO\cdot$. Jeho hladina je díky jeho rychlé difúzi do krve a reakci s oxyhemoglobinem udržována na velmi nízké hladině (Štípek et al., 2000). Při zvýšení produkce této látky však dochází k poškození buněk a tkání a vlivem vazodilatace dochází ke zvýšenému prokrvení zánětlivého ložiska. Endoteliální dysfunkce pak naopak vede k jeho zhoršené dostupnosti (Dimitroulas et al., 2012).

1.1 VOLNÉ RADIKÁLY

Jako volný radikál se označuje jakákoliv chemická entita, která obsahuje ve svém elektronovém obalu jeden nebo více nepárových elektronů. Obecně se jedná o velmi nestabilní a velmi reaktivní látky, které mají snahu doplnit si párový elektron (Asmat et al., 2016). Volný radikál může vzniknout třemi ději: přidáním elektronu k jiné molekule - redukcí, ztrátou elektronu - oxidací, či homolytickým štěpením (Štípek et al., 2000).

RONS jsou volné radikály, které vznikají jako vedlejší produkty buněčného metabolismu a ionizujícího záření (Kurutas, 2016) Samotný vznik radikálu může být iniciací pro vznik řetězce dalších reakcí, kdy radikál reaguje s molekulou, kterou přemění na radikál, čímž se radikálová reakce šíří do okolí (propaguje). Děj je ukončen po setkání dvou radikálů, kdy se nepárové elektrony spojí a vzniká molekula - proces terminace (Štípek et al., 2000).

1.1.1 REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU

Jedná se o volné radikály vytvořené z molekuly kyslíku (viz tabulka 1). Jejich největším zdrojem je respirační řetězec mitochondrií, nejprve dochází k tvorbě superoxidu a následně peroxidu vodíku.

1. Přijetím jednoho elektronu dochází k redukcí molekuly kyslíku na monoradikál superoxid: $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$. Po setkání s dalším elektronem vznikne peroxid vodíku (není radikálem), a to díky redukcí superoxidu: $O_2^{\cdot-} + e^- + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2$

2. V přítomnosti dalšího elektronu se molekula H_2O_2 rozpadne na vodu a hydroxylový radikál: $H_2O_2 + e^- \rightarrow OH^- + HO\cdot$ (nejreaktivnější z ROS). Vlivem dalšího elektronu dochází k redukci $HO\cdot$ na molekulu vody: $HO\cdot + e^- \rightarrow OH^-$

Tato čtyřelektronová redukce probíhá pomocí enzymu cytochromoxidázy. Pokud neproběhne úplná redukce O_2 na H_2O , vzniká ROS, k čemuž dojde u cca 1-4% vstupujícího kyslíku do dýchacího řetězce (Štípek et al., 2000).

3. Fentonova reakce:

Peroxid vodíku reaguje s molekulou Fe^{2+} nebo Cu^{2+} za vzniku vysoce toxického hydroxylového radikálu $HO\cdot$: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + HO\cdot$ (Kurutas, 2016)

Fentonovou reakcí tedy vzniká z peroxidu vodíku hydroxylový radikál, který je vysoce toxický a v živé hmotě reaguje s okolními biomolekulami. Oxiduje polynenasycené mastné kyseliny (PUFA), hydroxyluje aminokyseliny a báze nukleových kyselin.

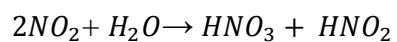
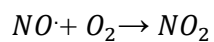
Tranzitní kovy (Fe^{2+}, Cu^{2+}) se významně podílí na vzniku ROS pokud nejsou vázány v bezpečných depozitních formách (Štípek et al., 2000).

Tabulka 1 Přehled volných radikálů vytvořených z molekuly kyslíku (Štípek et al., 2000).

Reaktivní formy kyslíku	
Volné radikály	Látky, které nejsou volnými radikály
Superoxid, O_2^-	Peroxid vodíku, H_2O_2
Hydroxylový radikál, $HO\cdot$	Kyselina chlorná, $HClO$
Peroxy, $ROO\cdot$	Ozon, O_3
Alkoxy, $RO\cdot$	Singletový kyslík, O_2
Hydroperoxy, HO_2	

1.1.2 REAKTIVNÍ FORMY DUSÍKU

$NO\cdot$ je molekula, která obsahuje jeden nepárový elektron – má proto povahu radikálu. Vzniká v buňkách různých tkání (Štípek et al., 2000) vlivem syntázy oxidu dusnatého (NOS), která metabolizuje arginin na citrulin a $NO\cdot$. $NO\cdot$ reaguje s vodou a kyslíkem za vzniku dusičnanů a dusitanů :



Reakcí $NO\cdot$ se superoxidem vzniká peroxydusitan: $NO\cdot + O_2 \rightarrow ONOO^-$.

Rozdělení reaktivních forem dusíku na volné radikály a látky, které nejsou volnými radikály je zobrazeno v tabulce 2 (Kurutas, 2016)

Tabulka 2 Přehled volných radikálů vytvořených z molekuly dusíku (Kurutas, 2016)

Reaktivní formy dusíku	
Volné radikály	Látky, které nejsou volnými radikály
Oxid dusnatý, $NO\cdot$	Peroxydusitan, $ONOO^-$
Oxid dusičitý, NO_2	Dusitany, NO_2^-
	Dusičnany, NO_3^-

Hlavní cílové struktury v buňkách pro volné radikály jsou především nenasycené mastné kyseliny v lipidech, proteiny či DNA (viz tabulka 3) (Štípek *et al.*, 2000).

Tabulka 3 Buněčné cílové struktury pro volné radikály (převzato ze Štípek et al., 2000).

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

1.2 ANTIOXIDAČNÍ OCHRANNÝ SYSTÉM

Antioxidační systém chrání organismus proti nadměrnému množství RONS, a to např. regulací aktivity enzymů vedoucích k tvorbě reaktivních forem či dále vychytáváním tranzitních prvků z reaktivních pozic. Další možností je zachycení a odstranění radikálů již vytvořených. Antioxidanty lze rozlišit na enzymy, na látky tvořící s RONS méně toxické produkty nebo reparační mechanismy poškozených biomolekul (fosfolipázy odstraňují poškozené mastné kyseliny z fosfolipidů, oxidačně pozměněné proteiny jsou proteolyticky rozkládané a poškozená DNA je opravována zvláštními reparačními enzymy) (Štípek et al., 2000).

Mezi nejúčinnější enzymatické antioxidanty patří glutathionperoxidáza, kataláza a superoxiddismutáza. Neenzymatické antioxidanty zahrnují např. vitamin E a C, thiolové antioxidanty, karotenoidy.

1.3 PEROXIDACE LIPIDŮ

Peroxidace lipidů je proces, kdy volné radikály napadají lipidy obsahující dvojnou vazbu mezi uhlíky, čímž dochází k poškození buněk (Ayala et al., 2014). Nejčastěji tomuto procesu podléhají PUFA, protože obsahují větší počet dvojných vazeb, mezi nimiž se nacházejí methylenové skupiny $-CH_2-$ se zvláště reaktivními vodíky, a proto podléhají peroxidaci snadněji než jiné biomolekuly (Štípek et al., 2000). PUFA mohou být rozděleny na omega-3 a omega-6 (v závislosti na poloze dvojných vazeb), mezi nejvíce zastoupené patří kyselina arachidonová, která se řadí mezi omega-6 mastné kyseliny (Csala et al., 2015). K dalším cílům peroxidační modifikace patří glykolipidy, fosfolipidy nebo cholesterol.

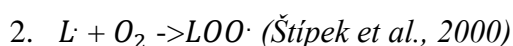
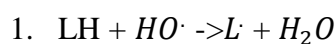
Za fyziologické peroxidace buňky přežívají působením antioxidačního obranného systému. Vysoká peroxidace však vede k apoptóze nebo nekróze, oba děje vedou k poškození buňky a usnadnění vzniku patologických stavů a urychleného stárnutí (Ayala et al., 2014). Lipoperoxidace může proběhnout neenzymovým nebo enzymovým procesem (Csala et al., 2015).

1.3.1 NEENZYMATICKÁ PEROXIDACE

Neenzymatický mechanismus peroxidace lipidů je vyvolán většinou patologickým faktorem a přináší řadu produktů, neboť se řetězec mastných kyselin štěpí na kratší produkty - etan, pentan, či toxické aldehydy - malondialdehyd (MDA) a 4-hydroxynonenal (4-HNE), které navázáním na proteiny pozměňují jejich životnost a funkci. Neenzymatický proces peroxidace zahrnuje následující fáze (obrázek 1) (Štípek et al., 2000).

1.3.1.1 INICIACE

Hydroxylový radikál $HO\cdot$, alkoxylový radikál $LO\cdot$ či peroxylový radikál $LOO\cdot$ patří mezi látky, které jsou schopny vytrhnout atom vodíku z PUFA a zahájit peroxidaci (Štípek et al., 2000). Molekula mastné kyseliny je napadána volnými radikály bez ohledu na to, zda se nachází ve volné nebo esterifikované formě (Schwarzer et al., 2015, Schaur et al., 2015) a stává se radikálem (rovnice 1). Výsledkem je, že po vytržení vodíku dochází k uspořádání elektronů v uhlíkovém řetězci tak, že vazba jednoduchá se nachází mezi dvěma dvojnými vazbami. Vzniká zbytek PUFA, který se snadno spojuje s molekulárním kyslíkem (rovnice 2) (Štípek et al., 2000).



Působením radikálu se odtrhne vodíkový atom z methylenové skupiny a z mastné skupiny se díky tomu stane radikál L (Schwarzer et al., 2015, Schaur et al., 2015).

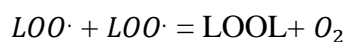
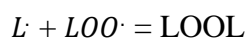
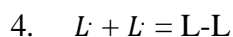
1.3.1.2 PROPAGACE

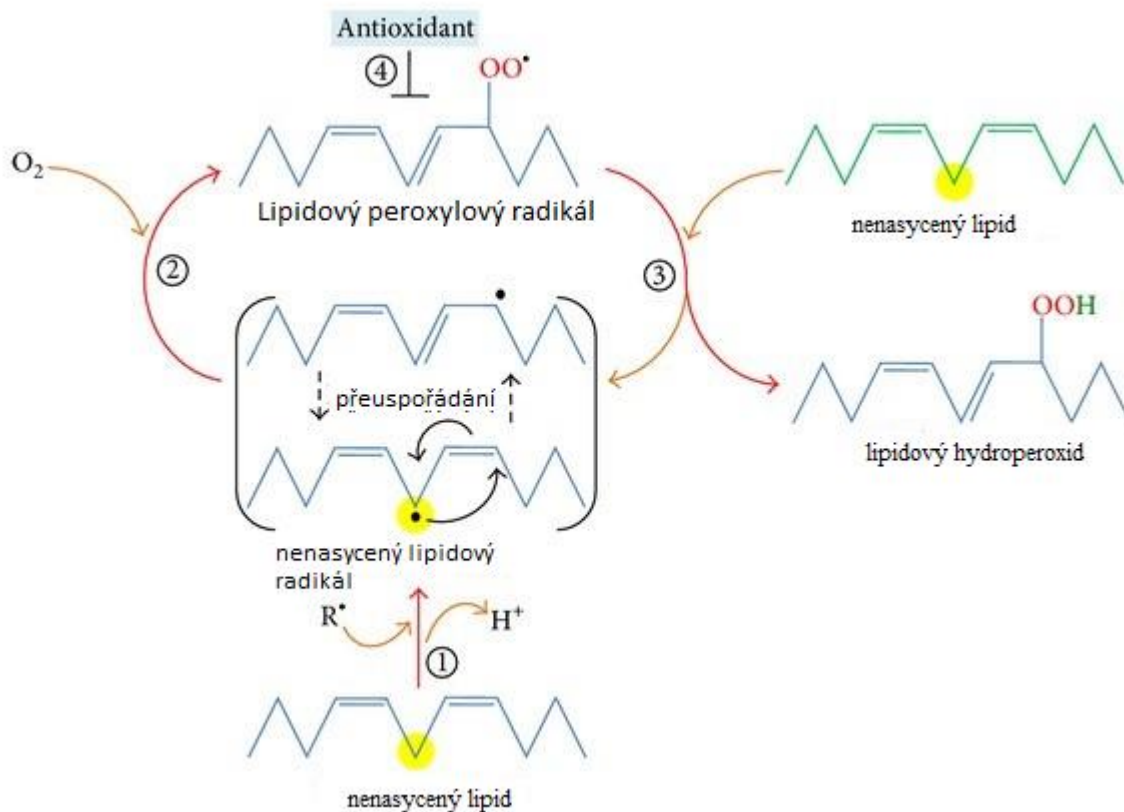
Nově vytvořený radikál polynenasycené mastné kyseliny L může stejně jako peroxylový radikál $LOO\cdot$ reagovat s jinou molekulou PUFA, a pokračovat tak v peroxidaci řetězovou reakcí (radikál opět reaguje s kyslíkem a dochází k řetězovému spotřebování kyslíku a mastných kyselin, ale také k hromadění směsi hydroxyperoxidů) (Schwarzer et al., 2015, Schaur et al., 2015). Peroxylový radikál se však může i přeměnit na lipidový hydroperoxid (rovnice 3) (Štípek et al., 2000).



1.3.1.3 TERMINACE

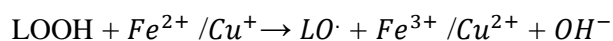
Tato fáze nastává ve chvíli, kdy se volný radikál setká s jiným radikálem nebo molekulou antioxidantu. Dojde k vytvoření stabilního produktu a propagace se ukončí (rovnice 4) (Štípek et al., 2000).



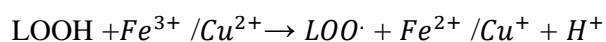


Obrázek 1 Peroxidace lipidů: Při iniciaci vzniká konjugovaný dien (krok 1). Ve fázi propagace lipidový radikál rychle reaguje s kyslíkem za vzniku lipidového peroxylového radikálu (krok 2), který odtrhává vodík z jiné lipidové molekuly (krok 3). Při ukončení reakce dochází k setkání s antioxidanty a vzniku stabilního produktu. (Ayala et al., 2014).

Ukončením procesu terminace však změny v lipidech nekončí. Výsledkem sledu reakcí jsou hydroperoxydy a cyklické peroxidy mastných kyselin, které jsou stále jen do té doby, než se setkají s tranzitními prvky katalyzujícími Fentonovu reakci a díky tomu dochází k přeměně lipidových peroxidů na alkoxylové radikály $LO\cdot$ a hydroxylový anion OH^- :



Trojmocné železo dále reaguje za vzniku peroxylového radikálu $LOO\cdot$:



Což je důvod, proč redukční látky (např. superoxid) stimulují v přítomnosti Fe^{3+} peroxidaci (Štípek et al., 2000).

1.3.2 ENZYMATICKÁ PEROXIDACE

Peroxidace lipidů v membránách může probíhat také enzymovými reakcemi. Enzymový proces probíhá na aktivních centrech hydroperoxidáz a endoperoxidáz a produkují se při něm biologicky aktivní látky - prostaglandiny a leukotrieny. Volné radikály vznikají jako meziprodukty syntáz, které jelikož jsou uvolňovány z enzymů, škodlivé nejsou (*Štípek et al., 2000*).

Nejprve dochází ke konverzi omega-6 polynenasycených mastných kyselin na jejich hydroperoxydy, a to vlivem izoenzymů lipoxygenáz (12-lipoxygenáza a 15-lipoxygenáza). 4-HNE je poté konečným produktem peroxidace především kyseliny arachidonové a linolové.

K proběhnutí enzymatické reakce za přítomnosti lipoxygenáz je však potřeba určité koncentrace hydroperoxidů vzniklé při neenzymatické lipoperoxidaci. Finálním produktem lipoxygenáz je hydroperoxid, ze kterého vzniká 4-HNE (*Riahi et al., 2010*).

1.4 4-HYDROXYNONENAL

1.4.1 STRUKTURA 4-HYDROXYNONENALU

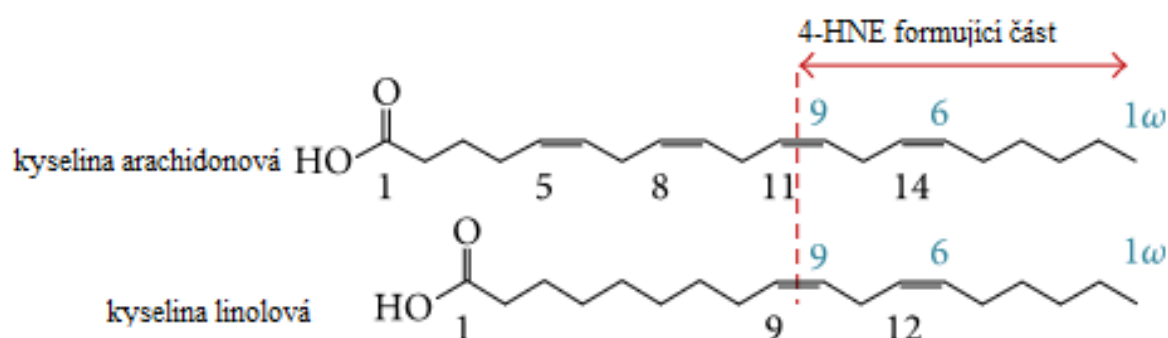
4-HNE je považován za hlavní ukazatel oxidačního stresu a nejvýznamnější konečný produkt peroxidace lipidů, a proto je v současné době považován za velmi důležitý bioaktivní marker peroxidace lipidů a molekulu se signalizačními a cytotoxickými účinky (*Ayala et al., 2014*). Podílí se na rozvoji řady onemocnění (*Csala et al., 2015*).

Jedná se o aldehyd s 9-ti uhlíky (*Schwarzer et al., 2015*) obsahující dvojnou vazbu mezi uhlíky C2 a C3, s aldehydovou skupinou na C1 a hydroxylovou skupinou na C4 (*Shoeb et al., 2014*). Skupiny nacházející se na molekule 4-HNE se liší především svými vztahy k vodě: zatímco aldehydová skupina je hydrofilní, nepolární uhlíkový řetězec od uhlíku C5 do uhlíku C9 je hydrofobní. Aldehydová skupina díky své hydrofilitě umožňuje difúzi přes membránu, vazbu na proteiny a nukleové kyseliny. Hydrofobní část molekuly 4-HNE ovlivňuje děje v membránách (*Schwarzer et al., 2015*).

1.4.2 VZNIK 4-HYDROXYNONENALU

Při peroxidaci lipidů dochází k produkci velké škály oxidačních produktů, mezi hlavní primární produkty patří lipidové hydroperoxydy (LOOH) (rovnice 3) vznikající v průběhu propagační fáze, které podléhají dalším přeměnám a z nich následně vznikají sekundární metabolity. Nejvíce toxické jsou malondialdehyd, propanal, hexanal, 4-HNE, který představuje 95% vzniklých aldehydů (Csala et al., 2015).

4-HNE je odvozen od oxidace omega-6 polyneenasycených mastných kyselin, a to především linolové, γ -linolenové nebo arachidonové kyseliny (obrázek 2) (Dalleau et al., 2013).



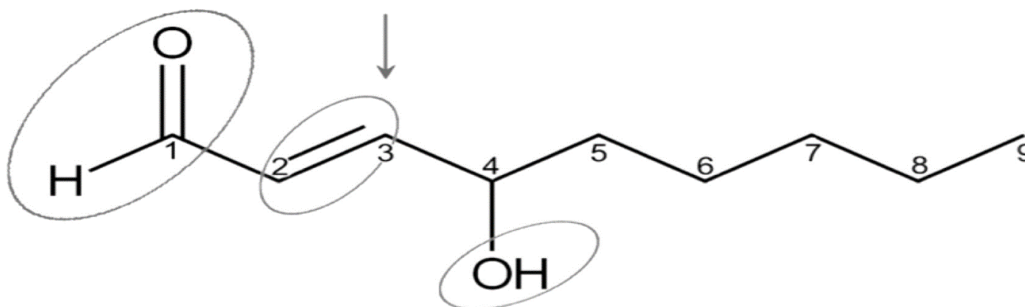
Obrázek 2 Vznik 4-HNE z omega-6 mastných kyselin (Ayala et al., 2014).

1.4.3 REAKCE MOLEKULY 4-HYDROXYNONENALU

Molekula 4-HNE je vysoce reaktivní díky dvěma reaktivním místům, atomu uhlíku C3 a aldehydové skupině. 4-HNE je považován za nejtoxičtější aldehyd díky přítomnosti dvojné vazby mezi prvním a druhým uhlíkem (Schwarzer et al., 2015).

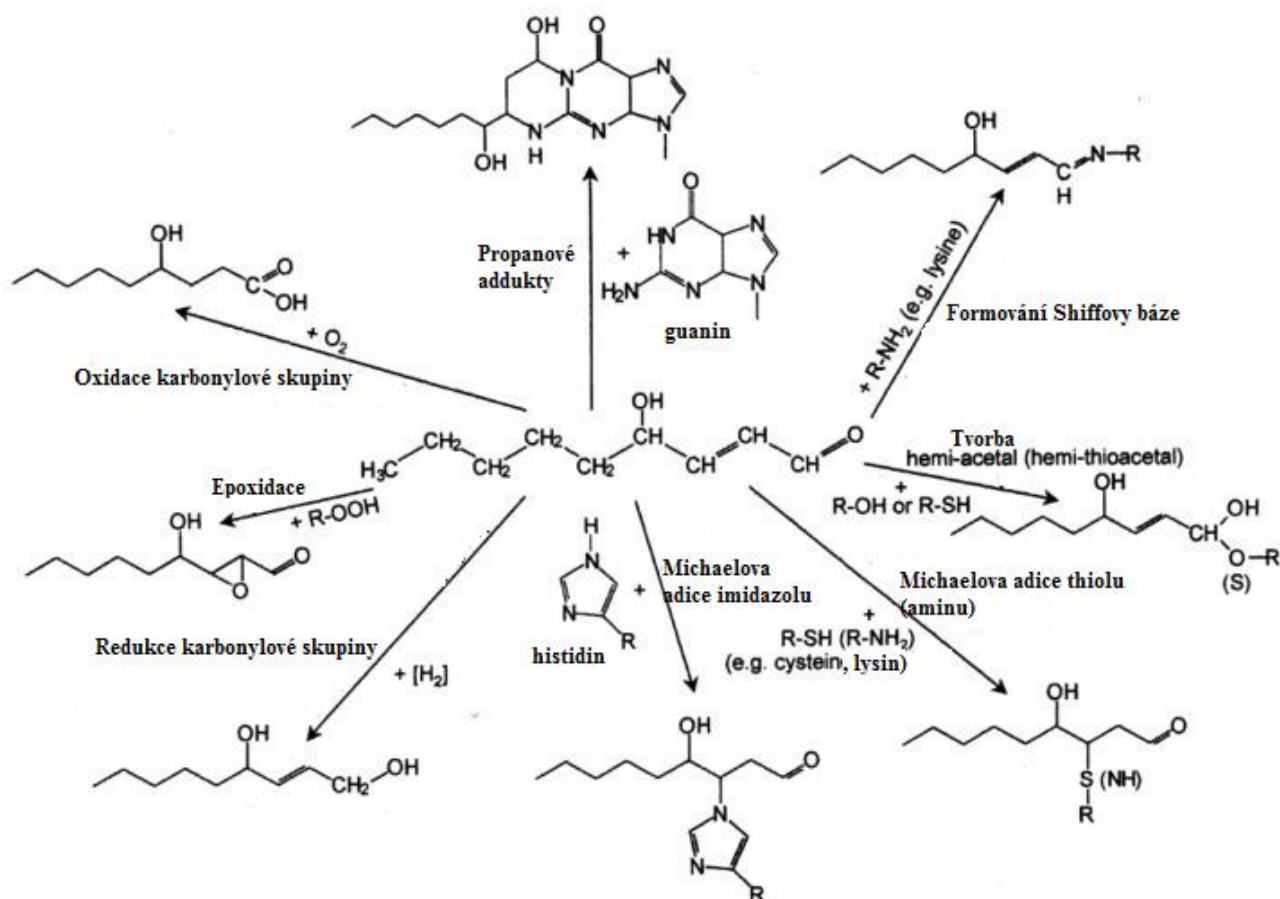
Systém dvojné vazby mezi uhlíky, dvojné vazby karbonylové skupiny a přítomnost hydroxylové skupiny způsobuje, že je atom C3 více elektropozitivní a tedy náchylnější k nukleofilním útokům vedoucím k tvorbě Michaelových adduktů přidáním thiolových nebo aminových sloučenin - jedná se o primární reakce na dvojné vazbě mezi uhlíky s nukleofily, jako je např. cystein či glutation (obrázek 3) (Schwarzer et al., 2015, Shoeb et al., 2014). Dvojná vazba mezi uhlíky může být také redukována za vzniku 4-hydroxynonanalu (Schaur et al., 2015). U aldehydové skupiny je možnost reakce s primárními aminy, kdy dochází ke vzniku tzv. Schiffovy báze (Shoeb et al., 2014). Na této skupině může proběhnout také oxidace za vzniku kyseliny 4-hydroxynonenové za katalýzy aldehyddehydrogenázou

(ALDH) (Schaur *et al.*, 2015). Dvojitá reaktivita molekuly 4-HNE (tvorba Michaelových adduktů a Schiffovy báze) má však nevýhodu v tom, že může způsobit vyvolání karboxylového stresu (Csala *et al.*, 2015). Jelikož je kinetika tvorby Schiffovy báze pomalejší, tak Michaelovy addukty jsou v převaze (Schwarzer *et al.*, 2015).



Obrázek 3 Struktura 4-HNE. Pozn. Kruhy znázorňují reaktivní skupiny na molekule, šipka ukazuje místo nukleofilního útoku (Csala *et al.*, 2015).

4-HNE může dále reagovat s velkým množstvím makromolekul, nejvíce zastoupené v reakcích jsou aminokyseliny jako histidin a lysin (Dalleau *et al.*, 2013), kdy přidáním karboxylové skupiny dochází k jejich modifikaci a následnému pozměnění pro tělo vlastních antigenů, což vede k vyvolání imunitních reakcí (Štípek *et al.*, 2000). Reakce probíhají také s nukleovými kyselinami za vzniku molekulárních sloučenin s purinovými bázemi v DNA (Dalleau *et al.*, 2013), kdy následné poškození DNA může vést k apoptóze, karcinogenezi a stárnutí (obrázek 4) (Štípek *et al.*, 2000).



Obrázek 4 Reakce 4-HNE (Schaur et al., 2015).

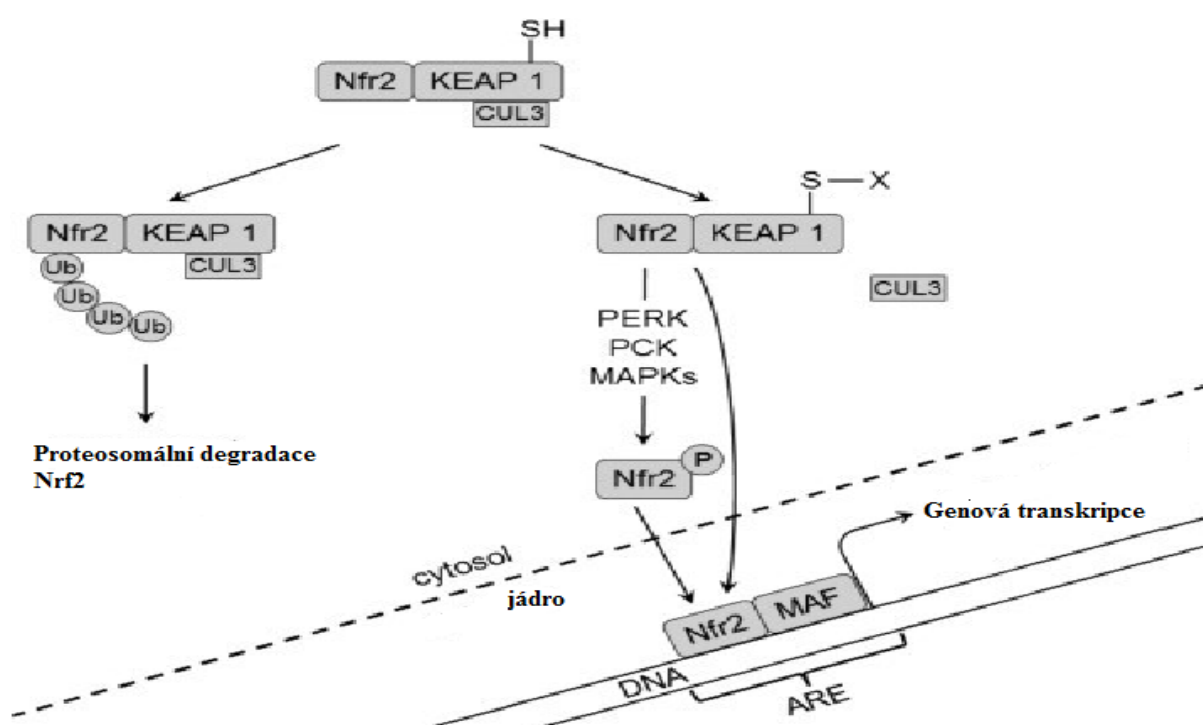
1.4.4 FUNKCE 4-HYDROXYNONENALU

4-HNE má v organismu řadu funkcí. Působí jako signální molekula podílející se na regulaci několika transkripčních faktorů nebo jako cytotoxický produkt peroxidace lipidů (Chapple et al., 2013). Ovlivňuje autofagii, stárnutí buněk nebo buněčný cyklus (Csala et al., 2015).

Nachází-li se 4-HNE v nízkých koncentracích (do 2 μM) má pro organismus fyziologicky přínosné účinky, vyšší koncentrace 4-HNE (10-60 μM) pak mají genotoxický účinek. V koncentracích $>100 \mu\text{M}$ může dojít k toxickému poškození buněčných složek, DNA a proteinů. Příliš nízké koncentrace jsou zase naopak spojovány s narušením buněčné homeostázy vápníku. Velké množství 4-HNE se hromadí za různých patologických stavů (Shoeb et al., 2014).

1.4.4.1 HYDROXYNONENAL JAKO SIGNÁLNÍ MOLEKULA

4-HNE způsobuje stres endoplazmatického retikula, aktivaci antioxidantů a podílí se na mechanismech tepelného šoku. 4-HNE ovlivňuje veškeré signální dráhy v buňkách. Dochází k tomu v důsledku kovalentního spojení 4-HNE s hlavními proteiny signálních drah. 4-HNE ovlivňuje především KEAP1-Nrf2 dráhu. Tato cesta snímá pro-oxidační účinky a ovlivňuje buněčnou odpověď proti oxidačnímu a elektrofilnímu stresu. Na cystein bohatý protein KEAP1 (Kelch like ECH-Associated Protein 1), protein, který je u lidí kodovaný genem Keap1, za fyziologických podmínek váže Nrf2, což je transkripční faktor antioxidační odpovědi nacházející se izolovaný v cytoplazmě, a směřuje ho k proteosomální degradaci (Csala et al., 2015, Dalleau et al., 2013). Signál proteosomu k degradaci dává konjugace cullin 3 ubiquitin ligázy s Nrf2, která je připojena ke KEAP1, a která je za spojení s Nrf2 zodpovědná. Tvorba adduktů nebo oxidace cysteinových zbytků KEAP1 v přítomnosti 4-HNE snižuje jeho potenciál k tvorbě komplexu ubiquitin ligázy, čímž dochází k akumulování Nrf2. Jeho aktivace a následná translokace do jádra, kde se váže na prvek antioxidační odezvy a reguluje cílové geny, vzniká jako odezva na oxidační stimuly (obrázek 5).



Obrázek 5 KEAP1-Nrf2-ARE dráha: Za fyziologických podmínek se Nrf2 váže na KEAP1 pomocí Cul3 ubiquitin ligázy. Po elektrofilní expozici reagují elektrofilní (např. 4-HNE) s KEAP1, což vede k disociaci Cul3. Nrf2 se akumuluje, translokuje do jádra, váže se na antioxidační odpověď (ARE) a zvyšuje expresi Nrf2 cílových genů.

Mezi geny, které jsou regulovány Nrf2 patří geny kodující: glutamát / cystinový transportér (xCT), aldehyd dehydrogenázu (ALDH), thioredoxin reduktázu.

Tvorba NADPH je řízena Nrf2 pomocí glukóza-6-fosfátdehydrogenázy a fosfoglukonátdehydrogenázy. NADPH je využíván systémy glutationu a thioredoxinu jako elektronový dárce. Exprese enzymů syntézy, regenerace a využití glutathionu (např. glutamát-cysteinová ligázy, glutathion-reduktázy, glutathion-S-transferázy a glutathion peroxidázy) je regulována také Nrf2. Konečným výsledkem signální dráhy je zesílená antioxidační ochrana a redoxní posun směrem k více redukčním podmínkám.

Nrf2 je protein regulující produkci antioxidačních a protizánětlivých proteinů a jeho narušení ruší antioxidační signalizaci, což vede k hromadění 4-HNE. Jeho aktivace slouží jako ochrana před oxidačním stresem a stárnutím buněk. Tato signální dráha má velký význam při patologických stavech jako je rakovina, diabetes mellitus, infekční choroby (Ayala et al., 2014, Dalleau et al., 2013, Csala et al., 2015).

4-HNE může také ovlivňovat aktivující protein-1 (AP-1), transkripční faktor ovlivňující biologické procesy včetně imunity, zánětu či apoptózy (NF- κ B) a receptory aktivované proliferátory peroxizomů (PPAR).

Aktivace AP-1 působením 4-HNE vede ke zvýšení obsahu glutathionu. NF- κ B může být vlivem 4-HNE aktivován nebo inhibován, a to v závislosti na typu buněk účastnících se reakce. 4-HNE například inhibuje NF- κ B v hepatocytech, pigmentových buňkách, Kupfferových buňkách apod. a naopak ho aktivuje v makrofázích, buňkách hladké svaloviny cév, fibroblastech, apod.. PPAR patří mezi transkripční regulátory metabolismu lipidů či antioxidační ochrany a 4-HNE způsobuje zvýšení genové exprese PPAR, či u podtypu PPAR- β / δ slouží k jeho aktivaci a zesílení sekrece inzulínu v β -buňkách Langerhansových ostrůvků pankreatu (Ayala et al., 2014).

1.4.4.2 STRES ENDOPLAZMATICKÉHO RETIKULA

Stres endoplazmatického retikula (ER) je aktivován v případě, že dojde k narušení jeho homeostázy, což se projeví akumulací proteinů, které neprošly procesem svinování. Jako odezva se aktivují signální dráhy UPR (unfolded protein response). 4-HNE byl popsán jako aktivátor stresu ER a UPR v lidských endoteliálních buňkách, které obsahovaly 4-HNE addukty s proteiny kolokalizujícími stres ER. Tyto addukované proteiny přímo ovlivňují funkci ER. Akumulace nesprávně přeložených proteinů s addukty 4-HNE v ER ohrožuje přežití buněk.

Účinek 4-HNE na stres ER byl popsán v játrech potkanů. Působením 4-HNE dochází k aktivaci senzoru stresu ER – endoplazmatické retikulární kinasy. 4-HNE vyvolává stres ER vyčerpáním glutathionu v buňkách. Důležitým poznatkem je, že faktor Nrf2 je substrátem pro endoplazmatickou retikulární kinasu aktivovanou při stresu ER (*Csala et al., 2015, Dalleau et al., 2013*).

1.4.4.3 VLIV 4-HYDROXYNONENALU NA AUTOFAGII

Autofagie je jeden z nejdůležitějších procesů pro udržení homeostázy pomocí lysozomálního rozkladu proteinů a organel v eukaryotických buňkách. Tento proces je stimulován při nedostatku živin - dochází k degradaci proteinů, nukleových kyselin a organel, a naopak inhibován při dostatečném množství živin.

4-HNE vytváří proteinové addukty, což vede k poškození proteinů a následně k vyvolání autofagie (*Ayala et al., 2014*). Aktivace autofagie při oxidačním stresu má úlohu antioxidačního obranného systému - odstraní poškozené a nefunkční organely, které byly poškozeny vlivem hromadění ROS (*Csala et al., 2015*). 4-HNE může autofagii i snižovat, a to snížením aktivity lysosomální proteázy, což vede k lysosomální dysfunkci a snížení autofagie (*Csala et al., 2015*).

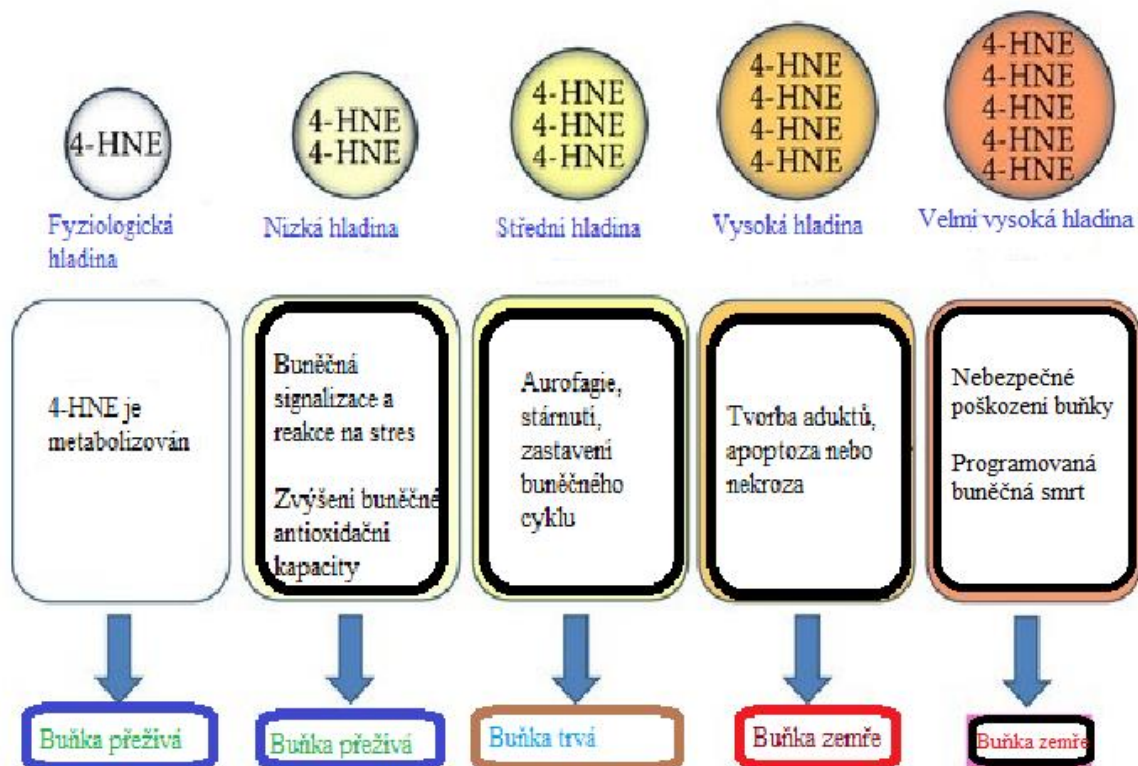
1.4.4.4 VLIV 4-HYDROXYNONENALU NA STÁRNUTÍ BUNĚK

Stárnutí buněk je ovlivněno mnoha faktory - oxidačním stresem, poškozením DNA, zánětem či zkrácením telomery, ke kterému dochází při každém buněčném dělení, dokud nedojde k její dysfunkci (při kritické délce). Dalšími faktory způsobujícími zkrácení telomery jsou zánět či oxidační stres a poškození DNA.

4-HNE může vyvolat předčasné stárnutí buňky potlačením aktivity telomerázy nebo naopak indukovat buněčné stárnutí aktivací tumor supresorových proteinů p53, které chrání buňky před oxidačním stresem a podílí se na opravě DNA. Když však rozsah poškození buněk přesáhne možnost buněčných oprav, p53 indukuje buněčnou smrt (*Ayala et al., 2014*).

1.4.4.5 VLIV 4-HYDROXYNONENALU NA BUNĚČNÝ CYKLUS

Produkty peroxidace lipidů mohou mít funkci „druhých posílů“ volných radikálů, protože jsou stabilní a snadno difundují, tudíž mají možnost ovlivnit vzdálené cíle a účastnit se řady buněčných událostí. Při vysokých koncentracích 4-HNE dochází k inhibici buněčných procesů, což vede k rozsáhlému poškození buněk a následné apoptóze (obrázek 6) (*Chapple et al., 2013*).

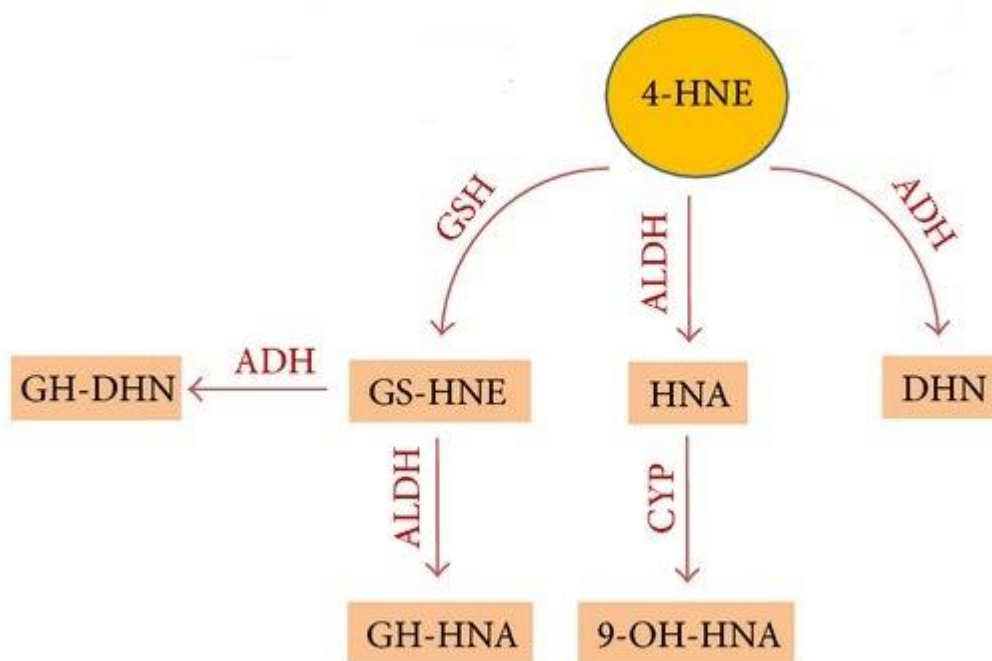


Obrázek 6 4-HNE a jeho vliv na buněčný cyklus. 4-HNE podporuje přežívání buněk nebo vyvolává buněčnou smrt. 4-HNE na fyziologické hladině je enzymaticky metabolizován. Na nízké hladině splňuje důležitou roli signální molekuly ovlivňující expresi genu a zvyšuje buněčnou antioxidační kapacitu a rozvoj adaptivní reakce. Střední hladina 4-HNE vede k vyvolání autofagie, stárnutí, nebo zastavení buněčného cyklu a nakonec 4-HNE při svých vysokých nebo velmi vysokých koncentracích podporuje tvorbu aduktů a apoptózu nebo nekrózu (Ayala et al., 2014).

1.4.5 METABOLISMUS 4-HYDROXYNONENALU

Při metabolismu 4-HNE se uplatňují enzymy jako glutathion-S-transferáza (GST), alkohol dehydrogenáza (ADH) či aldehyd dehydrogenáza (ALDH) a dochází ke vzniku glutathion-HNE (GS-HNE), 1,4-dihydroxynonenu (DHN) a 4-hydroxy-2-nonenové kyseliny (HNA). Poměr těchto primárních meziproductů 4-HNE v hepatocytech je takový, že polovina 4-HNE je metabolizována na GSH-HNE, třetina na HNA a desetina na DHN (Castro *et al.*, 2016). Tyto produkty metabolismu 4-HNE vznikají v závislosti na stupni námahy. Při velmi nízkém namáhání dochází ke konjugaci 4-HNE s glutathionem za vzniku GS-HNE, kdy následně probíhá pomocí enzymu alkoholdehydrogenázy katalyzovaná redukce na GS-DHN nebo pomocí enzymu aldehyddehydrogenázy katalyzovaná oxidace na GS-HNA. Při mírném stupni námahy je 4-HNE vlivem enzymu aldehyddehydrogenázy katalyzován na HNA, který může být dále metabolizován na 9-hydroxy-HNA a při vysoké námaze je 4-HNE metabolizován enzymem alkoholdehydrogenázou na DHN (obrázek 7) (Ayala *et al.*, 2014).

Rychlost metabolismu HNE je ovlivněna množstvím glutathionu v buňce a enzymovou aktivitou (Chapple *et al.*, 2013).



Obrázek 7 *Metabolismus 4-HNE (Ayala et al., 2014).*

1.4.6 ÚČAST 4-HYDROXYNONENALU V PATOGENEZI RŮZNÝCH ONEMOCNĚNÍ

1.4.6.1 4-HYDROXYNONENAL, OBEZITA A METABOLICKÝ SYNDROM

Hladiny 4-HNE se zvyšují v krvi, svalové a tukové tkáni u obézních jedinců. Jsou zvýšené v adipocytech, kde mohou narušit funkci proteinů hrajících důležitou roli při lipidovém anabolismu a při potlačení zánětu. Snížená hladina 4-HNE a dalších produktů lipoperoxidace je poté spojena se zvýšenou citlivostí k inzulínu ve svalových buňkách při výkonu nebo při omezení příjmu energie.

4-HNE hraje důležitou roli i v patogenních buněčných změnách, které vedou např. k inzulínové rezistenci nebo přispívá k dysfunkci a smrti β -buněk pankreatu, které jsou citlivé k poškození oxidačním stresem a lipoperoxidací při diabetu mellitu.

Obezita a metabolický syndrom jsou podle řady autorů spojeny s oxidačním stresem a nadměrnou produkcí 4-HNEa významně zvyšují riziko vzniku cévní mozkové příhody. 4-HNE hraje roli při aterosklerotických procesech, a to i v mozkových cévách, které jsou uzavřeny sraženinou během cévní mozkové příhody. Při studiu posmrtné mozkové tkáně byly zjištěny zvýšené hladiny 4-HNE. Studie na zvířecích modelech pak podporují skutečnost, že 4-HNE přispívá k dysfunkci a smrti neuronů při mozkové příhodě (*Mattson, 2009*).

1.4.6.2 4-HYDROXYNONENAL, ATEROSKLEROZA A KARDIOVASKULÁRNÍ ONEMOCNĚNÍ

Srdce je orgán s největší spotřebou kyslíku. Vysoká oxidační kapacita myokardu umožňuje stálý zdroj ROS, a tím i sekundární produkci 4-HNE. Za normálních podmínek je srdeční 4-HNE neutralizován aldehyd dehydrogenázou, glutathion S-transferázou a aldoso-reduktázou. Za patologických stavů však dochází k přesáhnutí antioxidační ochrany organismu, což vede k nadměrné produkci 4-HNE, která je následována dysfunkcí myokardu – jedná se např. o stavy jako ischemie myokardu, srdeční selhání, diabetes mellitus, např. u dilatační kardiomyopatie bylo popsáno pětinašobné zvýšení 4-HNE (*Csala et al., 2015*).

Oxidační stres a 4-HNE přispívá ke vzniku kardiovaskulárních onemocnění – jeho akumulace byla popsána u aterosklerózy. 4-HNE modifikuje LDL, což vede k aktivaci makrofágů, které mohou přispívat k cévnímu zánětu, který se vyskytuje u aterosklerotických lézí (*Mattson, 2009*). 4-HNE také podporuje chronický zánět stimulací exprese a syntézy monocytárních chemotaktických proteinů (MCP-1) a transformujícího růstového faktoru beta (TGF- β) v makrofázích a buňkách hladkého svalstva (*Dalleau et al., 2013*). Dále může

podporovat adhezi pro-zánětlivých imunitních buněk (makrofágů a lymfocytů) na cévní endotel a proliferaci intimy v časných stádiích aterosklerózy, ale také může ovlivnit ucelenost buněk cévní stěny a způsobit apoptózu (*Mattson, 2009*).

Po ischemii, která je předstupněm infarktu, dochází k hromadění ROS, které vedou k tvorbě 4-HNE (*Dalleau et al., 2013*). Kromě vlivu 4-HNE v procesu aterosklerózy, může 4-HNE přispívat i k poškození kardiomyocytů hromaděním v buňkách myokardu během reperfuze poškození.

4-HNE může také podporovat vznik srdeční arytmie, a to inhibicí draslíkových kanálů, což vede k depolarizaci membrány a k prodloužení akčního potenciálu.

Snížení příjmu energie vede ke snížení peroxidace lipidů a produkce 4-HNE (*Mattson, 2009*).

1.4.6.3 4-HYDROXYNONENAL A NEURODEGENERATIVNÍ ONEMOCNĚNÍ

Citlivost tkáně vůči oxidačnímu stresu je přičítána náchylnosti lipidů k peroxidaci, což je ovlivněno hladinou PUFA, kdy nízké hladiny PUFA mohou poskytnout zvýšenou odolnost vůči oxidačnímu stresu. Mozková tkáň obsahuje velké množství omega-6 mastných kyselin, které jsou prekurzory 4-HNE. V kombinaci s vysokým množstvím kovových iontů účastnících se oxidačně redukčních procesů a intenzivní spotřebou kyslíku se mozková tkáň stává hlavním cílem volných radikálů a 4-HNE, což přispívá rozvoji neurodegenerativních poruch (*Csala et al., 2015*). Příkladem je roztroušená skleróza, zánětlivé demyelinizační autoimunitní onemocnění postihující CNS. Při roztroušené skleróze imunitní systém napadá myelinové pochvy nervových buněk v mozku a míše. Dochází ke zvýšené peroxidaci lipidů a tím i ke zvýšení hladin 4-HNE, které jsou spojeny s výskytem lézí roztroušené sklerózy. Mezi další onemocnění, u kterých byla nalezena zvýšená peroxidace lipidů patří Parkinsonova, Huntingtonova či Alzheimerova choroba (*Adibhatla a Hatcher, 2008*).

1.4.6.4 4-HYDROXYNONENAL A NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ

Jak již bylo zmíněno, proteiny, DNA či membránové lipidy jsou primárními cíli pro atak 4-HNE. Přibližně 1-8% z 4-HNE vytvořeného v buňkách modifikuje proteiny (*Shoeb et al., 2014*), kdy větší reaktivita 4-HNE s proteiny než se samotným DNA vede k názoru, že modifikace proteinů, podílejících se na opravě DNA, může přispět k cytotoxickým a karcinogenním účinkům 4-HNE. 4-HNE tak poškozuje nejen DNA jako molekulu, ale také ovlivňuje mechanismy jejích oprav a přispívá tak ke karcinogenezi (*Csala et al., 2015*). 4-HNE nebo jeho biologicky aktivní metabolity mohou poškodit DNA, což může vést k tvorbě

pro-mutagenních lézí (*Shoeb et al., 2014*). Většina typů nádorového bujení je spojována s oxidačním stresem a 4-HNE je tak považován za hlavní faktor přispívající k mutagením a karcinogenním účinkům vyvolanými nadměrnou peroxidací lipidů.

Vznik 4-HNE-proteinových aduktů v ledvinách a tlustém střevě je spojován s růstem a progresí karcinomu v těchto orgánech (*Zhong a Yin, 2014*).

1.4.6.5 4-HYDROXYNONENAL A ZÁNĚTLIVÁ ONEMOCNĚNÍ

Se zvýšenou tvorbou 4-HNE se setkáváme také u mnoha zánětlivých onemocnění. Příkladem je ateroskleróza či artritida.

V nedávných studiích bylo prokázáno, že konjugát glutation-HNE indukuje proliferaci buněk hladkého svalstva cév, jakožto i jejich smrt, a to v závislosti na jeho intracelulární koncentraci. Nedávné studie uvádí, že glutathion-HNE je silnějším indikátorem zánětu než nekonjugovaný 4-HNE. Provedené studie naznačují, že by 4-HNE a HNE-proteinové addukty mohly být považovány za biomarkery pro řadu lidských onemocnění, a to právě díky tomu, že dochází k významnému zvýšení jejich tvorby při většině patologických procesů (*Shoeb et al., 2014*).

1.4.7 STANOVENÍ 4-HYDROXYNONENALU

Účelem stanovení 4-HNE je posouzení intenzity peroxidace lipidů na základě přítomnosti sekundárního produktu. Spektrofotometrické stanovení je založeno na reakci aldehydů s 2,4-dinitrofenylhydrazinem za vzniku 2,4-dinitrofenylhydrazonů, jenž absorbují UV světlo o vlnové délce 350 nm. Jelikož při této reakci reagují všechny aldehydy, musí se 4-HNE nejprve oddělit pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie. 4-HNE je možno také stanovit plynovou chromatografií s využitím hmotnostního detektoru, což umožňuje stanovit 4-HNE v rozmezí 1-5 μmol v kulturách buněk, ve tkáních či krvi (*Štípek et al., 2000*).

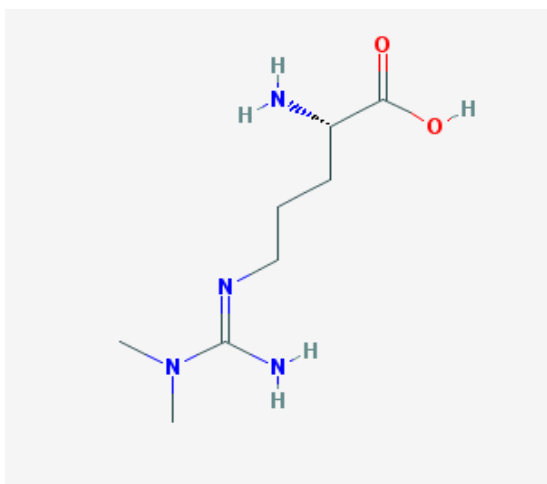
1.5 VZNIK SYMETRICKÉHO A ASYMETRICKÉHO DIMETHYLARGININU

Oxidační stres způsobuje také zvýšení exprese enzymů ze skupiny protein-arginin-methyltransferáz (PRMTs) (*Chen et al., 2012*) zodpovědných za syntézu asymetrického (ADMA) a symetrického dimethylargininu (SDMA) (*Aldámiz-Echevarría a Andrade, 2012, Tain a Huang, 2014*), a snížení aktivity enzymu dimethylarginindimethylaminohydrolázy (DDAH) (*Chen et al., 2012*) zodpovědného naopak za degradaci ADMA. To vede ke zvýšení koncentrace ADMA, který inhibuje syntézu NO, a díky tomu dále podporuje působení oxidačního stresu (*Aldámiz-Echevarría a Andrade, 2012, Tain a Huang, 2014*).

ADMA a SDMA vznikají během methylace, kdy dochází k modifikaci intracelulárních proteinů přidáním methylové skupiny (*Lluch et al., 2015*), což má vliv na transkripci, metabolismus RNA či vazbu protein-protein, díky ADMA čemuž ovlivňuje buněčné dělení, proliferaci nebo apoptózu (*Zakrzewicz a Eickelberg, 2009*).

Při methylaci argininu dochází ke změně jeho tvaru. Právě arginin má ze všech 20 známých aminokyselin nejdelší postranní řetězec, na jehož konci je kladný náboj, který umožňuje vznik interakce protein-protein. Jeho guanidová skupina nabízí pět donorů vodíkové vazby, jenž bývají využity k ustálení vzájemného působení s DNA, RNA a proteiny (*Gayatri a Bedford, 2014*).

Proteiny bohaté na L-arginin jsou methylovány enzymy ze skupiny PRMTs, které v savcích buňkách rozlišujeme do dvou typů - typ I (PRMT 1, 3, 4, 6 a 8) a typ II (PRMT 5 a 7), za vzniku tří rozdílných zbytků methylovaných argininů. PRMTs přenáší methylovou skupinu z S-adenosylmethioninu na arginin, díky čemuž dochází ke vzniku methylovaného argininu a S-adenosylhomocysteinu, který je hydrolyzován a vzniká homocystein. Nejrozšířenějším derivátem je ADMA, který má dvě methylové skupiny situovány na jednom koncovém dusíkovém atomu v guanidové skupině (obrázek 8), a na jehož vzniku se podílí PRMT typu I.



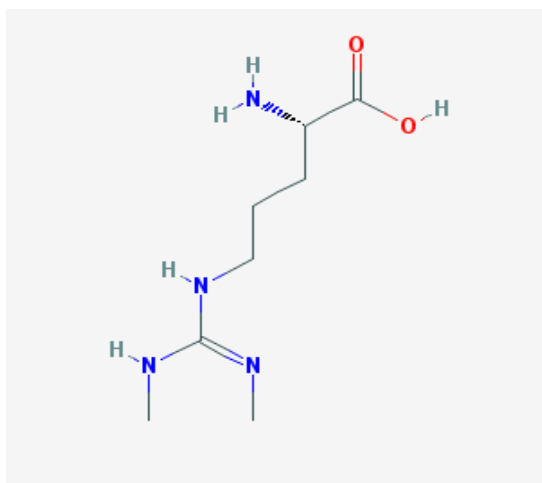
- N(omega),N(omega)-dimethyl-L-arginin

- $C_8H_{18}N_4O$

-molekulární hmotnost-202,258 g/mol

Obrázek 8 Vzorec asymetrického dimethylargininu (PubChemCompound Database)

Mezi další derivát patří SDMA, který má na každém z koncových guanidových atomů dusíku umístěnu jednu methylovou skupinu (obrázek 9) a vzniká vlivem PRMT typu II.



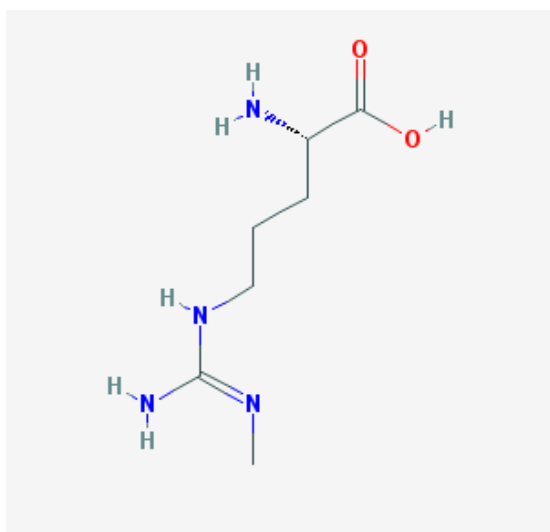
-N(omega),N'(omega)-dimethyl-L-arginin

- $C_8H_{18}N_4O_2$

-molekulární hmotnost-202,258 g/mol

Obrázek 9 Vzorec symetrického dimethylargininu (PubChemCompound Database)

Třetí, monomethylargininový (MMA) derivát, na jehož koncovém atomu dusíku se nachází jedna methylová skupina (obrázek 10), poté vzniká za katalýzy PRMTs obou typů (Zakrzewicz a Eickelberg, 2009, Gayatri a Bedford, 2014).



-N(omega)-Monomethyl-L-Arginin

-C₇H₁₆N₄O₂

-molekulární hmotnost-188,231 g/mol

Obrázek 10 Vzorec monomethylargininu (PubChemCompound Database)

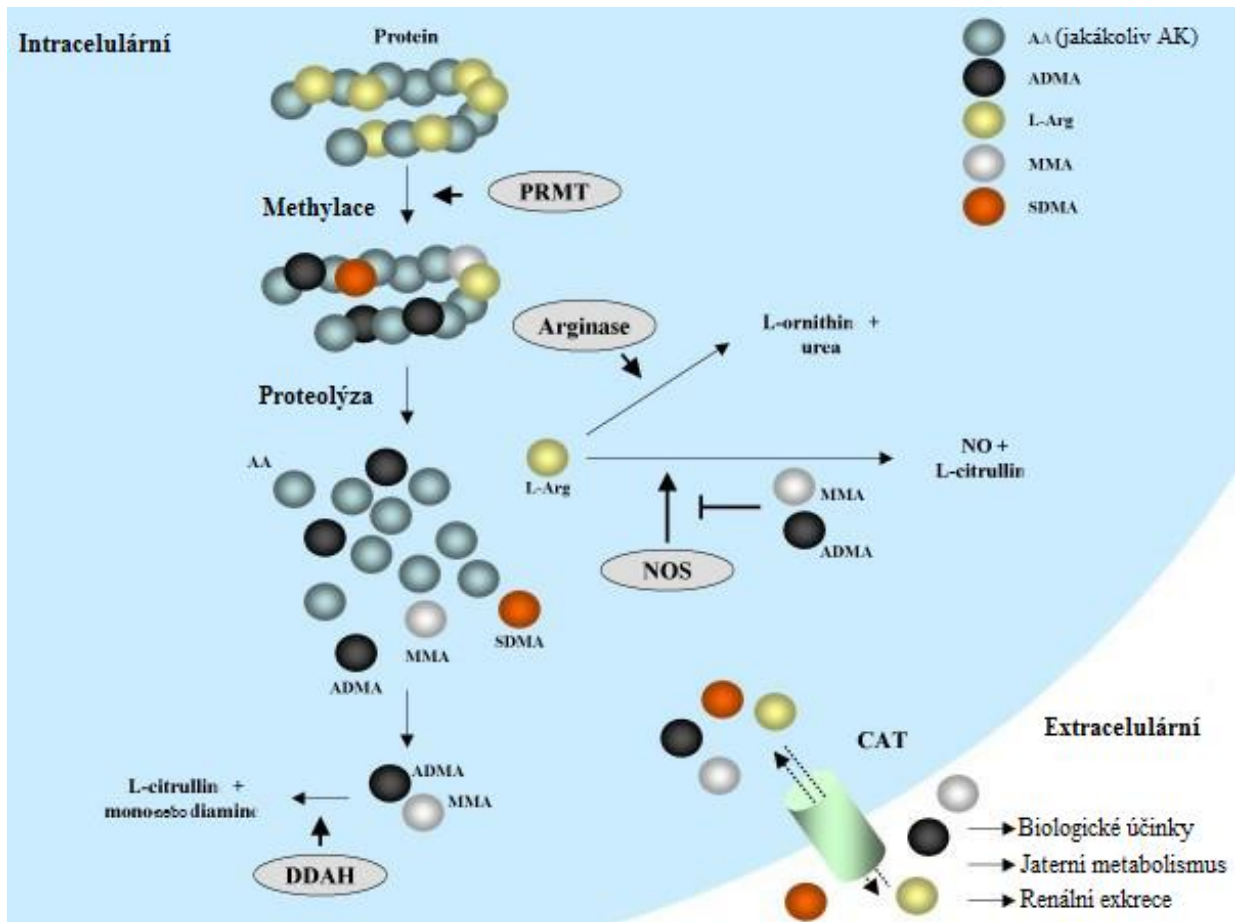
Vlivem vysoké koncentrace lipoproteinů o nízké hustotě dochází k vzrůstu genové exprese PRMTs v endotelových buňkách, což vede ke zvýšené aktivitě PRMTs, a díky tomu i ke zvýšení koncentrace ADMA (Lluch *et al.*, 2015).

1.5.1 ODBOURÁVÁNÍ ASYMETRICKÉHO A SYMETRICKÉHO DIMETHYLARGININU

Po ukončení proteolytické degradace methylovaných intracelulárních proteinů dochází při hydrolyze proteinů k uvolnění MMA, ADMA a SDMA z buněk do krve a jejich následnému odstranění z organismu ledvinami a jaterním metabolismem, kam jsou dopravovány pomocí transportérů kationtových kyselin (CATs). MMA a ADMA mohou být degradovány také vlivem enzymu DDAH (Zakrzewicz a Eickelberg, 2009).

Tento enzym je produkován ve tkáních - DDAH I v epitelových buňkách nervových tkáních, či v endotelu cév orgánů jako je mozek, ledviny, plíce a játra, DDAH II v krevních cévách různých orgánů, např. srdce, plíce, placenta. Vysoká aktivita enzymu DDAH se projevuje především v ledvinách a játrech, je snižována při oxidačním stresu (Chen *et al.*, 2012) a naopak se zvyšuje s rostoucí hladinou ADMA, čímž se zabráňuje hromadění této látky v organismu (Badran *et al.*, 2015). Vlivem tohoto enzymu může být tedy MMA a ADMA degradován na citrulin a mono- nebo dimethylamin, který je následně vylučován močí (Zakrzewicz a Eickelberg, 2009).

ADMA je částečně odváděn z těla ledvinami, dominující eliminační cesta je ale přes enzym DDAH I a II v játrech (Chen *et al.*, 2012). SDMA pomocí DDAH degradován být nemůže, dochází proto k jeho odvádění z těla pomocí ledvin (obrázek 11) (Lluch *et al.*, 2015).



Obrázek 11 *Metabolismus methylargininu - Nejprve dochází k methylaci argininu pomocí enzymů PRMTs. Po proběhnutí proteolytického štěpení dochází ke vzniku ADMA, SDMA a MMA. Volný L-arginin je metabolizován pomocí arginázy na L-ornithin a močovinu, nebo vlivem syntázy oxidu dusnatého (NOS) na NO a L-citrulin. Volné methylargininy jsou vylučovány ledvinami nebo játry. MMA a ADMA lze pomocí enzymu DDAH převést na L-citrulin a mono- nebo dimethylamin (Zakrzewicz a Eickelberg, 2009).*

1.5.2 VÝZNAM ASYMETRICKÉHO A SYMETRICKÉHO DIMETHYLARGININU PRO ORGANISMUS

ADMA je považován za marker oxidačního stresu a rizikový faktor různých onemocnění (*Pope et al., 2009*). Hromadí se v plazmě při oxidačním stresu a inhibuje aktivitu NOS a CATs, podílí se tak na endoteliální dysfunkci a dalším generování oxidačního stresu, které jsou na počátku cévních a orgánových onemocněních (*Teerlink et al., 2009*).

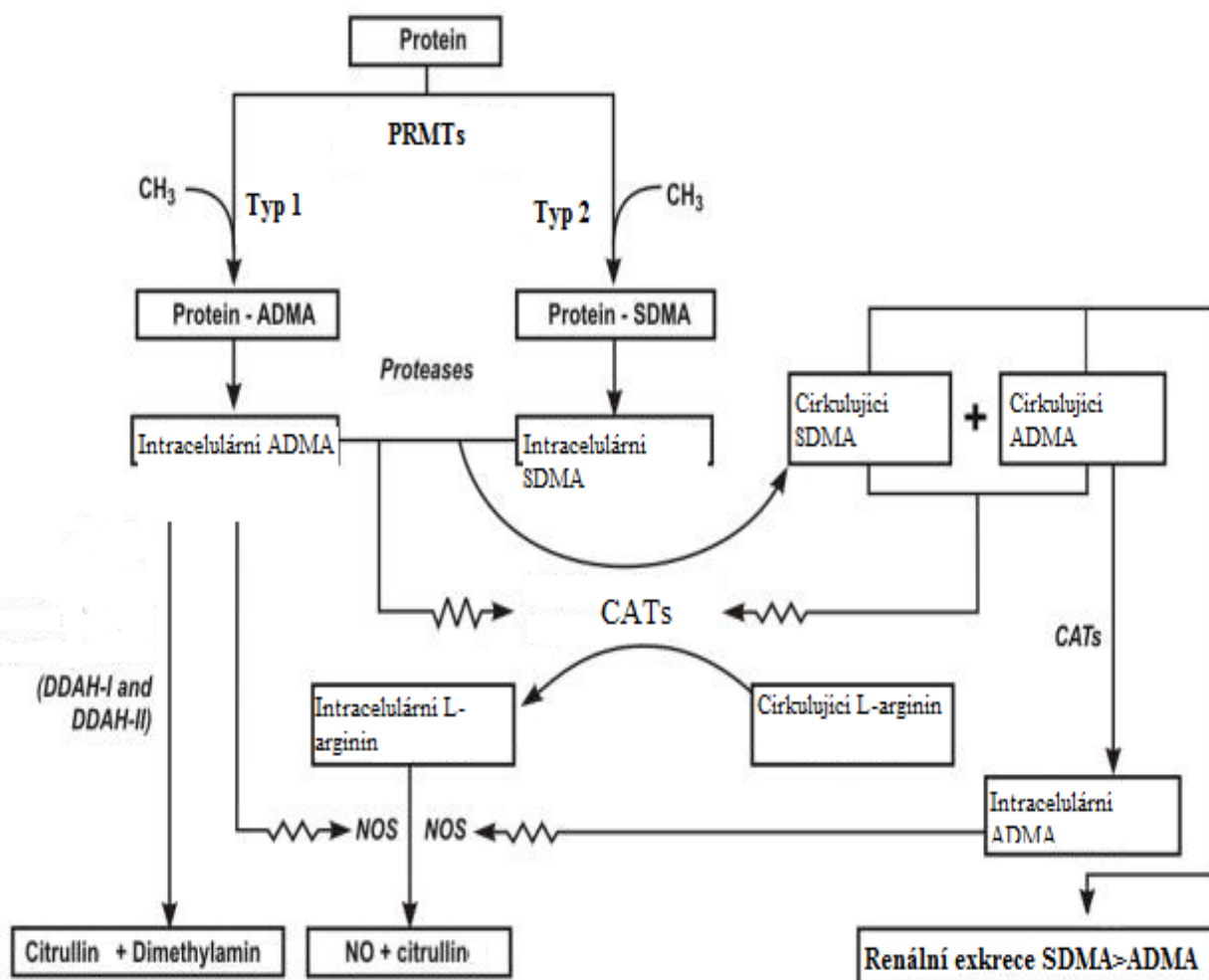
SDMA se na rozdíl od ADMA neúčastní inhibice NOS, přesto jeho zvýšená hladina bývá spojována s poškozením ledvin a kardiovaskulárními komplikacemi (*Rodionov et al., 2015*). Dvojnásobné zvýšení plazmatické koncentrace ADMA bylo pozorováno u plicní hypertenze, ischemické choroby srdeční, diabetu mellitu, hypertenzi (*Pope et al., 2009*).

1.5.3 VLIV ASYMETRICKÉHO A SYMETRICKÉHO DIMETHYLARGININU NA SYNTÁZU OXIDU DUSNATÉHO

ADMA, jakožto endogenní inhibitor NOS, může snížit dostupnost NO (*Chen et al., 2012*), který je produkován při oxidaci argininu v reakci katalyzované NOS (*Sitar, 2016*). ADMA blokuje aktivní centra NOS, ve kterém soutěží o vazebné místo s L-argininem (substrátem NOS). ADMA blokuje jeho všechny tři izoformy – neuronální NOS „nNOS“, vyskytující se v neuronech, indukovatelnou NOS „iNOS“, v astrocytech a endoteliální NOS „eNOS“, přítomnou v endoteliálních buňkách (*Badran et al., 2015*).

Intracelulární ADMA, který nebyl metabolizován DDAH, může inhibovat NOS i nepřímo, a to zasahováním do intracelulárního vychytávání L-argininu pomocí CATs, které může blokovat a zhoršit tak dostupnost L-argininu substrátu NOS (obrázek 12) (*Engin A.B. a Engin A., 2013*). V důsledku toho dochází k blokaci aktivity NOS, ale také omezenému buněčnému vychytávání L-argininu, což vede k oxidačnímu stresu a další inhibici NO biogeneze, což má škodlivé účinky především v krevních cévách, myocytech a ledvinách.

Vysoká intracelulární hladina ADMA vyplývá z toho, že aktivita CATs nedostačuje k vyvážení rovnováhy ADMA mezi cytolem buňky a plazmou. Aktivita CATs může sloužit k odhadu buněčné hladiny ADMA, i ke zjištění aktivace nebo inhibice NOS ve tkáních (*Teerlink et al., 2009*).



Obrázek 12 Přehled vzniku, metabolismu, transportu a vylučování ADMA a SDMA (Teerlink et al., 2009).

1.5.3.1 PŮSOBENÍ OXIDU DUSNATÉHO V ORGANISMU

$NO\cdot$ je produkován endotelovými buňkami. Jedná se o vazodilatační látku (Sitar, 2016), která difunduje přes endoteliální buňky a působí relaxačně na buňky hladkého svalstva. Její produkce je důležitá pro regulaci průtoku krve, udržování vazorelaxace a působení proti proliferaci hladkých svalových buněk. $NO\cdot$ také inhibuje agregaci krevních destiček a adhezi leukocytů na cévní stěny – chrání tak cévní endotel před oxidačním poškozením.

Snížení syntézy $NO\cdot$ mohou způsobit kromě ADMA i pro-zánětlivé mediátory a cytokiny, které škodlivě působí na endoteliální buňky, což následně vede k endoteliální dysfunkci. To má za následek poruchu regulace cévního tonu, zvýšenou expresi adhezivních molekul, nebo-li funkční a strukturální změny (Štípek et al., 2000, Dimitroulas et al., 2012).

1.5.4 ASYMETRICKÝ DIMETHYLARGININ JAKO MEDIÁTOR ENDOTELIÁLNÍ DYSFUNKCE A ATEROSKLEROZY

Cévní endotel má mnoho funkcí, a proto je jeho dysfunkce zodpovědná za řadu zdravotních problémů, jako je ateroskleróza, vysoký krevní tlak, trombóza (*Aldámiz-Echevarría a Andrade, 2012*). Endoteliální dysfunkce se projeví změnou funkčních a morfologických rysů cévní stěny a za její mediátor lze považovat ADMA (*Štípek et al., 2000*).

NO produkovaný cévním endotelem souvisí s regulačním mechanismem kardiovaskulárního systému, proto snížení jeho dostupnosti lze považovat za zásadní rizikový faktor pro aterotrombozu nebo pro akutní kardiovaskulární příhody (*Konya et al., 2015*).

1.5.5 ASYMETRICKÝ DIMETHYLARGININ A KARDIOVASKULÁRNÍ ONEMOCNĚNÍ

U zdravých jedinců s nízkým rizikem kardiovaskulárních chorob měli ti, jejichž hladina ADMA v plazmě byla $>0,71 \mu\text{mol/l}$, vyšší riziko vzniku kardiovaskulárních chorob. Zvýšené plazmatické hladiny ADMA a SDMA jsou nezávislými ukazateli budoucích kardiovaskulárních příhod. Ve studii u pacientů se stabilní ischemickou chorobou srdeční byly zvýšené plazmatické hladiny SDMA předpovídající pro budoucí sekundární kardiovaskulární příhody, zatímco zvýšené hladiny obou, ADMA i SDMA, byly prediktivní pro úmrtnost (*Leong et al., 2008, Chen et al., 2012*).

Zvýšení hladiny ADMA v důsledku oxidačního stresu je tedy marker pro arteriosklerotické změny typické u kardiovaskulárních onemocnění - ADMA je absorbován především endoteliálními buňkami - jeho extracelulární množství je 5-10x nižší, což znamená, že i malé změny plazmatických hladin ADMA jsou dostatečné na to, aby výrazně ovlivnily intracelulární hladiny ADMA, a díky tomu i produkci NO , a přispěly tak k rozvoji kardiovaskulárních chorob. Za patologických podmínek může dojít až k 3-9 násobnému zvýšení plazmatických hladin ADMA, což by inhibovalo produkci NO o 30-90% (*Aldámiz-Echevarría a Andrade, 2012*).

Zvýšená hladina ADMA nejspíše vede ke zvýšení arteriálního tlaku či snížení srdečního výdeje (*Aldámiz-Echevarría a Andrade, 2012*) a inhibuje vazodilataci, což vede k vazokonstrikci. Zvýšené hladiny ADMA se nacházejí u pacientů po akutním infarktu

myokardu a jsou spojovány s vývojem mnohačetného selhání orgánů u kriticky nemocných pacientů (*Dimitroulas et al., 2012*).

1.5.5.1 ASYMETRICKÝ DIMETHYLARGININ A CÉVNÍ MOZKOVÁ PŘÍHODA

Zvýšené hladiny ADMA i endoteliální dysfunkce a ateroskleróza, byly popsány i u pacientů s cévními rizikovými faktory, jako je hypercholesterolemie, arteriální hypertenze, diabetes mellitus, hyperhomocysteinémie a kouření. Plazmatické hladiny ADMA se zvyšují v závislosti na závažnosti cévní mozkové příhody a mají vliv na poškození mozku vlivem redukce průtoku krve mozkem, podporou oxidačního stresu či zánětlivé reakce.

V případě cévní mozkové příhody dochází k vyvolání oxidačního stresu v místě poruchy struktury tkáně vlivem buněčného poškození a proteolýzy. Ke zvýšené intracelulární hladině ADMA u cévní mozkové příhody dochází vlivem oxidačního stresu. Plazmatická koncentrace ADMA vzrůstá v závislosti na čase; jeho hladina je závislá na okamžiku odebrání krve, a na míře závažnosti příhody. U pacientů s příznivým výsledkem se plazmatická hladina ADMA v průběhu prvního až třetího dne po cévní mozkové příhodě opět sníží, zatímco u pacientů s nepříznivými výsledky se zvyšuje až do 3. dne a zůstává stabilní až do 7. dne, než se začne opět snižovat. Hladina ADMA $\geq 0.566 \mu\text{mol/l}$ 3. den a $\geq 0.530 \mu\text{mol/l}$ 7. den po prvních příznacích cévní mozkové příhody je ukazatelem nepříznivých výsledků. ADMA proto může být ukazatelem závažnosti cévní mozkové příhody. Po cévní mozkové příhodě byla prokázána zvýšená plazmatická hladina i SDMA. U pacientů s nepříznivými výsledky byla hladina SDMA zvýšena 24-72 hodin po proběhnutí cévní mozkové příhody (*Chen et al., 2012*).

1.5.6 ASYMETRICKÝ DIMETHYLARGININ A ONEMOCNĚNÍ LEDVIN

U pacientů léčících se s pokročilým zánětlivým onemocněním ledvin dochází ke snížení produkce NO v endotelu díky omezené syntéze argininu a zvýšené hladině ADMA, což vede k šíření poškození ledvin. ADMA se hromadí u pacientů s chronickým selháním ledvin díky zvýšené methylaci, snížené aktivitě DDAH či zhoršenému renálnímu vylučování. Hladina ADMA u pacientů v rané fázi onemocnění ledvin je zvýšena ještě před tím, než se sníží glomerulární filtrace, z čehož vyplývá, že jen velmi malé množství cirkulujícího ADMA je vylučováno močí (*Aldámiz-Echevarría a Andrade, 2012*).

1.5.7 ASYMETRICKÝ DIMETHYLARGININ A ONEMOCNĚNÍ JATER

U pacientů s jaterní dysfunkcí jsou hladiny ADMA zvýšeny také, a to díky procesům jako těžký zánět, oxidační stres či přímé poškození enzymu DDAH, což vede ke zhoršení jeho aktivity. Vzájemný vztah mezi plazmatickou hladinou ADMA a stupněm jaterní dysfunkce byl prokázán u pacientů, kteří trpí onemocněním jater různého původu onemocnění. Plazmatické hladiny ADMA jsou zvýšeny především u pacientů s jaterní cirhózou, alkoholickou hepatitidou či akutním selháním jater (*Ferrigno et al., 2015*).

U cirhózy jater dochází k vyvolání oxidačního stresu vlivem nadprodukce ROS, je patrná snížená dostupnost $NO\cdot$, která vznikla v důsledku endoteliální dysfunkce. Tvorba ROS a superoxidu jsou hlavní mediátory poškození endoteliálních buněk u onemocnění cirhózou (*Vairappan, 2015*).

1.5.8 ASYMETRICKÝ DIMETHYLARGININ A PLICNÍ HYPERTENZE

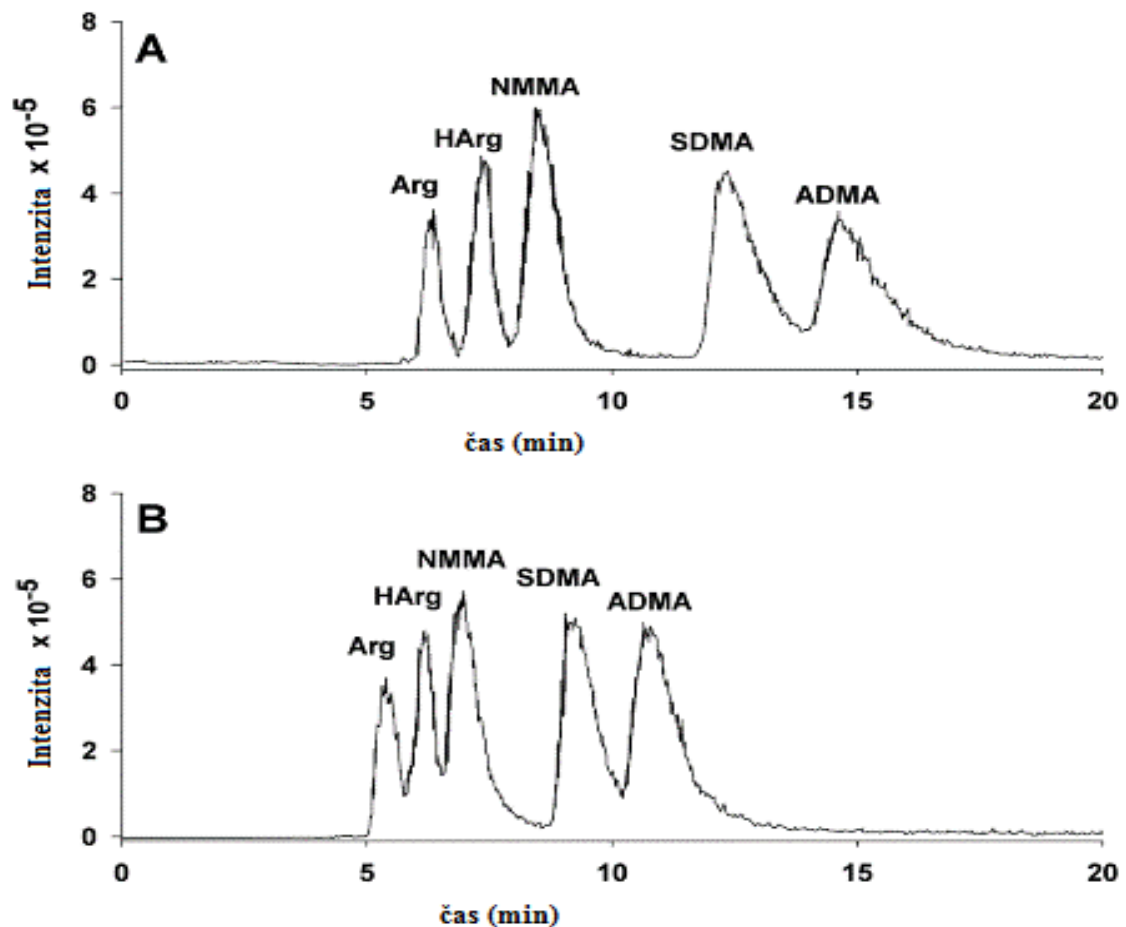
Endoteliální dysfunkce spojená se zvýšenými hladinami ADMA hraje důležitou roli i v rozvoji plicní hypertenze. Vzhledem k tomu, že množství vydechovaného $NO\cdot$ u pacientů se systémovou aterosklerózou a plicní hypertenzí je sníženo, lze se domnívat, že inhibice endoteliální NOS v plicích vlivem ADMA může vést k plicní vazokonstrikci a proliferaci. Bylo zjištěno, že dlouhodobá inhibice $NO\cdot$ stimuluje syntézu transformujícího růstového faktoru beta u krys, což vede k srdeční fibróze. Tento faktor je považován za jeden z nejdůležitějších cytokinů podílejících se na patogenezi aterosklerózy, může ukazovat silnou etiopatogenetickou roli ADMA v systémové skleróze a infarktu myokardu (*Dimitroulas et al., 2012*).

1.5.9 STANOVENÍ ASYMETRICKÉHO A SYMETRICKÉHO DIMETHYLARGININU

Jako metoda pro měření koncentrace ADMA může být využita enzymatická imunoanalýza (ELISA). Jako vzorek může být použita plazma nebo sérum. Do jamek mikrotitrační destičky, které jsou potažené ADMA, se napipetují připravené vzorky a poté antisérum. Jako antisérum se využívají anti-ADMA protilátky. ADMA ze vzorku je acylován a soutěží s ADMA přítomným na pevné fázi o vazebná místa omezeného množství přidané anti-ADMA protilátky. Po ukončení inkubace jsou volný antigen a volné komplexy antigen-protilátka odstraněny - dochází k promytí a následné detekci protilátky navázané na pevnou fázi vlivem fixovaného ADMA. Detekce probíhá pomocí činidla obsahujícího protilátku proti králičímu imunoglobulinu značenému peroxidázou. V

posledním kroku se přidá roztok tetramethylbenzidinu (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin) (substrát peroxidázy). Barevný produkt reakce se vyhodnocuje při vlnové délce 450 nm. Intenzita zbarvení je nepřímě úměrná koncentraci ADMA ve vzorku (Šíroká et al., 2005).

Stanovení ADMA či SDMA lze provést např. i pomocí HPLC hmotnostní spektrometrie. Zde lze jako vzorek použít plazmu nebo moč. Vzorky jsou analyzovány použitím silikagelové kolony. Výhodou této metody je rychlá příprava vzorku, či chromatografická separace SDMA a ADMA (obrázek 13) (Servillo et al., 2013).



Obrázek 13 Chromatografická separace: *L*-arginin (Arg), *L*-homoarginin (HArg), *N*-methyl-*L*-arginin (NMMA), SDMA a ADMA (Servillo et al., 2013).

Koncentrace ADMA se u zdravých jedinců pohybují v rozmezí 0,3-0,5 $\mu\text{mol/l}$. V patologických stavech dochází k jejich zvýšení, což přispívá k inhibici aktivity NOS. Ke zvýšení hodnoty ADMA může dojít např. zvýšenou methylací proteinů vlivem enzymů PRMTs, zvýšenou proteolýzou – zvýšeným uvolňováním methylovaného argininu, porušenou renální exkrecí nebo poruchou metabolismu enzymu DDAH (Lluch et al., 2015).

Plazmatické hladiny ADMA jsou také ovlivněny věkem, krevním tlakem či inzulínovou rezistencí. S rostoucím věkem koncentrace ADMA v krvi stoupá (*Aldámiz-Echevarría a Andrade, 2012*).

1.6 DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus se řadí do skupiny chronických metabolických poruch. Vzniká v důsledku nedostatečné syntézy nebo působení hormonu inzulínu produkovaného slinivkou břišní v β -buňkách Langerhansových ostrůvků, kdy výsledkem je narušení transportu glukózy z krve do buňky, což vede k hyperglykémii a zároveň k nedostatku intracelulární glukózy. Dlouhodobá zvýšená hladina glukózy v krvi vede k různým cévním komplikacím (*Asmat et al., 2016*) a následnému selhání orgánových systémů – především očí, nervů, ledvin či srdce (*Chawla A. et al., 2016*).

Léčba diabetu mellitu zahrnuje zdravý životní styl a nasazení inzulínu (*He et al., 2016*).

1.6.1 OXIDAČNÍ STRES A DIABETES MELLITUS

Oxidační stres způsobený vlivem nadprodukce ROS, hraje významnou roli v aktivaci patogenních drah, které vedou k diabetickým komplikacím. Vlivem vysoké hladiny glukózy v krvi přesahuje produkce ROS obrannou schopnost organismu a dochází tak k narušení rovnováhy (*Oliveira et al., 2016*). Hyperglykémie tak sama o sobě stimuluje oxidační stres, který následně působí zrychlení procesu aterosklerózy (*Miranda-Díaz et al., 2016, Štípek et al., 2000*).

Předpokládá se, že oxidační stres hraje významnou roli v rozvoji cévních komplikací zejména u diabetu typu 2. Hlavním zdrojem ROS u diabetu mellitu jsou mitochondrie – během oxidačního procesu v mitochondriích se část kyslíku redukuje na vodu a zbývající kyslík se převede na volný radikál kyslíku ($O\cdot$), který je dále převeden na jiné reaktivní sloučeniny, jako $ONOO^-$, OH a H_2O_2 (*Asmat et al., 2016*).

Superoxiddismutáza (SOD) a kataláza (CAT) jsou hlavní enzymy působící proti toxicitě ROS, jejich aktivita je u pacientů s diabetem snížena (*Oliveira et al., 2016*).

Pro diabetiky je typická endoteliální dysfunkce, která je hlavním faktorem vývoje komplikací spojených s diabetem a k jejímuž vzniku přispívá hyperglykémie – viz výše (*Prattichizzo et al., 2016*). Endoteliální dysfunkce hraje roli v aterosklerotických lézích, které

podporují zvýšení sekrece chemokinů, adherenci leukocytů a oxidaci LDL (*Derosa et al., 2016*).

1.6.2 ZÁNĚT A DIABETES MELLITUS

U diabetu typu 2 je zánět považován za významný rizikový faktor. Cévní buňky reagují na hyperglykémii patologickými změnami, např. zvýšením exprese adhezivních molekul pro monocyty, což vede k aterogenezi. Bylo prokázáno, že hladiny markerů, jako je C-reaktivní protein, fibrinogen, inhibitor aktivátoru plazminogenu I a interleukin-6 se zvyšují právě s nástupem diabetu. Aktivace monocytů byla zdokumentována v přítomnosti vysokého obsahu glukózy s indukci zánětlivých mediátorů, jako proteinkinázy C a nukleárního faktoru- κ B podporujících oxidační stres (*Chawla A. et al., 2016*).

1.6.3 ASYMETRICKÝ DIMETHYLARGININ V DIAGNOSTICE DIABETU MELLITU

Jak již bylo řečeno výše, ADMA je považován za endogenní inhibitor NOS, čímž způsobuje endoteliální dysfunkci, podílí se na generování oxidačního stresu a zánětlivých reakcí a díky tomu je považován za rizikový faktor různých onemocnění. S rostoucím věkem ADMA v krvi stoupá – zvýšené hladiny se spojují s endoteliální dysfunkcí, aterosklerózou a dají se považovat za marker arteriosklerotických změn. Zvýšené hladiny ADMA byly popsány i u diabetu mellitu a jsou spojeny s inzulínovou rezistencí. Při zvýšení plazmatické hladiny ADMA dojde k ovlivnění produkce *NO* či vzniku kardiovaskulárních chorob, které patří mezi komplikace u diabetu mellitu (*Chen et al., 2012, Sitar, 2016, Teerlink et al., 2009, Pope et al., 2009, Aldámiz-Echevarría a Andrade, 2012*).

Závěr

Oxidační stres vzniklý v důsledku nerovnováhy mezi tvorbou a odstraňováním reaktivních forem kyslíku a dusíku se podílí na vzniku řady onemocnění. Volné radikály poškozují především lipidy při procesu lipoperoxidace a dále působí na proteiny při procesu methylace. Dochází ke zvýšené tvorbě pro tělo škodlivých látek a následnému rozvoji různých onemocnění. Sekundární produkt lipoperoxidace, 4-hydroxynonenal, slouží jako marker oxidačního stresu, pro tělo má do určité koncentrace i fyziologický význam, a to především jako signální molekula. Za patologických stavů dochází k nadměrnému hromadění radikálů v těle a nedostatečné antioxidační ochraně organismu, následnému vzniku oxidačního stresu a zvýšené koncentraci 4-hydroxynonenalu. Jedná se o kardiovaskulární, neurodegenerativní onemocnění či rakovinotvorné procesy. Jako prevence může sloužit snížený příjem polynenasycených mastných kyselin, které jsou hlavním substrátem pro zvýšenou peroxidaci lipidů a následný vznik volných radikálů.

Zvýšená koncentrace asymetrického dimethylargininu je v důsledku působení oxidačního stresu, který způsobuje zvýšení exprese protein-arginin-methyltransferáz, enzymů podílejících se na procesu methylace argininu, a snížení aktivity dimethylarginindimethylaminohydrolázy, enzymu podílejícího se na jeho degradaci. Asymetrický dimethylarginin inhibuje aktivitu syntázy oxidu dusnatého, podílí se na endoteliální dysfunkci představující první krok v procesu aterosklerozy a kardiovaskulárních onemocnění.

Zdroje

- ŠTÍPEK, Stanislav a kolekt.. Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. Praha: Grada, 2000. ISBN 80-716-9704-4.
- DUAN, Xiaochun, Zunjia WEN, Haitao SHEN, Meifen SHEN a Gang CHEN. Intracerebral hemorrhage, oxidative stress, and antioxidant therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016, 2016, 1-17. doi: 10.1155/2016/1203285
- KURUTAS, Ergul Belge. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition Journal*. 2016, **15**(1), 1-22. doi: 10.1186/s12937-016-0186-5
- DIMITROULAS, Theodoros, Amer SANDOO a George D. KITAS. Asymmetric dimethylarginine as a surrogate marker of endothelial dysfunction and cardiovascular risk in patients with systemic rheumatic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012, **13**(10), 12315-12335. doi: 10.3390/ijms131012315
- CHEN, Shufen, Na LI, Milani DEB-CHATTERJI, Qiang DONG, Jan KIELSTEIN, Karin WEISSENBORN a Hans WORTHMANN. Asymmetric dimethylarginine as marker and mediator in ischemic stroke. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012, **13**(12), 15983-16004. doi: 10.3390/ijms131215983
- ALDÁMIZ-ECHEVARRÍA, Luis a Fernando ANDRADE. Asymmetric dimethylarginine, endothelial dysfunction and renal disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012, **13**(9), 11288-11311. doi: 10.3390/ijms130911288
- TAIN, You-Lin a Li-Tung HUANG. Restoration of asymmetric dimethylarginine–nitric oxide balance to prevent the development of hypertension. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014, **15**(7), 11773-11782. doi: 10.3390/ijms150711773
- ASMAT, Ullah, Khan ABAD a Khan ISMAIL. Diabetes mellitus and oxidative stress—a concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2016, **24**(5), 547-553. doi: 10.1016/j.jsps.2015.03.013
- AYALA, Antonio, Mario F. MUÑOZ a Sandro ARGÜELLES. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014, **2014**(5), 1-31. doi: 10.1155/2014/360438

- CSALA, Miklos, Tamás KARDON, Balázs LEGEZA, Beáta LIZÁK, Jozsef MANDL, Éva MARGITTAI, Ferenc PUSKÁS, Péter SZÁRAZ, Péter SZELÉNYI a Gábor BÁNHEGYI. On the role of 4-hydroxynonenal in health and disease. *BBA-Molecular Basis of Disease*. 2015, **1852**(5), 826-838. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.01.015
- SCHWARZER, Evelin, Paolo ARESE a Eleksii A. SKOROKHOD. Role of the lipoperoxidation product 4-Hydroxynonenal in the pathogenesis of severe malaria anemia and malaria immunodepression. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015:638416, 1-11. doi: 10.1155/2015/638416
- SCHAUR, Rudolf, Werner SIEMS, Nikolaus BRESGEN a Peter M. ECKL. 4-hydroxy-nonenal—a bioactive lipid peroxidation product. *Biomolecules*. 2015, **5**(4), 2247-2337. doi: 10.3390/biom5042247
- RIAHI, Y., G. COHEN, O. SHAMNI a S. SASSON. Signaling and cytotoxin functions of 4-hydroxyalkenals. *AJP Endocrinology and Metabolism*. 2010, **299**(6), 879-886. doi: 10.1152/ajpendo.00508.2010
- DALLEAU, S, M. BARADAT, F. GUÉRAUD a L. HUC. Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death and Differentiation*. 2013, **20**(12), 1615-1630. doi: 10.1038/cdd.2013.138
- SHOEB, Mohammad, Naseem H. ANSARI, Satish K. SRIVASTAVA a Kota V. RAMANA. 4-hydroxynonenal in the pathogenesis and progression of human diseases. *Current Medicinal Chemistry*. 2014, 21(2), 230-237.
- CHAPPLE, Sarah J., Xinghua CHENG, Giovanni E. MANN. Effects of 4-hydroxynonenal on vascular endothelial and smooth muscle cell redox signaling and function in health and disease: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Redox Biology*. 2013, **1**(1), 319-331. doi: 10.1016/j.redox.2013.04.001
- CASTRO, José P., Tobias JUNG, Tilman GRUNE a Werner SIEMS. 4-hydroxynonenal (HNE) modified proteins in metabolit diseases. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.497
- MATTSON, Mark P. Roles of the lipid peroxidationproduct 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. *Experimental Gerontology*. 2009, **44**(10), 625-633. doi: 10.1016/j.exger.2009.07.003
- ADIBHATLA, Rao M. a J. F. HATCHER. Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation nn CNS pathologies. *BMB Rep*. 2008, **41**(8), 560-567.

- ZHONG, Huigin a Huiyong YIN. Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: focusing on mitochondria. *Redox Biology*. 2015, 4, 193-199. doi: 10.1016/j.redox.2014.12.011
- LLUCH, Paloma, Gloria SEGARRA a Pascual MEDINA. Asymmetric dimethylarginine as a mediator of vascular dysfunction in cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology*. 2015, 21(32), 9466-9475. doi: 10.3748/wjg.v21.i32.9466
- ZAKRZEWICZ, Darius a Oliver EICKELBERG. From arginine methylation to ADMA: A novel mechanism with therapeutic potential in chronic lung diseases. *BioMed Central Pulmonary Medicine*. 2009, 9(5). doi: 10.1186/1471-2466-9-5
- GAYATRI, Sitaram a Mark T. BEDFORD. Readers of histone methylarginine marks. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2014, 1839(8), 702-710. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.02.015
- BADRAN, Mohammad, Saeid GOLBIDI, Najib AYAS a Ismail LAHER. Nitric Oxide bioavailability in obstructive sleep apnea: interplay of asymmetric dimethylarginine and free radicals. *Sleep Disorders*. 2015, 2015, 1-10. doi: 10.1155/2015/387801
- National Center for Biotechnology Information. PubChemCompound Database
- ŠIROKÁ R., J. RACEK a J. FILIPOVSKÝ. Asymetrický dimethylarginin (ADMA). *Klin. Biochem. Metab.* 2005, 13(34), 131-134.
- SERVILLO, Luigi, Alfonso GIOVANE, Nunzia D'ONOFRIO, Rosario CASALE, Domenico CAUTELA, Domenico CASTALDO a Maria BALESTRIERI. Determination of homoarginine, arginine, NMMA, ADMA, and SDMA in biological samples by HPLC-ESI-mass spectrometry. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013, 14(10), 20131-20138. doi: 10.3390/ijms141020131
- POPE, Arthur J., Kanchana KARUPPIAH a Arturo J. CARDOUNEL. Role of the PRMT–DDAH–ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production. *Pharmacological Research*. 2009, 60(6), 461-465. doi: 10.1016/j.phrs.2009.07.016
- TEERLINK, Tom, Zaiming LUO, Fredrik PALM a Christopher S. WILCOX. Cellular ADMA: regulation and action. *Pharmacological Research*. 2009, 60(6), 448-460. doi: 10.1016/j.phrs.2009.08.002
- RODIONOV, Roman N., Jens MARTENS-LOBENHOFFER, Silke BRILLOFF, Dmitry V. BURDIN, Natalia JARZEBSKA, Anton V. DEMYANOV, Bernd HOHENSTEIN, Norbert WEISS a Stefanie M. BODE-BOGER. Acetylation of asymmetric and symmetric dimethylarginine: an under characterized pathway of metabolism of endogenous methylarginines. *Nephrol Dial Transplant*. 2015, 31(1), 57-63. doi: 10.1093/ndt/gfv390

- SITAR, Mustafa E. Asymmetric dimethylarginine and its relation as a biomarker in nephrologic diseases. *Biomarker Insights*. 2016, **11**, 131-137. doi: 10.4137/BMI.S38434

- VAIRAPPAN, Balasubramanian. Endothelial dysfunction in cirrhosis: role of inflammation and oxidative stress. *World Journal of Hepatology*. 2015, **7**(3), 443-459. doi: 10.4254/wjh.v7.i3.443

- KONYA, Hiroyuki, Masayuki MIUCHI, Kahori SATANI, Satoshi MATSUTANI, Yuzo YANO, Taku TSUNODA, Takashi IKAWA, Toshihiro MATSUO, Fumihiro OCHI, Yoshiki KUSUNOKI, Masaru TOKUDA, Tomoyuki KATSUNO, Tomoya HAMAGUCHI, Jun-ichiro MIYAGAWA a Mitsuyoshi NAMBA. Asymmetric dimethylarginine, a biomarker of cardiovascular complications in diabetes mellitus. *WorldJournal of Experimental Medicine*. 2015, **5**(2), 110-119. doi: 10.5493/wjem.v5.i2.110

- FERRIGNO, Andrea, Laura G Di PASQUA, Clarissa BERARDO, Plinio RICHELMI a Mariapia VAIRETTI. Liver plays a central role in asymmetric dimethylarginine-mediated organ injury. *World Journal of Gastroenterology*. 2015, **21**(17), 5131-5137. doi: 10.3748/wjg.v21.i17.5131

- CHAWLA, Aastha, Rajeev CHAWLA a Shalini JAGGI. Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2016, **20**(4), 546-551. doi: 10.4103/2230-8210.183480

- HE, Lisha, Han WANG, Chengjuan GU, Xinhui HE, Linhua ZHAO a Xiaolin TONG. Administration of traditional chinese blood circulation activating drugs for microvascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes Research*. 2016, **2016**, 1-9. doi: 10.1155/2016/1081657

- OLIVEIRA, J.S., A. A. N. SILVA, V. A. SILVA JUNIOR. Phytotherapy in reducing glycemic index and testicular oxidative stress resulting from induced diabetes: a review. *Brazilian Journal of Biology*. 2016, **77**(1). doi: 10.1590/1519-6984.09915

- MIRANDA-DÍAZ, Alejandra Guillermina, Leonardo PAZARÍN-VILLASEÑOR, Francisco Gerardo YANOWSKY-ESCATELL a Jorge ANDRADE-SIERRA. Oxidative stress in diabetic nephropathy with early chronic kidney disease. *Journal of Diabetes Research*. 2016, **2016**, 1-7. doi: 10.1155/2016/7047238

- PRATTICHIZZO, Francesco, Valeria DE NIGRIS, Lucia LA SALA, Antonio Domenico PROCOPIO, Fabiola OLIVIERI a Antonio CERIELLO. „Inflammaging”

- as a druggable target: a senescence-associated secretory phenotype-centered view of type 2 diabetes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016, **2016**, 1-10. doi: 10.1155/2016/1810327
- DEROSA, Giuseppe a Pamela MAFFIOLI. A review about biomarkers for the investigation of vascular function and impairment in diabetes mellitus. *Vascular Health and Risk Management*. 2016, **12**, 415-419. doi: 10.2147/VHRM.S64460
 - ENGIN, Ayse B. a Atilla ENGIN. Endothelium – Molecular aspects of metabolit disorders. 2013. ISBN 9781466582798
 - LEONG, T., D. ZYLBERSTEIN, I. GRAHAM, et al. Asymmetric dimethylarginine in dependently predicts fatal and nonfatal myocardial infarction and stroke in women: 24-year follow-up ofthe population study of women in gothenburg. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2008, **28**(5), 961-967. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.156596