

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Analýza a biologické účinky nitrovaných mastných
kyselin v rostlinách**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Hana Němčáková
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Termín odevzdání práce:	26. 4. 2010

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 26. 4. 2010

Poděkování

Děkuji Mgr. Marku Petřivalskému, Dr. za odborné vedení, poskytnutí literatury a za cenné rady a připomínky při experimentální práci i při konečném zpracování diplomové práce.

Poděkování patří také Mgr. Kateřině Václavíkové a Mgr. Petru Tarkowskému, Ph.D. za konzultace a provedení analýzy hmotnostní spektrometrií.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Hana Němčáková
Název práce	Analýza a biologické účinky nitrovaných mastných kyselin v rostlinách
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok obhajoby práce	2010
Abstrakt	<p>Oxid dusnatý (NO) je již řadu let známý jako signální molekula účastnící se řady důležitých regulačních mechanismů za fyziologických i patologických podmínek. NO a další reaktivní formy dusíku reagují s lipidy obsahujícími nenasycené mastné kyseliny za vzniku nitrovaných sloučenin. Výskyt, funkce a biologické účinky nitrovaných mastných kyselin byly zatím pouze omezeně popsány u živočichů.</p> <p>Tato práce se zabývá studiem kyselin nitroolejové (OA-NO₂) a nitrolinolové (LNO₂). Tyto nitrované mastné kyseliny se nacházejí zejména ve volné formě v krvi a ve formě esterů v lipoproteinech krevní plazmy a membráně červených krvinek. Stimulují relaxaci hladké svaloviny, ovlivňují funkci krevních destiček a neutrofilů a influx vápníku do buněk. V poslední době jsou také studovány jako účinný ligand receptorů aktivujících proliferaci peroxisomů (PPARs). Bylo popsáno, že kyselina nitroolejová působí jako irreverzibilní inhibitor xanthinoxidasy (XOD). U rostlin nebyly tyto látky zatím prozkoumány. Praktická část práce zahrnovala syntézu a analýzu OA-NO₂ a LNO₂. Analýza byla provedena pomocí metod HPLC a LC-MS. S použitím komerčně dostupné kyseliny nitroolejové byla v získaném preparátu stanovena její koncentrace. Preparáty byly použity pro studium účinku nitrovaných mastných kyselin na životnost a produkci NO a ROS u protoplastů z <i>Arabidopsis thaliana</i>. Dále byla purifikována XOD z kravského mléka. Byla stanovena její aktivita a inhibice kyselinou nitroolejovou. Výsledky byly porovnány měřením s komerčně dostupnou XOD z podmásli a bakteriální XOD. Pro srovnání inhibicí byl pro měření použit syntetický inhibitor XOD allopurinol. Detekce preparátů nitrovaných mastných kyselin ze syntézy byla provedena autografickou metodou po chromatografii na tenké vrstvě. Byly potvrzeny inhibiční účinky OA-NO₂ u xanthinoxidasy. Dále bylo zjištěno, že nitrované mastné kyseliny mají pozitivní vliv na životnost protoplastů.</p>
Klíčová slova	Oxid dusnatý, kyselina nitroolejová, kyselina nitrolinolová, xanthinoxidasa, protoplasty.
Počet stran	86
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Hana Němčáková
Title	Analysis and biological effects of nitrated fatty acids in plants
Type of thesis	Master
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
The year of presentation	2010
Abstract	<p>Nitric oxide (NO) has been known for many years as a signalling molecule participating in many important regulatory mechanisms under physiological and pathological conditions. NO and other reactive forms of nitrogen react with lipids containing unsaturated fatty acid to yield nitrated compounds. Presence, function and biological influences of nitrated fatty acids have been described only in animals.</p> <p>This thesis concerns with the research of nitrooleic and nitrolinoleic acids. They are present both as free and esterified species in human red cell membranes and plasma lipids. They stimulate the relaxation of smooth muscles, influence the function of platelets and neutrophils and calcium influx into cells. Recently this species have been studied as efficient ligands for peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs). It was reported that nitrooleic acid is irreversible inhibitor of xanthin oxidase (XOD). These compounds have not been studied in plants so far.</p> <p>The experimental part contains the synthesis and analysis of nitrooleic acid and nitrolinoleic acid (OA-NO₂ and LNO₂). The methods of HPLC and LC-MS were used. The concentration of nitrooleic acid in preparation was determined by using commercial standard of nitrooleic acid. The obtained compound was used for the research of the influence of nitrated fatty acid on viability and production of NO and ROS in protoplasts from <i>Arabidopsis thaliana</i>. The XOD was purified from bovine milk. Its activity and inhibition by nitrooleic acid was measured. The results were compared by measuring activity and inhibition of commercial XOD from butter milk and XOD from microorganisms. Synthetic inhibitor allopurinol was used to compare the inhibitions. The TLC autographic method for the detection of nitrated fatty acid from synthesis was used. The inhibitory effect of OA-NO₂ in XOD was confirmed. It was determined that nitrated fatty acids have positive effect on protoplast viability.</p>
Keywords	Nitric oxide, nitrooleic acid, nitrolinoleic acid, xanthin oxidase, protoplasts.
Number of pages	86
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

CÍLE PRÁCE	8
TEORETICKÁ ČÁST	9
1 Úvod	10
1.1 Oxid dusnatý - prekursor nitrovaných mastných kyselin	10
2 Struktura a chemické vlastnosti nitrovaných mastných kyselin	11
2.1 Kyselina nitrolinolová	11
2.2 Kyselina nitroolejová.....	13
2.3 Další nitrované mastné kyseliny.....	14
3 Mechanismy vzniku nitrovaných mastných kyselin	15
3.1 Oxidativní reakce NO.....	15
3.2 Reakce NO s oxidovanými mastnými kyselinami.....	17
3.3 Nitrace mastných kyselin reaktivními formami dusíku.....	18
4 Stabilita a biochemické reakce nitrovaných mastných kyselin	19
4.1 Rozklad a uvolnění NO z LNO ₂	19
4.1.1 Mechanismus uvolnění NO z LNO ₂	21
4.1.2 Detekce NO při rozkladu LNO ₂	22
4.2 Nitrované mastné kyseliny a hemoxygenasa.....	23
4.3 Kovalentní modifikace thiolových skupin.....	23
4.4 LNO ₂ jako endogenní ligand PPAR receptoru	24
4.4.1 Peroxisomy	24
4.4.2 Produkce signálních molekul v peroxisomech	26
4.4.3 Receptory aktivující proliferaci peroxisomů (PPARs)	28
4.4.4 Ligandy PPAR γ	30
4.4.5 Mechanismus vazby ligandů na PPAR γ	30
5 Příklady reakcí nitrovaných mastných kyselin s proteiny	33
5.1 Kyselina nitroolejová - ireversibilní inhibitor xanthinoxidoreduktasy	34
5.2 Inhibice glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasy.....	36
5.3 Inhibice transkripčního faktoru NF- κ B	36
5.4 Aktivace transkripčních faktorů Keap1/Nrf2	37
5.5 Nitrované mastné kyseliny a glutathiontrasferasy	38
6 Protizánětlivé účinky	38
7 Možnosti syntézy a analýzy nitrovaných mastných kyselin	40
7.1 Syntéza LNO ₂ a OA-NO ₂	40
7.2 Možnosti analýzy nitrovaných mastných kyselin.....	41
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	Chyba! Záložka není definována.

- 8 Materiál** Chyba! Záložka není definována.
- 8.1 Rostlinný materiál **Chyba! Záložka není definována.**
- 8.2 Chemikálie..... **Chyba! Záložka není definována.**
- 8.3 Přístrojové vybavení..... **Chyba! Záložka není definována.**
- 9 Použité metody** Chyba! Záložka není definována.
- 9.1 Syntéza nitrovaných mastných kyselin..... **Chyba! Záložka není definována.**
- 9.2 Purifikace LNO₂ na kolonce silikagelu..... **Chyba! Záložka není definována.**
- 9.3 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) **Chyba! Záložka není definována.**
- 9.4 Příprava extraktu z hrachu..... **Chyba! Záložka není definována.**
- 9.5 HPLC analýza OA-NO₂..... **Chyba! Záložka není definována.**
- 9.6 LC-MS analýza..... **Chyba! Záložka není definována.**
- 9.7 Izolace XOD z mléka **Chyba! Záložka není definována.**
- 9.8 Stanovení aktivity XOD/XDH..... **Chyba! Záložka není definována.**
- 9.9 Detekce inhibitorů XOD..... **Chyba! Záložka není definována.**
- 9.10 Stanovení obsahu proteinů **Chyba! Záložka není definována.**
- 9.11 SDS elektroforéza..... **Chyba! Záložka není definována.**
- 9.12 Nativní elektroforéza **Chyba! Záložka není definována.**
- 9.13 Detekce aktivity XDH-XOD v gelech po nativní elektroforéze... **Chyba! Záložka není definována.**
- 9.14 Izolace protoplastů z *Arabidopsis thaliana* **Chyba! Záložka není definována.**
- 9.15 Stanovení životnosti protoplastů metodou FDA..... **Chyba! Záložka není definována.**
- 9.16 Detekce ROS a NO..... **Chyba! Záložka není definována.**
- 9.17 Studium účinku nitrovaných mastných kyselin na listových discích z *A. thaliana*
Chyba! Záložka není definována.
- 9.18 Měření obsahu chlorofylu v listových discích..... **Chyba! Záložka není definována.**
- 10 Výsledky** Chyba! Záložka není definována.
- 10.1 Syntéza a analýza nitrovaných mastných kyselin.... **Chyba! Záložka není definována.**
- 10.2 Kyselina nitroolejová jako inhibitor xanthinoxidasy..... **Chyba! Záložka není definována.**
- 10.3 Studium biologických účinku nitrovaných mastných kyselin **Chyba! Záložka není definována.**
- 10.3.1 Vliv nitrovaných mastných kyselin na životnost izolovaných protoplastů.. **Chyba! Záložka není definována.**
- 10.3.2 Vliv nitrovaných mastných kyselin na životnost stresovaných protoplastů **Chyba! Záložka není definována.**
- 10.3.3 Vliv nitrovaných mastných kyselin na listové disky **Chyba! Záložka není definována.**
- 11 Diskuse**..... Chyba! Záložka není definována.
- 12 Závěr**..... Chyba! Záložka není definována.

POUŽITÉ ZKRATKY	44
LITERATURA	47

CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části diplomové práce bylo přehledné shrnutí aktuálních poznatků o:

1. Chemických vlastnostech nitrovaných lipidů se zaměřením na nitrované mastné kyseliny
2. Výskytu a biologických vlastnostech nitrovaných lipidů u živočichů
3. Metodách syntézy a analýzy nitrovaných lipidů

Praktická část práce byla zaměřena na:

1. Syntézu a purifikaci nitrovaných mastných kyselin
2. Zavedení vybraných metod kvalitativní a kvantitativní analýzy nitrovaných mastných kyselin
3. Studium biologických účinků nitrovaných mastných kyselin *in vitro* a *in vivo*

TEORETICKÁ ČÁST

1 Úvod

1.1 Oxid dusnatý - prekursor nitrovaných mastných kyselin

Oxid dusnatý (NO) je plynný volný radikál s nepárovým elektronem, který je schopen regulovat řadu biologických procesů. Jeho role signální molekuly byla objevena před více než 20 lety a jeho funkce se stala jednou z nejvíce studovaných oblastí v biologii a fyziologii. NO je jednoduchá molekula s řadou různých funkcí, které vyplývají z jeho schopnosti reagovat s přechodnými kovy, thiolovými skupinami, dalšími volnými radikály, kyslíkem, superoxidovým aniontem, nenasyčenými mastnými kyselinami a dalšími molekulami (Murrad, 1999).

Oxid dusnatý je důležitá signální molekula ve všech typech organismů. NO je lipofilní volný radikál s malou molekulovou hmotností, který je značně reaktivní (Rubbo et al., 2004) a je schopen ovlivňovat řadu různých biologických procesů v buňkách (Lim et al., 2002). V savčích buňkách vzniká NO např. v endotelu, nervových buňkách, buňkách hladké svaloviny, makrofázích, neutrofilech a trombocytech (Rubbo et al., 1994). NO stimuluje aktivitu guanylátcyklasy a tím způsobuje relaxaci hladké svaloviny. NO dále inhibuje shlukování krevních destiček, přilnavost leukocytů k cévní stěně, ovlivňuje neurotransmisi a podílí se na regulaci genové exprese a posttranslačních modifikacích proteinů (Baker et al., 2004; Lim et al., 2002). V rostlinách je NO klasifikován jako růstový regulátor a signální molekula, která hraje významnou roli při regulaci fyziologických procesů i v obranných mechanismech při napadení patogenem a při iniciaci buněčné smrti (Del Río et al., 2002).

Signální reakce NO jsou obecně přenášeny vazbou NO na reaktivní místa cílových proteinů nebo prostřednictvím sekundárních produktů, vzniklých redoxními reakcemi NO. Nízká koncentrace NO aktivuje proteiny obsahující hem (guanylátcyklasa), zatímco proteiny neobsahující hem (akonitasa a lipoxygenasa) jsou NO inhibovány (Rubbo et al., 1994). Redoxní reakce NO poskytují řadu dusíkatých sloučenin, které slouží jako nitrační a oxidační činidla: oxid dusitý (N_2O_3), oxid dusičitý (NO_2), peroxydusitan ($ONOO^{\cdot}$), nitrosothioly (RSNO). Ty vykazují jak specifickou, tak částečně shodnou reaktivitu s NO, a mohou se podílet na regulaci rozdílných buněčných funkcí a to mechanismy závislými i nezávislými na cGMP. Reaktivní formy dusíku slouží k přenosu signálu NO, kdy oxidační, nitrační a nitrosační reakce vyvolají změny ve struktuře a funkci cílových molekul (Schopfer et al., 2005). Reakce RNS s nenasyčenými mastnými kyselinami poskytují oxidační a nitrační produkty jako nitro-, nitrito- a nitroepoxyderiváty (Coles et al., 2002). Při zvýšené a nekontrolované produkci může být NO také pro organismus toxický. Inhibuje syntézu DNA a proteinů a reaguje s enzymy dýchacího řetězce mitochondrií obsahujícími železo a síru (Del Río et al., 2002).

Reaktivní formy kyslíku (ROS) a reaktivní formy dusíku (RNS) zprostředkovávají různé patologické procesy při kardiovaskulárních, plicních a neurodegenerativních nemocech. RNS vznikají rychlou reakcí mezi ROS a oxidem dusnatým nebo oxidací dusičnanu peroxidasou, ROS (peroxidem vodíku) a reaktivními formami halogenů (Kalyanaraman, 2004).

RNS reagují se sacharidy, DNA bázemi, postranními řetězci aminokyselin tyrosinem a tryptofanem a nenasycenými mastnými kyselinami za vzniku relativně stálých nitrovaných produktů (Kalyanaraman, 2004). V souvislosti s buněčnou signalizací, signální molekuly odvozené od NO regulují aktivitu proteinkinasy a fosfatasy, funkci stavebních proteinů, citlivost transkripčních faktorů vůči redoxním reakcím, mitochondriální respiraci, apoptózu a celkově ovlivňují redoxní stav buňky (Wright et al., 2006).

V poslední době roste zájem o studium nitrovaných mastných kyselin jako biologicky aktivních látek odvozených od NO. Tyto látky byly zatím zkoumány pouze u živočišných buněk. O vzniku a funkci těchto látek v rostlinných buňkách zatím nebyly publikovány žádné zprávy. Nenasycené mastné kyseliny tvoří hlavní součást buněčných membrán a krevních lipoproteinů (O'Donnell et al., 1999). Nitrované mastné kyseliny vykazují schopnosti buněčné signalizace (Wright et al., 2006) a reprezentují tak velkou skupinu látek patřících mezi tzv. bioaktivní formy oxidů dusíku. V tělních tekutinách a některých tkáních byly nalezeny zejména nitrované mastné kyseliny olejová, arachidonová a linolová (Kalyanaraman, 2004).

2 Struktura a chemické vlastnosti nitrovaných mastných kyselin

2.1 Kyselina nitrolinolová

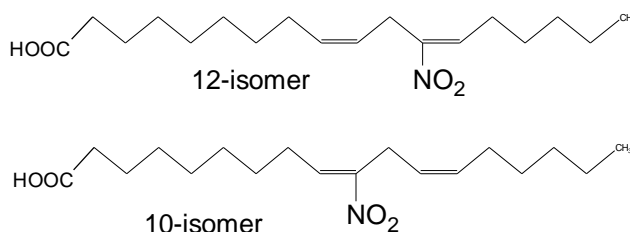
Kyselina nitrolinolová (LNO_2), produkt nitrace kyseliny linolové, se nachází volná v krvi a ve formě esterů v lipoproteinech krevní plasmy a membráně červených krvinek v koncentraci přibližně 500 nM. Tabulka č. 1 ukazuje výskyt dalších biologicky aktivních látek odvozených od NO v lidské krvi ve srovnání s LNO_2 (Baker et al., 2004).

Tab. 1 Výskyt biologicky aktivních derivátů NO v lidské krvi (převzato z Baker et al., 2004).

Sloučenina	Zdroj	Forma	Koncentrace (nM)
NO_2^-	plasma	celková	205 ± 21
RSNO	plasma	celková	$7,2 \pm 1,1$
3-nitro-tyrosin	plasma	celková	$0,74 \pm 0,03$
Hb-NO	krev	celková	<50
Hb-SNO	krev	celková	0 - 150
LNO₂	krev	celková	477 ± 128
LNO₂	plasma	volná	79 ± 35
		esterifikovaná	550 ± 275
		celková	630 ± 240
LNO₂	červené krvinky	volná	50 ± 17
		esterifikovaná	199 ± 121
		celková	249 ± 104

RSNO, S-nitrosothioly; Hb-NO, nitrosylovaný hem; Hb-SNO, S-nitrosohemoglobin

V lidském cévním systému představuje LNO₂ zástupce skupiny látek, které jsou biologicky aktivními formami NO. LNO₂ vzniká nitrací kyseliny linolové, kdy nitrace probíhá nejčastěji na uhlíku C-10 a C-12. Tím vznikají polohové izomery 10-nitro a 12-nitro-9,12-oktadekadienová kyselina (obr. 1). Další dva izomery s nitroskupinou v poloze na uhlíku C-9 a C-13 jsou výrazně méně stabilní a proto nejsou v biologických vzorcích pozorovány (Baker et al., 2004).



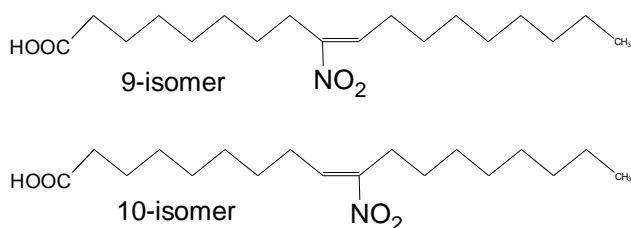
Obr. 1 Polohové izomery kyseliny nitrolinolové.

Nedávná pozorování objevila, že LNO₂ je signální mediátor, který funguje v drahách závislých i nezávislých na specifických receptorech. Nitrované mastné kyseliny byly charakterizovány jako specifické a vysoce afinitní endogenní ligandy receptorů pro proliferaci peroxisomů (PPAR γ) a ve fyziologické koncentraci slouží k aktivaci genové exprese závislé na

těchto receptorech. V neutrofilech a trombocytech LNO₂ aktivuje signální dráhy proteinkinasy závislé na cAMP (Schopfer et al., 2005).

2.2 Kyselina nitroolejová

Kyselina nitroolejová (OA-NO₂) existuje, stejně jako LNO₂, ve 2 polohových isomerech (obr. 2) a nachází se v krevní plasmě, červených krvinkách a v moči (tab. 2). V krvi je koncentrace OA-NO₂ asi o 50 % větší než koncentrace LNO₂. OA-NO₂ je ve vodném prostředí stabilnější než LNO₂ a je také silnějším ligandem receptoru PPAR γ (Baker et al., 2005).



Obr. 2 Polohové isomery kyseliny nitroolejové.

V tabulce č. 2 je porovnán výskyt kyselin nitroolejové a nitrolinolové (Baker et al., 2005).

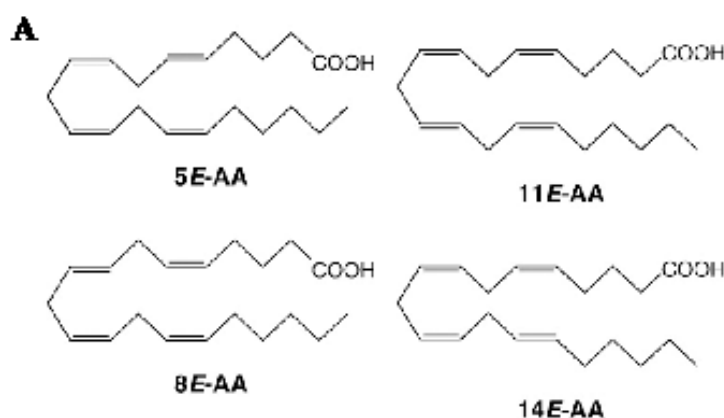
Tab. 2 Koncentrace kyselin nitroolejové a nitrolinolové v tělních tekutinách člověka (Baker et al., 2005).

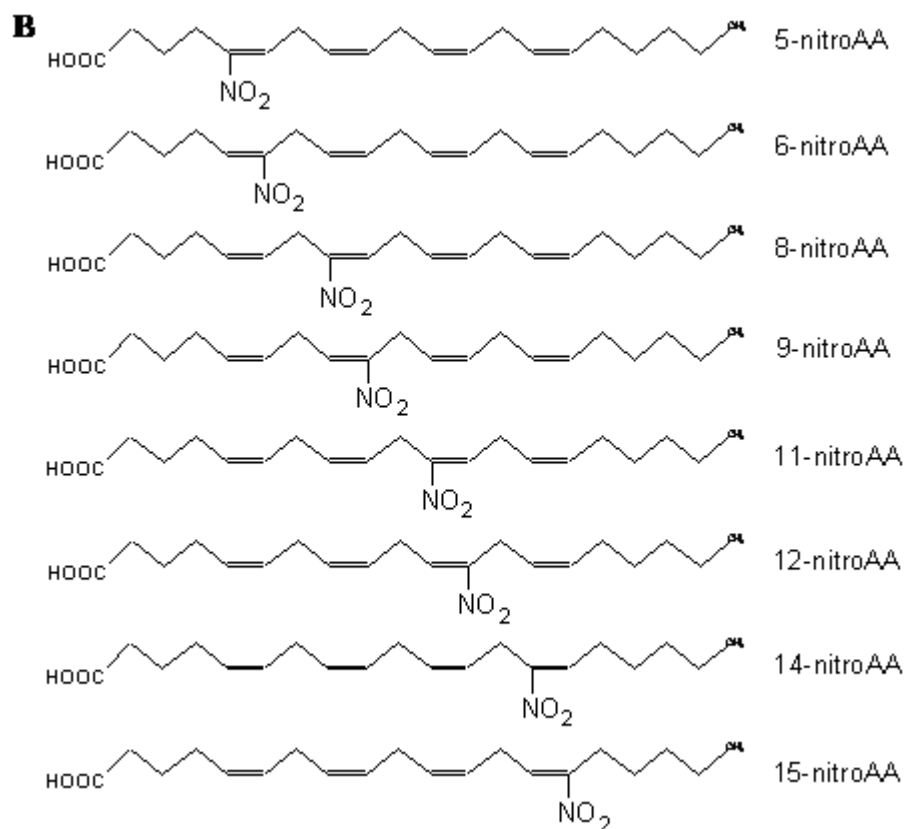
Zdroj	Forma	Koncentrace	
		OA-NO ₂	LNO ₂
plasma	volná	619 ± 52	79 ± 35
	esterifikovaná	302 ± 369	550 ± 275
	celková	921 ± 421	630 ± 240
červené krvinky	volná	59 ± 11	50 ± 17
	esterifikovaná	155 ± 65	199 ± 121
	celková	214 ± 76	249 ± 104
krev	celková	639 ± 366	477 ± 128
moč		5,40 ± 52	2,28 ± 0,84

2.3 Další nitrované mastné kyseliny

Kromě LNO₂ a OA-NO₂ byly popsány také nitrované kyseliny palmitová, linolenová, arachidonová a eikosapentanová a také jejich nitrohydroxyderiváty.

Kyselina arachidonová (AA) má unikátní strukturu - 20-ti uhlíkatou kostru se čtyřmi *cis* dvojnými vazbami. Je prekursorem možných signálních molekul jako jsou prostaglandiny, thromboxany a isoprostany (Trostchanski & Rubbo, 2008). Reakcí AA a radikálem NO₂ nebo jeho prekursory se vytváří skupina nitrolipidů – nitroeikosanoidů. Jako vedlejší produkty této reakce vznikají čtyři *trans*isomery kyseliny arachidonové (TAA, obr. 3a). Tato *trans-cis* isomerace je z biologického hlediska velmi důležitá. Při patologických stavech, u nichž dochází k tvorbě radikálu NO (např. zánět, vystavení cigaretovému kouři), roste hladina TAA v buňkách, tkáních a oběhovém systému. TAA pravděpodobně slouží jako specifický biomarker při patologických stavech. Na obr. 3b jsou znázorněny nitroderiváty kyseliny arachidonové (Balazy & Chemtob, 2008; Trostchansky et al., 2007).





Obr. 3 Struktury *trans*-arachidonových kyselin (AA) a nitroarachidonových kyselin (nitroAA) (Balazy & Chemtob, 2008; Trostchansky et al., 2007).

V lipoproteinech lidské plazmy byly také nalezeny a charakterizovány nitroderiváty cholesteryllinolátu (Lima et al., 2003).

3 Mechanismy vzniku nitrovaných mastných kyselin

Jsou známy dva hlavní možné mechanismy vzniku nitrovaných mastných kyselin:

1. reakcemi NO s peroxylovým radikálem, vznikajícím oxidací nenasycených mastných kyselin - tyto reakce inhibují peroxidaci lipidů a mají tedy antioxidační funkci.
2. reakcemi NO a reaktivních forem dusíku s nenasycenými mastnými kyselinami.

3.1 Oxidativní reakce NO

Reakce NO s reaktivními formami kyslíku nejsou závislé na cGMP. Hlavní koncovými produkty metabolismu NO v aerobním prostředí živočišných tkání a tělních tekutin jsou dusitany a dusičnany, které jsou vylučovány močí. Během metabolismu na konečné relativně

stálé metabolity $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ poskytuje oxid dusnatý mnoho reaktivních forem dusíku s různými oxidačními stavy (tab. 3; Bloodsworth et al., 2000).

Tab. 3 Biologicky důležité reaktivní formy dusíku (upraveno podle Bloodsworth et al., 2000).

Značka	Ox. stav	Název	Funkce
NO^-	+1	Nitroxylový anion	relaxace hladké svaloviny
N_2O	+1	Oxid dusný	anestézie
NO	+2	Oxid dusnatý	vasodilatace, neurotransmise, agregace krevních destiček
NO^+	+3	Nitrosylový kation	nitrosace, mutagen oxidace
NO_2^-	+3	Dusitan	koncový produkt oxidace
N_2O_3	+3	Oxid dusitý	oxidace, nitrosace
NO_2	+4	Oxid dusičitý	oxidace
N_2O_4	+4	Dimer oxidu dusičitého	nitrosace
ONOO^-	+5	Peroxydusitan	oxidace, nitrace, antimikrobiální funkce
NO_2^+	+5	Nitrylový kation	oxidace, nitrace
NO_3^-	+5	Dusičnan	koncový produkt nitrace

V aerobních podmínkách reaguje NO s O_2 v relativně pomalé reakci za vzniku oxidu dusičitého (NO_2 , $k = 2 \times 10^6 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$). NO je malá lipofilní molekula bez náboje, což ulehčuje její difúzi v hydrofóbní membráně a lipoproteinech. NO se v membráně relativně zakoncentruje asi 20-krát oproti vodní fázi a reakce s kyslíkem pak v prostředí membrány probíhá rychleji. Tento děj v hydrofóbních částech buňky bývá označován jako „molekulární čočka“ (molecular lens) a usnadňuje oxidace, nitrace a nitrosace vyvolané lipofilními radikály dusíku (Lim et al., 2002).

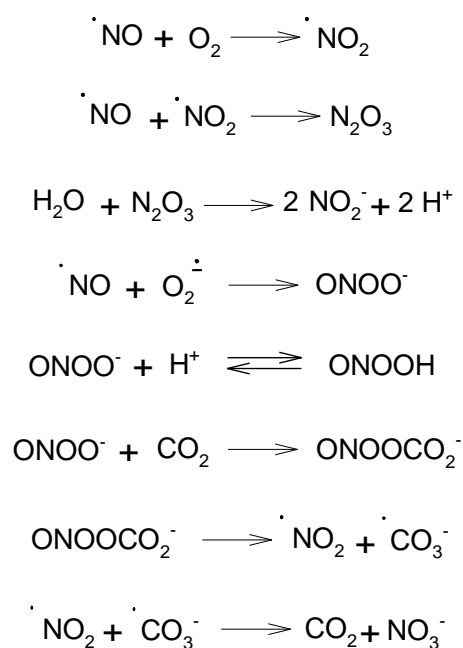
Další možnou reakcí je reakce NO_2 s další molekulou NO za vzniku N_2O_3 a N_2O_4 (Baker et al., 2004). Ve vodném prostředí se N_2O_3 rychle hydrolyzuje na dvě molekuly dusitanu.

Reakcí NO s O_2^- ($k = 1,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) vzniká peroxydusitan (ONOO^-), případně jeho konjugovaná kyselina peroxydusitá (ONOOH , $\text{pK}_a=6,8$). Tato reakce je třikrát rychlejší než rychlost reakce katalyzované superoxidodismutase (SOD, EC 1.15.1.1). Tvorba ONOO^- reprezentuje hlavní možnou dráhu reaktivity NO, která závisí na množství tkáňového O_2^- (Rubbo et al., 1994). Peroxydusitan je silné oxidační činidlo, které přímo aktivuje rozpustnou guanylátcyklastu a s biomolekulami jako je kyselina močová, glukosa a glycerol aj. poskytuje nitro (RNO_2) a nitroso (RONO) sloučeniny, sloužící jako potenciální donory NO (Lim et al., 2002). Může také způsobit oxidativní poškození proteinů, lipidů, sacharidů, organel a DNA

(Rubbo et al., 1994). Transport ONOO⁻ přes membránu probíhá pasivní difúzí nebo iontovými kanálky (O'Donnell et al., 1999).

Stabilita ONOO⁻ je závislá na pH a v buněčném prostředí se snadno rozkládá na NO₂⁻ a NO₃⁻. Tvorba reaktivního meziproduktu s CO₂, nitrosoperoxyuhličitanového aniontu (ONOOCO₂⁻, k = 3x10⁴ M⁻¹ s⁻¹), vede k přeměně reaktivity ONOO⁻ a tedy zvýšení nitračních a oxidačních reakcí (O'Donnell et al., 1999). ONOOCO₂⁻ se následně rozkládá na radikály NO₂ a CO₃⁻, které se přemění na NO₃⁻ a CO₂ (Baker et al., 2004).

Na obr. 4 jsou uvedeny výše popsané reakce.



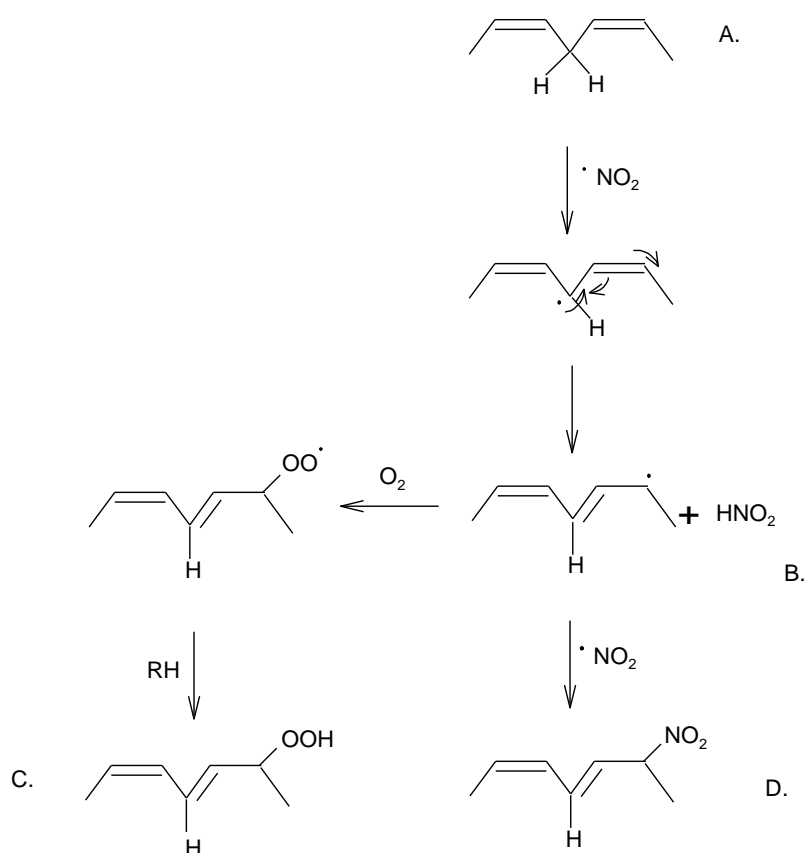
Obr. 4 Přehled oxidativních reakcí NO.

3.2 Reakce NO s oxidovanými mastnými kyselinami

NO a jeho metabolické produkty jsou schopny podle konkrétních podmínek stimulovat i inhibovat oxidaci lipidů. Reakce lipidů s oxidem dusnatým probíhá v závislosti na jeho koncentraci a koncentraci reaktivních forem kyslíku a antioxidantů. Při těchto reakcích jsou spotřebovány dvě molekuly NO na jeden lipidový radikál (ROO[•]). V případě kyseliny nitrolinolové reaguje peroxidový radikál LOO[•] s první molekulou NO za vzniku peroxynitritového meziproduktu LOONO, který se dále přemění na tzv. „klíčkový“ radikál (LO[•]NO₂). Druhá molekula NO pak reaguje s alkoxylovým radikálem LO za vzniku LNO₂ nebo různých epoxyderivátů (Bloodsworth et al., 2000).

3.3 Nitrace mastných kyselin reaktivními formami dusíku

Nitrace mastných kyselin se účastní zejména tyto reaktivní formy dusíku: NO_2 , ONOO^- , HNO_2 a NO_2^+ (Lim et al., 2002). NO_2 , který vzniká výše uvedenými reakcemi (obr. 4), reaguje přímo s lipidy membrán a lipoproteiny (obr. 5). Oxidace nenasycených mastných kyselin je zahájena NO_2 a dochází k dehydrogenaci na allylovém uhlíku. Vzniká kyselina dusitá a rezonančně stabilizovaný allylový radikál lipidu. Tyto formy lipidových radikálů reagují s molekulárním kyslíkem za vzniku peroxidového radikálu nebo mohou reagovat s NO_2 za vzniku širokého spektra nitrovaných produktů.

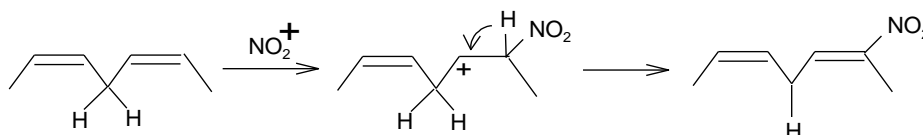


Obr. 5 Schematické znázornění tvorby nitrovaných lipidů. A. Mastná kyselina se působením NO_2 přeměňuje na radikál B. Reakce radikálu B s O_2 poskytuje peroxyradikál a následně hydroperoxy (C.), nebo radikál B reaguje s dalším NO_2 za vzniku konjugovaných nitrosloúčenin (převzato z Lima et al., 2003).

Obdobné nitrované sloučeniny mohou vzniknout nitrací nenasycených mastných kyselin NO_2^- (HNO_2). Tato kyselce katalyzovaná nitrace probíhá v prostředí s nízkou hodnotou pH ($\text{pH} <$

4,0), např. v žaludku (Baker et al., 2004). Peroxidasy, např. myeloperoxydasa katalyzují přeměnu dusitanu na NO_2 , který se pak účastní nitrace (Lim et al., 2002).

Nitrace adicí nitrylového kationtu NO_2^+ je znázorněna na obr. 6 (Lima et al., 2003). Jako zdroj nitrosylu se při nitraci *in vitro* používá např. NO_2BF_4 .



Obr. 6 Nitrace mastných kyselin mechanismem elektrofilní adice za vzniku nekonjugovaných nitrosloúčenin (převzato z Lima et al., 2003).

4 Stabilita a biochemické reakce nitrovaných mastných kyselin

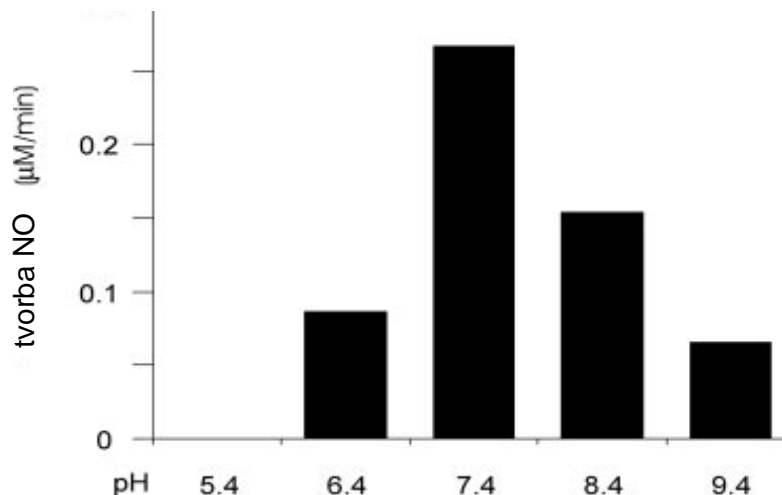
Nitroderiváty mastných kyselin tvoří skupinu endogenních signálních mediátorů, které

- jsou schopny uvolňovat NO
- reagují s Cys a His skupinami proteinů
- slouží jako ligandy PPAR
- indukují expresi hemoxygenasy-1 (HO-1, EC 1.14.99.3) a synthasy oxidu dusnatého (NOS, EC 1.14.13.39).

Elektrofilní vlastnosti nitrovaných mastných kyselin jsou důležité pro jejich biologickou reaktivitu. Jedním aspektem jejich reaktivity je účast v Michaelových adičních reakcích při nízké koncentraci hydroxidových aniontů při fyziologickém pH. Existence rovnováhy mezi nitroalkenovými deriváty a jejich odpovídajícím vicinálními nitrohydroxyderiváty byla potvrzena detekcí nitrohydroxyderivátů v srdeční tkáni, krvi a moči. Z přítomnosti vysoce polárních hydroxylových skupin v nitrohydroxyderivátech mastných kyselin vyplývá, že tyto látky se chovají spíše jako nasycené mastné kyseliny, což se odráží v nižší afinitě k nukleofilním reakcím a vyšší polaritě (Freeman et al., 2008).

4.1 Rozklad a uvolnění NO z LNO_2

LNO_2 , produkt nitrace kyseliny linolové, se rozkládá ve vodném prostředí za současného uvolnění NO. Rychlost uvolnění NO z LNO_2 je maximální při pH 7,4 (obr. 7). Tato tvorba NO z LNO_2 je inhibována v aprotickém prostředí, ve kterém je LNO_2 výrazně stabilnější.

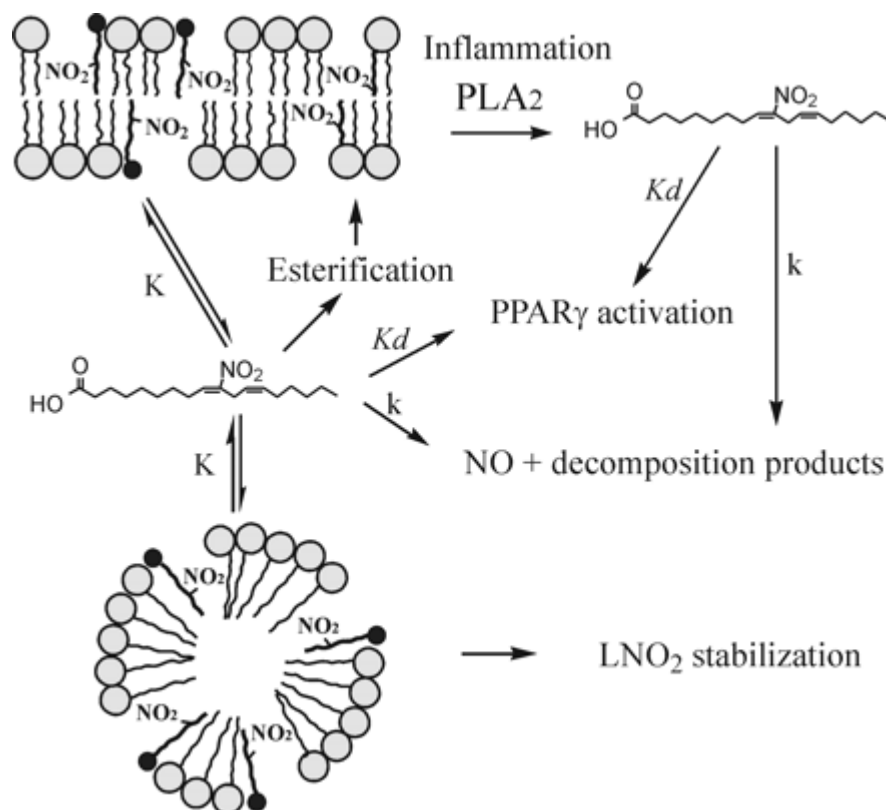


Obr. 7 Uvolnění NO z LNO₂ v závislosti na pH (převzato ze Schopfer et al., 2005).

Nitrované mastné kyseliny jsou vysoce stabilní v polyethylenglykolech, alkoholech a v dalších méně polárních organických rozpouštědlech (Freeman et al., 2008).

Syntetická LNO₂ je stabilizována v hydrofóbním prostředí se složením připomínajícím lipidovou membránu. Důkazem toho je okamžitá inhibice tvorby NO z LNO₂ v prostředí *n*-oktanolu. Podobné výsledky byly získány v experimentech s liposomy, kde se LNO₂ začlenila a stabilizovala v lipidové dvojvrstvě. LNO₂ je tedy stabilní v hydrofóbním prostředí a buněčná membrána a lipoproteiny mohou sloužit jako rezerva LNO₂ a NO (Schopfer et al., 2005). Začlenění nitrovaných mastných kyselin do micel nebo liposomů také inhibuje jejich elektrofilní reakce s thioley (Freeman et al., 2008).

Přibližně 80 % LNO₂ se vyskytuje ve formě esterů. Hlavní roli v regulaci uvolňování LNO₂ hrají lipasa a fosfolipasa (Baker et al., 2004). Při zprostředkování buněčných signálních dějů může být LNO₂ uvolněna z membrány fosfolipasou A₂ (PLA₂). Volná LNO₂ se pak může vázat na receptor nebo se rozložit za uvolnění NO. Regulace rozkladu LNO₂ v lipofilním oproti vodnému prostředí reprezentuje hydrofóbní „přepínač“, který kontroluje biologickou aktivitu LNO₂. Rozdělení LNO₂ mezi různé buněčné části je řízeno rozdělovací konstantou $K \sim 1500$ pro hydrofóbní prostředí (obr. 8; Schopfer et al., 2005). Na základě experimentálních výsledků se však předpokládá, že NO uvolněný z nitrovaných mastných kyselin nemá větší význam v buněčné signalizaci *in vivo* (Freeman et al., 2008).

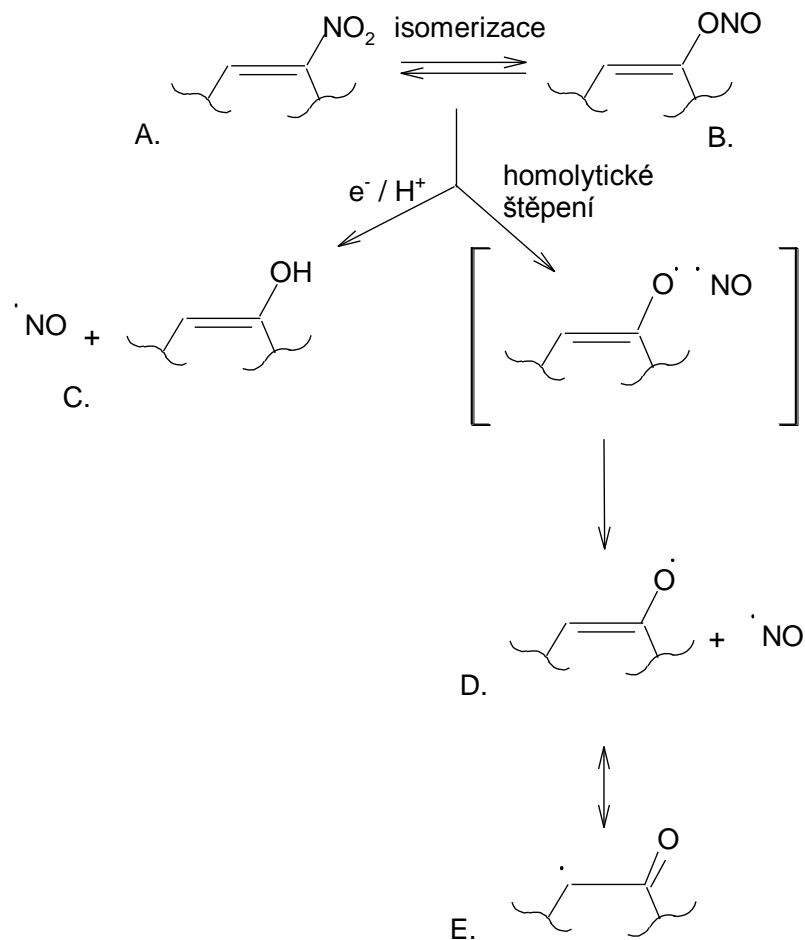


Obr. 8 Stabilizace LNO₂ v membránách a její rozklad ve vodném prostředí (převzato ze Schopfer et al., 2005)

4.1.1 Mechanismus uvolnění NO z LNO₂

Mechanismus uvolnění NO z organických nitrátů a nitritů není stále přesně objasněn a pravděpodobně probíhá v různých podmínkách různými způsoby. V souvislosti s chemickou reaktivitou nitroalkenů byly zjištěny mechanismy, které napomáhají objasnit, jak mohou nitrované mastné kyseliny sloužit k přenosu signálu NO (Schopfer et al., 2005).

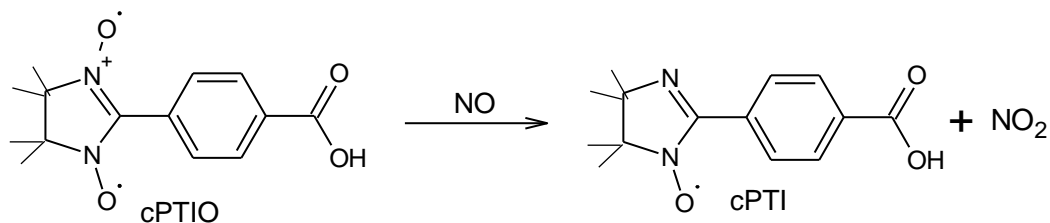
Rozklad nitrovaných lipidů (obr. 9) doprovází izomerizace na odpovídající nitritoderiváty. Následné homolytické štěpení nebo redukce vede k produkci NO. Za podmínek homolytického štěpení budou současně vznikat lipidové radikály. Vodné prostředí bude samozřejmě podporovat rozklad nitrovaných lipidů (Lima et al., 2005).



Obr. 9 Možné mechanismy rozkladu nitrovaných lipidů. Nitrované lipidy (A.) mohou izomerovat na nitritoderiváty (B.), které jsou redukovány (C.) nebo homolyticky štěpeny (D.) a resonanční vzorec (E.) je shodný s lipidovými radikály (převzato z Lima et al., 2005).

4.1.2 Detekce NO při rozkladu LNO_2

K detekci uvolněného NO z LNO_2 se využívá cPTIO jako selektivní lapač NO (obr. 10). Produktem reakce je cPTI, který vykazuje charakteristické EPR spektrum. Uvolnění NO z LNO_2 je závislé na koncentraci a na čase. Rychlost uvolnění NO z LNO_2 lze zjistit pomocí oxyhemoglobinu. LNO_2 oxiduje oxyhemoglobin za vzniku methemoglobinu a dusičnanu. Detekce methemoglobinu pak probíhá fotometricky. Během rozkladu LNO_2 může také vzniknout NO_2^- , stabilní produkt oxidace NO (Schopfer et al., 2005).



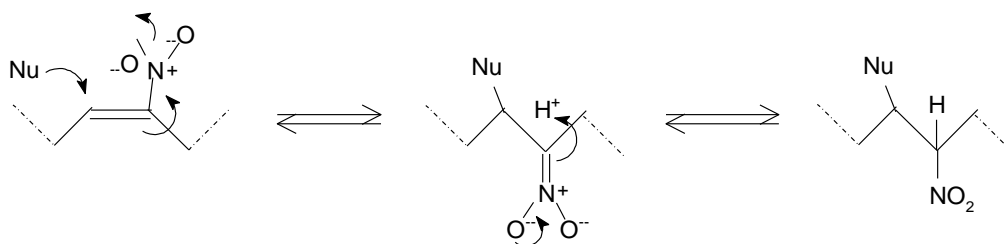
Obr. 10 Detekce uvolněného NO pomocí cPTIO (převzato z Huang et al., 2002).

4.2 Nitrované mastné kyseliny a hemoxygenasa

Oxidativní stres je výsledkem nadměrné produkce ROS nebo vyčerpání intracelulárních antioxidantů, což vede k nerovnováze v redoxním stavu buňky (Noriega et al., 2004). Produkty metabolismu hemu jsou zahrnuté v ochranných systémech proti oxidativnímu stresu, protože se podílí na snižování hladiny ROS. Degradaci hemu katalyzuje enzym hemoxygenasa (HO, EC 1.14.99.3). Hem se rozkládá na biliverdin za současného uvolnění CO a železa. Biliverdin je následně biliverdinreduktasou (EC 1.3.1.24) přeměněn na bilirubin (Wright et al., 2006). Metabolismus hemu je také důležitý ve vztahu k syntéze proteinů obsahujících hem, katalasy (EC 1.11.1.6) a cytochromu P450 (Noriega et al., 2004). LNO₂ indukuje expresi isoformy HO-1. Jak nitroalkeny, tak i HO-1 jsou důležité v signalizaci zánětlivých odpovědí buňky. Lapači NO cPTIO a oxyhemoglobin částečně inhibují indukci HO-1 působením LNO₂ a exprese HO-1 je tedy závislá na NO i na prostředí, ve kterém se LNO₂ vyskytuje. Vodné prostředí totiž usnadňuje uvolňování NO z LNO₂. Indukce HO-1 je také ovlivňována receptorem PPAR γ (Wright et al., 2006).

4.3 Kovalentní modifikace thiolových skupin

Nitroskupina je jeden z nejsilnějších elektronových akceptorů. Vnesením nitroskupiny s alkenem získá výsledný nitroalken elektrofilní vlastnosti, které významně podporují Michaelovu adiční reakci. Mechanismus této reakce je znázorněn na obr. 11 (Baker et al., 2007). Nitrované mastné kyseliny jsou schopné reagovat s nukleofily jako jsou Cys a His skupiny proteinů a glutathionem. Tyto reakce představují posttranslační kovalentní modifikace proteinů a výrazně ovlivňují jejich umístění a funkci. Posttranslační modifikace proteinů oxidativními reakcemi jsou typickými ukazateli zvýšené produkce reaktivních forem dusíku. Produkty reakcí nitrovaných mastných kyselin s proteiny nebo s glutathionem byly detekovány v lidském organismu (Freeman et al., 2007; Baker et al., 2007). Michaelova adiční reakce je reverzibilní. Přímá reakce je podporována při fyziologickém pH a proto jsou thioetherové vazby tvořené mezi nitroalkany a proteiny stabilní (Bates et al., 2009).



Obr. 11 Mechanismus Michaelovy adice: nukleofil (Nu, např. thiolát) atakuje β -uhlík dvojné vazby nitroalkenu (převzato z Baker et al., 2007).

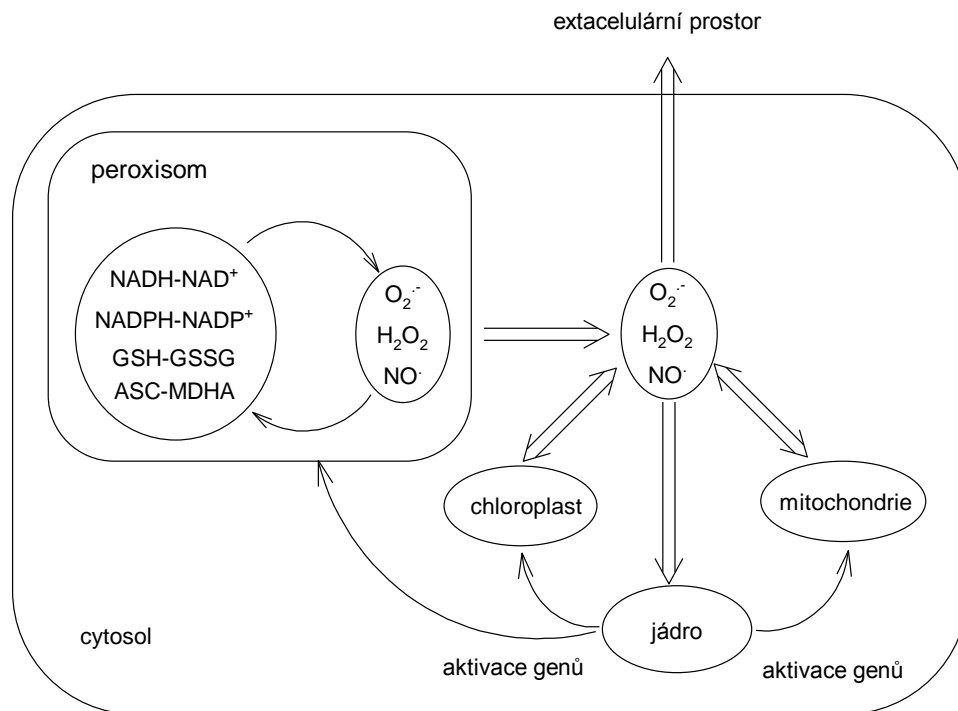
Protože intracelulární koncentrace GSH je vysoká, řádově 1-10mM, bude se většina přítomné LNO₂ vázat s GSH. Konjugát LNO₂-GSH je transportován a odstraněn pomocí transportního proteinu MRP1 za účasti ATP. Tímto je regulována buněčná odezva na LNO₂ a inhibována PPAR γ -závislá transkripce. Konjugace LNO₂ s GSH hraje tedy klíčovou roli při zprostředkování biologické aktivity LNO₂ (Alexander et al., 2006; Trostchanski & Rubbo, 2008).

4.4 LNO₂ jako endogenní ligand PAPR receptoru

4.4.1 Peroxisomy

Peroxisomy byly nalezeny prakticky ve všech eukaryotních buňkách (Nilá et al., 2006). Jsou to malé organely o velikosti 0,1-1,7 μ m. Jsou složeny z jednoduché membrány a granulární nebo fibrilární matrix, která může obsahovat amorfní nebo polykrystalické inkluze (Del Río et al., 2002). Obsahují více než 60 proteinů a v buňce plní různé funkce (Reddy, 2004).

Peroxisomy produkují a uvolňují reaktivní formy kyslíku jako peroxid vodíku a superoxidový radikál a také oxid dusnatý (Titorenko & Rachubinski, 2004), které hrají významnou roli při komunikaci a signalizaci v buňce (obr. 12). Peroxid vodíku je také zodpovědný za proliferaci peroxisomů (Corpas et al., 2001).



Obr. 12 Komunikace mezi peroxisomy a dalšími organelami prostřednictvím signálních molekul peroxidu vodíku, superoxidových radikálů a oxidu dusnatého, které se uvolňují z peroxisomů do cytosolu (upraveno podle Corpas et al., 2001).

Jednou z hlavních funkcí peroxisomů je prostřednictvím enzymu katalasy odstraňovat peroxid vodíku, který vzniká v peroxisomálním respiračním řetězci nebo působením různých oxidas. Peroxisomální oxidasy jsou především flavoproteiny (s výjimkou urát oxidasy, EC 1.7.3.3), mezi které patří např. D-aminokyselina oxidasa (EC 1.4.3.2), acyl-CoA-oxidasa (ACOX, EC 1.3.3.6), glykolát oxidasa (EC 1.1.3.1), α -hydroxykyselina oxidasa (EC 1.1.3.15), glutaryl-CoA-oxidasa a řada dalších. Katalasa kontroluje hladinu H₂O₂. Je inaktivována světlem a různými stresovými podmínkami, které potlačují proteosyntézu a vedou tak k větší produkci H₂O₂ (Del Río et al., 2002).

Peroxisomy mají oxidativní typ metabolismu a mohou v nich probíhat různé metabolické procesy. V tabulce č. 4 jsou uvedeny metabolické funkce, které byly popsány u peroxisomů rostlin a hub (Del Río et al., 2002).

Tab. 4 Metabolické funkce peroxisomů v buňkách rostlin a hub (Del Río et al., 2002).

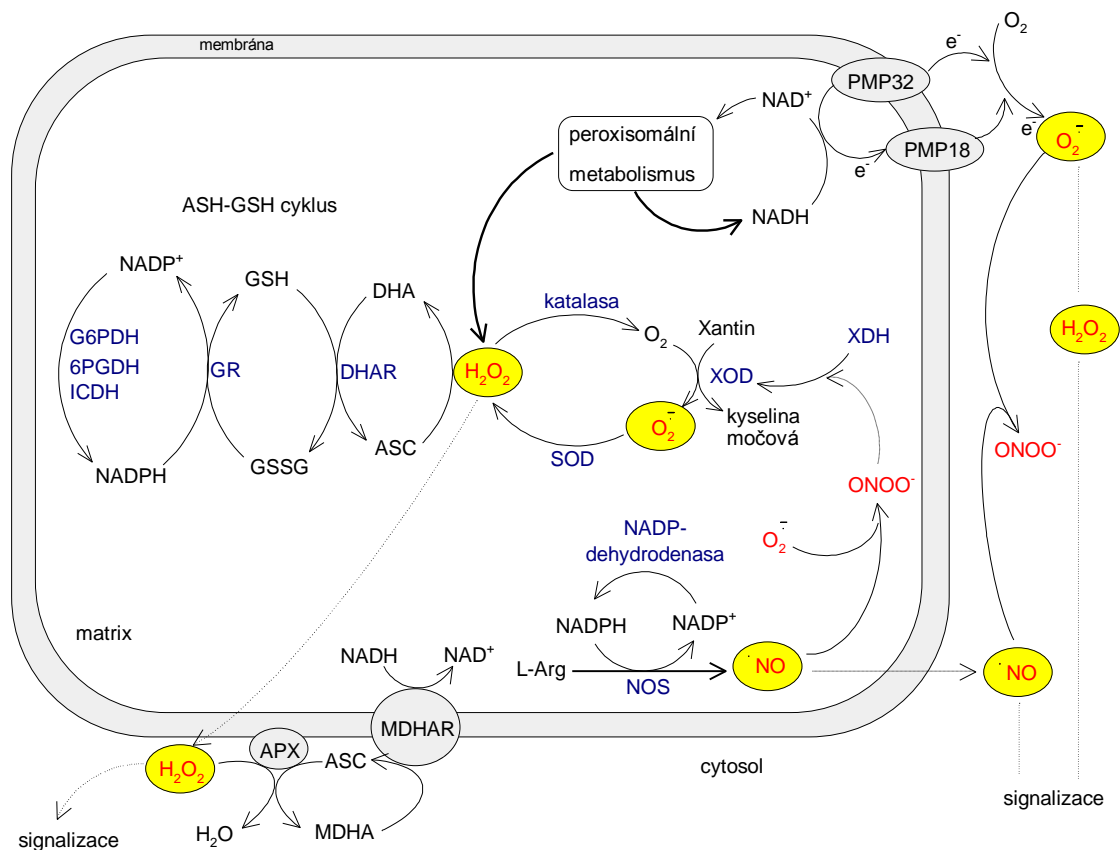
Zdroj	Funkce v metabolismu
Rostliny	fotorespirace
	β -oxidace mastných kyselin
	glyoxylátový cyklus
	metabolismus ureidů
	metabolismus reaktivních forem kyslíku
Houby	metabolismus methanolu
	syntéza oxalátu
	metabolismus aminů
	metabolismus alkanů

V rostlinách se nachází několik typů peroxisomů, které lze rozdělit podle rostlinné tkáně, ve které se nacházejí, a podle jejich biochemické funkce (Nila et al., 2006).

Glyoxysomy jsou specializované peroxisomy vyskytující se v zásobním pletivu olejnatých semen, které obsahují enzymy β -oxidace mastných kyselin a glyoxylátového cyklu. Tyto enzymy se účastní přeměny zásobních tuků na sacharidy, které jsou pak využity při klíčení a růstu rostliny. Listové peroxisomy jsou přítomny ve fotosyntetických pletivech, kde se podílí na fotorespiraci. V peroxisomech kořenových hlíz tropických luštěnin probíhá syntéza alantoinu. Alantoin je důležitý pro transport dusíku v těchto rostlinách (Del Río et al., 2002). Dalším typem jsou nespécializované peroxisomy, které se neúčastní hlavních metabolických cest, nicméně se podílí na rozkladu peroxidu vodíku, protože obsahují katalasu (Nila et al., 2006).

4.4.2 Produkce signálních molekul v peroxisomech

Peroxisomy mohou produkovat několik signálních molekul, model peroxisomálního metabolismu je uveden na obr. 13. Hlavní metabolické procesy zahrnuté v produkci peroxidu vodíku v peroxisomech jsou fotorespirační reakce glykolát oxidasy, β -oxidace mastných kyselin, enzymatické reakce flavin oxidasy a disproportionace superoxidového radikálu. Za produkci superoxidového radikálu v matrix listových peroxisomů je zodpovědná xantinoxidasa (XOD, EC 1.17.3.2). Metaloenzym superoxid dismutasa (SOD) účinně katalyzuje přeměnu superoxidu na H_2O_2 a O_2 . Katalasa pak katalyzuje rozklad H_2O_2 , ale její aktivita může být při stresových podmínkách rapidně snížena (Corpas et al., 2001).



Obr. 13 Produkce signálních molekul O_2^- , H_2O_2 a NO v rostlinných peroxisomech (upraveno podle Corpas et al., 2001).

Z membrány peroxisomů je do cytosolu produkován O_2^- . Tato produkce souvisí s krátkým elektronovým transportním řetězcem, který využívá jako akceptor elektronů kyslík a je spojen s NAD(P)H. Askorbát-glutathionový cyklus je zdrojem NAD^+ pro peroxisomální metabolismus a je také důležitý při ochraně proti úniku H_2O_2 z peroxisomů. Na tom se podílí dva membránové enzymy askorbátperoxidasa (APX, EC 1.11.1.11) a monodehydroaskorbátreduktasa (MDHAR, EC 1.6.5.4; Corpas et al., 2001). Peroxid vodíku snadno proniká membránou do cytosolu a může být degradován APX. MDHAR oxiduje NADH na matrixové straně membrány a přenáší elektrony na elektronový akceptor monodehydroaskorbát. (MDHA) na cytosolické straně (Del Río et al., 1998). Další důležitou antioxidantní funkcí askorbát-glutathionového cyklu je ochrana fotorespirační glykolát oxidasy a dalších peroxisomálních flavinových enzymů redukováným glutathionem (Corpas et al., 2001).

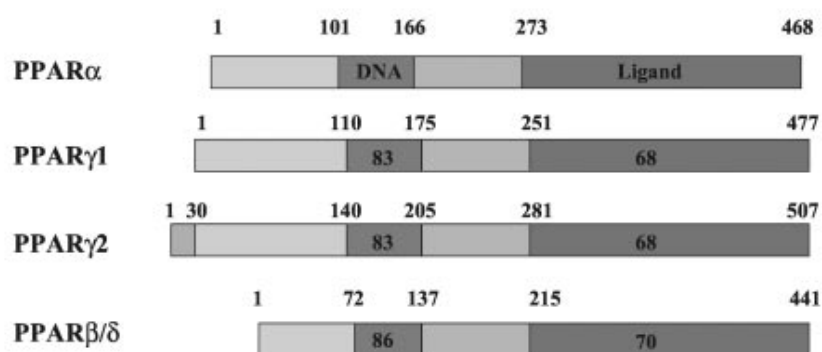
Peroxisomální NOS produkuje NO a ten reaguje s O_2^- za vzniku silného oxidačního činidla $ONOO^-$. $ONOO^-$ reguluje přeměnu xanthindehydrogenasy (XDH, EC 1.17.1.4) na xanthinoxidasu (XOD), která produkuje O_2^- . NO může také difundovat přes membránu a tam reagovat s cytosolickým O_2^- vzniklým elektronovým transportním řetězcem za vzniku $ONOO^-$.

NO, který difunduje přes membránu, může rovněž sloužit jako signální molekula (Corpas et al., 2001).

NO ovlivňuje aktivitu peroxisomálních enzymů v živočišných buňkách. Snižuje aktivitu katalasy a glutathionperoxidasy (EC 1.11.1.9) a aktivitu enzymů peroxisomální β -oxidace zvyšuje. V rostlinných buňkách NO a ONOO⁻ inhibují katalasu a askorbátperoxidasu, enzymy zodpovědné za odstranění peroxidu vodíku. Katalasa je také inhibována superoxidovým radikálem (Corpas et al., 2001).

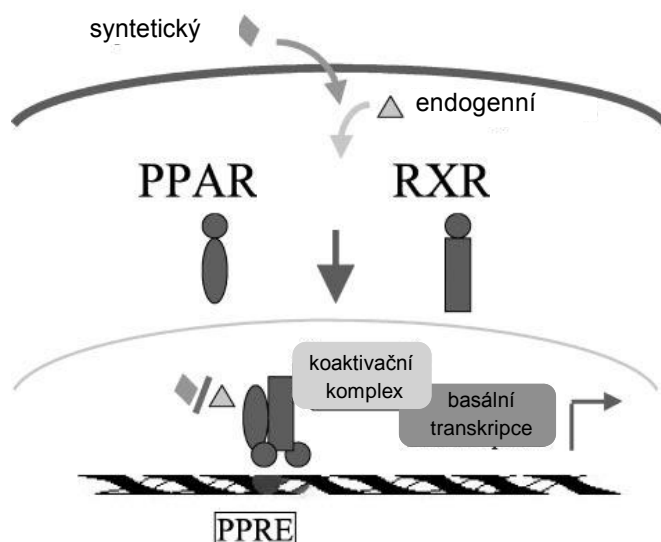
4.4.3 Receptory aktivující proliferaci peroxisomů (PPARs)

Proliferace peroxisomů může být vyvolána mnoha strukturálně odlišnými sloučeninami a je spojena s metabolismem lipidů (Reddy, 2004). Peroxisomální proliferátory aktivují sérii transkripčních faktorů, společně známých jako receptory aktivující proliferaci peroxisomů (PPARs), které patří do skupiny jaderných hormonových receptorů. Aktivované PPARs stimulují expresi genů acyl-CoA-oxidasy (ACOX) a bifunkčního enzymu, které jsou součástí β -oxidace mastných kyselin v peroxisomech (Nila et al., 2006). Skupina PPARs zahrnuje několik isoform, které jsou zobrazeny na obr. 14.



Obr. 14 Skupina receptorů PPARs (Reddy, 2004).

Aktivita transkripce PPARs a dalších nukleárních receptorů je regulována vazbou specifických ligandů. Po vazbě lipofilního ligandu vytváří PPAR komplex s dalším jaderným receptorem, retinoidním X receptorem (RXR). Komplex PPAR/RXR se váže na promotorovou sekvenci DNA, oblast PPRE (peroxisome proliferator response element) a dochází k transkripci cílových genů (obr. 15; Reddy, 2004).



Obr. 15 Mechanismus působení receptoru PPAR (upraveno podle Reddy, 2004).

PPARs jsou receptory mastných kyselin s odlišnou selektivitou pro ligandy. PPAR γ váže nenasycené nebo hydrofilní mastné kyseliny, zatímco PPAR α může vázat také nasycené mastné kyseliny. PPAR β/δ váže kyselinu eicosapentanovou. Přestože mezi jednotlivými isoformami existuje vysoký stupeň homologie, nejsou konzervovány nabitá residua Arg288 a Glu343, která jsou zodpovědná za vazbu nitroskupiny nitrovaných mastných kyselin u PPAR γ . Vazebná kapsa PPAR γ má unikátní hydrofilní vlastnosti, což vysvětluje vazbu modifikovaných oxidovaných a nitrovaných mastných kyselin (Li et al., 2008).

Mastné kyseliny jsou prekurzory mnoha důležitých složek metabolismu. Nedávno bylo zjištěno, že farnesol a geranylgeraniol, typické isoprenoidy mnoha rostlin, mohou aktivovat PPAR α a PPAR γ . Také sojové isoflavonoidy mohou aktivovat PPARs.

Na základě sekvenční analýzy DNA nebyla shledána homologie mezi savčími a rostlinnými jadernými hormonovými receptory. V promotoru živočišných genů pro jaderné hormonové receptory, jako jsou PPARs, jsou silně konzervovány některé cis elementy, které nejsou přítomny v promotorech rostlinných genů. Rostlinné a živočišné PPARs mohou být rozdílné, jako např u NOS (Nila et al. 2006).

PPAR γ je důležitý receptor, který se účastní regulace mnoha procesů v buňce jako regulace homeostázy glukosy a metabolismu lipidů, diferenciaci adipocytů a buněčné signalizace (Alexander et al., 2006; Schopfer et al., 2005). Kontroluje expresi velké skupiny regulačních genů zapojených v metabolismu lipidů, při zánětu a buněčné proliferaci (Dubuquoy et al., 2006).

4.4.4 Ligandy PPAR γ

Mezi syntetické ligandy receptoru PPAR γ patří thiazolidindionové deriváty (TZDs) rosiglitazon, pioflitazon a ciglitazon používané při léčbě diabetu typu 2 (Alexander et al., 2006; Li et al., 2008). Objev receptoru PPAR γ je velmi důležitý v lidské fyziologii a objevech nových léků. Přesto je identifikace fyziologických ligandů obtížná. Jako první přirozené ligandy PPAR γ byly zjištěny 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15-d-PGJ₂) a oxidované mastné kyseliny.

Oxidované mastné kyseliny přítomné v lipoproteinech o nízké hustotě, kyselina 9-hydroxyoktadekadienová (9-HODE) a 13-hydroxyoktadekadienová (13-HODE), aktivují PPAR γ v makrofázích. Přestože tyto oxidované mastné kyseliny mají nízkou afinitu k receptorům, jsou více účinné než příslušná analoga nativních mastných kyselin.

Nedávná pozorování objevila, že nitrované mastné kyseliny, kyselina nitrolinolová a kyselina nitroolejová, aktivují PPAR γ již v nanomolární koncentraci. V lipidech lidské plazmy se nacházejí v koncentraci více než 1 μ M a mohou tak být vysoce afinitními endogenními ligandy PPAR γ . To má velký význam v klinických terapiích. PPAR γ , lipidy a signální cesty NO mají souvislost s diabetem, obezitou a kardiovaskulárními chorobami. Zjištění, že nitrované mastné kyseliny mohou sloužit jako ligandy PPAR γ , tak přináší propojení dvou zdánlivě rozdílných signálních drah (Li et al., 2008).

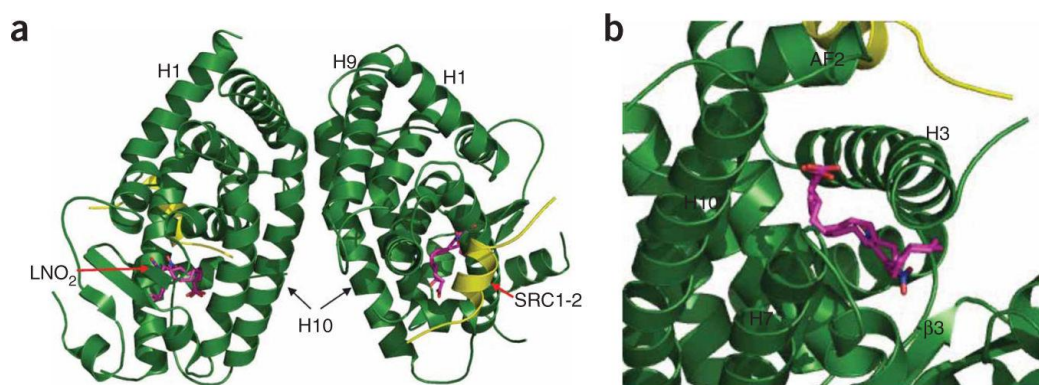
OA-NO₂ je vhodným a silnějším ligandem než LNO₂, protože je také stabilnější ve vodném prostředí (Baker et al., 2005). Dalším vhodným ligandem PPAR γ je konjugovaná kyselina linolová (CLA). Chemicky se jedná o směs čtyř isomerů (cis-9, cis-10, trans-11 a trans-12) kyseliny linolové. CLA byla nalezena v produktech z mléka a masa a může být také produkována střevní mikroflórou (Dubuquoy et al., 2006).

Hydrolyza nitrovaných mastných kyselin z komplexu lipidů je spojena s enzymem fosfolipasou PLA₂. Přibližně 80 % LNO₂ se nachází ve formě esterů a aktivace PPAR- γ je tedy spojena s aktivací PLA₂ (Schopfer et al., 2005).

4.4.5 Mechanismus vazby ligandů na PPAR γ

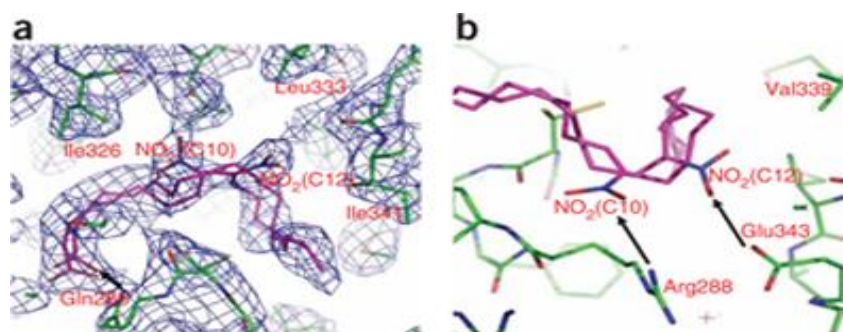
LNO₂ i rosiglitazon podporují a usnadňují interakci PPAR γ s různými sekvenčními motivy LXXLL ze skupiny steroidních koaktivátorů (SRC2-3 a SRC1-2), CREB binding proteinem (CBP), TRAP220 a PGC1- α . V případě vazby 9-HODE nebo 13-HODE na PPAR γ dochází jen ke slabé interakci s těmito motivy.

K objasnění molekulární podstaty vysoce afinitní vazby LNO₂ k PPAR γ byla vyřešena krystalová struktura komplexu LNO₂-PPAR γ a SRC1-2 LXXLL motivu. PPAR γ ligand vazebná doména (LBD) tvoří dimer (obr. 16a). Způsob vazby LNO₂ je podobný vazbě rosiglitazonu, molekula LNO₂ zaujímá asi 40 % vazebného místa (obr. 16b).



Obr. 16 Struktura komplexu PPAR γ LBD a LNO $_2$. a) celková struktura komplexu PPAR γ -LNO $_2$ -SRC1-2. b) bližší pohled na vazbu LNO $_2$ na PPAR γ . PPAR γ je znázorněn zelenou barvou, SRC 1-2 je žlutý a navázaná LNO $_2$ je zobrazena růžově (atomy uhlíku), modře (atomy dusíku), a červeně (atomy kyslíku) (převzato z Li et al., 2008).

Vazba dvou isomerů LNO $_2$ (C10 a C12) do vazebného místa PPAR γ je znázorněna na obr. 18. Karboxylové skupiny obou isomerů LNO $_2$ tvoří několik vodíkových vazeb s residui PPAR γ , včetně Gln286 z helixu 3 (obr. 17a). Tyto interakce jsou pozorovány pro oba isomery LNO $_2$ i rosiglitazon a jsou důležité pro aktivaci PPAR γ těmito ligandy. Mutací Q286A jsou tyto interakce narušeny i tím i znemožněna aktivace PPAR γ .

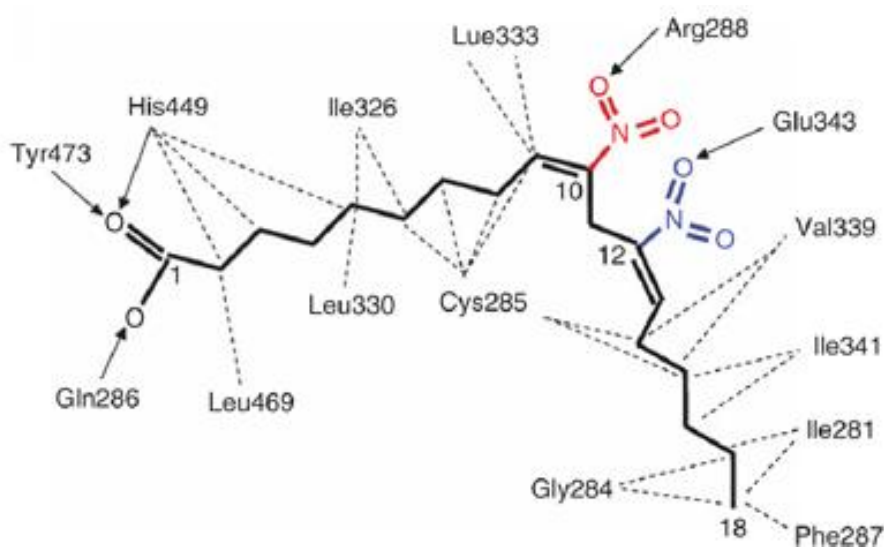


Obr. 17 (a) Mapa elektronové hustoty znázorňující dva navázané isomery LNO $_2$ a okolní residua PPAR γ . LNO $_2$: růžově jsou znázorněny uhlíkové atomy, modře dusíkové atomy a červeně kyslíkové atomy. Vyznačená jsou residua, která jsou důležitá pro selektivitu vazby. (b) Specifická interakce residuí PPAR γ s nitroskupinami LNO $_2$. Vodíkové vazby jsou znázorněny šípkami (převzato z Li et al., 2008).

Selektivita vazby LNO $_2$ -PPAR γ je vysvětlena specifickou interakcí nitroskupin s vazebnými residui PPAR γ (obr. 18). Nitroskupina na uhlíku C10 tvoří vodíkové vazby

s Arg288 a nitroskupina na uhlíku C12 interaguje s Glu343 (Obr. 17b a 18). Mutací jednoho z residuí poklesne aktivace PPAR γ interakcí s LNO $_2$. Tato mutace nemá vliv na aktivaci PPAR γ rosiglitazonem. V případě vazby 9-HODE a 13-HODE se hydroxyskupina váže na stejné pozice jako nitroskupina u LNO $_2$. Arg288 se podílí na vazbě endogenního ligandu PPAR – alkylglycerolfosfátu.

Z těchto strukturních poměrů je zřejmé, proč jako ligand PPAR γ nepůsobí nemodifikovaná kyselina linolová, ale pouze nitrovaná a oxidovaná kyselina linolová.



Obr. 18 Interakce PPAR γ -LNO $_2$. Dva izomery LNO $_2$ v krystalu s vazebnou doménou PPAR γ jsou vyznačeny červenou a modrou barvou. Černě je vyznačena společná struktura těchto izomerů. Hydrofóbní interakce jsou znázorněny čárkovaně a vodíkové vazby jsou znázorněny šipkami od protonových donorů k akceptorům (převzato z Li et al., 2008).

PPAR γ obsahuje dva vazebné epitopy. První epitop, který se nachází na C-konci aktivačního helixu (AF2, obr. 17b), je společný pro vazbu kyseliny LNO $_2$ a TZDs. Druhý epitop, který obsahuje Arg288 a Glu343, je specifický pro nitrované a oxidované skupiny modifikovaných mastných kyselin (Li et al., 2008).

Byly prozkoumány čtyři přirozeně se vyskytující isomery kyseliny nitrolinolové. Všechny aktivují PPAR γ v závislosti na koncentraci, ale nejsou rovnocenné. Bylo zjištěno, že poloha nitroskupiny hraje důležitou roli v aktivaci PPAR γ již v submikromolárním množství. 12-nitroderivát (E-12-NO $_2$ -18:2) je nejsilnějším ligandem. Výjimečnost isomeru E-12-NO $_2$ -18:2 může spočívat v unikátní interakci mezi aminokyselinovými residui vazebného místa PPAR γ a nitroskupinou na uhlíku C12 isomeru E-12-NO $_2$ -18:2. Na aktivaci PPAR γ má malý vliv také počet dvojných vazeb v molekule nitrované mastné kyseliny. Je také možné, že při vysoké

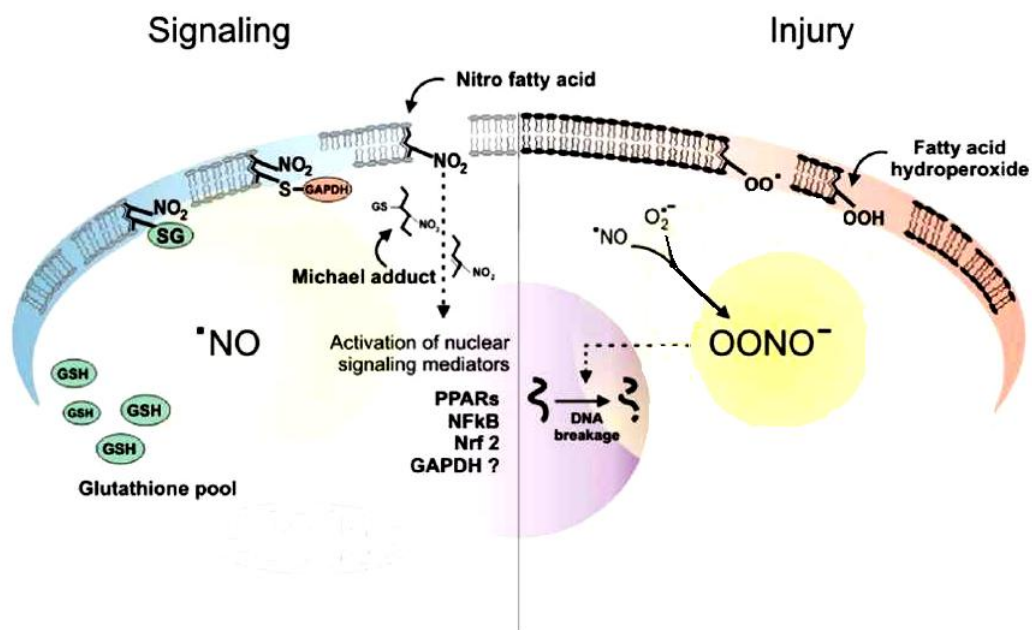
koncentraci PPAR γ -LBD se mohou vázat současně dvě molekuly nitrované kyseliny, přednostně se bude vázat nitrovaná 1,4-dienová mastná kyselina. Vazba dvou stejných ligandů může značně modifikovat konformaci PPAR γ a tím aktivovat transkripci.

Nitrované mastné kyseliny mohou také interagovat s molekulami jiných signálních drah a tím může být nepřímo ovlivněna aktivita PPAR γ . Například nitroalkany jako elektrofilní sloučeniny mohou ovlivňovat signální dráhy proteinkinasy. Fosforylaci PPAR γ může být sekundárně ovlivněna transkripce závislá na PPAR γ (Gorczyński et al., 2009).

5 Příklady reakcí nitrovaných mastných kyselin s proteiny

Mnoho elektrofilních sloučenin působí jako signální mediátory tím, že modifikují klíčové thiohy a další nukleofilní složky transkripčních faktorů a signálních proteinů. Nitroalkylace proteinů je unikátní, protože nitrované mastné kyseliny se tvoří při zánětlivých reakcích, snadno reagují s thiohy a jsou schopny posttranslačně modifikovat proteiny 10-1000 krát rychleji než většina dalších biologických elektrofilů. Tyto posttranslační modifikace proteinů nemají vliv jen na funkci proteinů, ale také na jejich distribuci uvnitř buňky, jelikož navázání části nitrované mastné kyseliny na proteiny může významně ovlivňovat jejich katalytickou aktivitu, strukturu a hydrofobicitu. Schopnost nitrovaných mastných kyselin reversibilně posttranslačně modifikovat proteiny může být důležitá i v toxikologii (Khoo et al., 2010).

Posttranslační modifikace proteinů elektrofilními nitrovanými mastnými kyselinami ovlivňuje mnoho signálních drah. Příklady jsou uvedeny na obr. 19 (Khoo et al., 2010).



Obr. 19 Nitrace lipidů při signalizaci a poškození. PPARs, receptory aktivující proliferaci peroxisomů; NFκB a Nrf2, transkripční faktory; GAPDH, glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa. (převzato z Khoo et al., 2010).

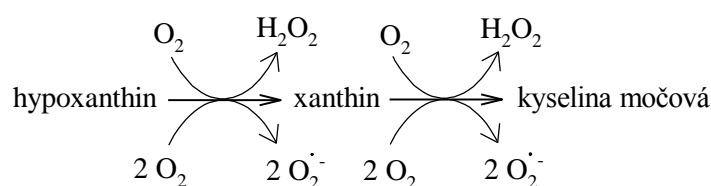
5.1 Kyselina nitroolejová - irreversibilní inhibitor xanthinoxidoreduktasy

Xanthinoxidoreduktasa (XOR) je molybdoflavinový protein, který katalyzuje přeměnu purinů hypoxanthinu a xanthinu na kyselinu močovou. Reakce je doprovázena tvorbou NADH nebo superoxidového radikálu. XOR hraje důležitou roli při degradaci nukleových kyselin ve všech organismech (Corpas et al., 2008).

XOR existuje přednostně jako dehydrogenasa (XDH, EC 1.1.1.204), elektrony ze substrátu redukuje NAD⁺ na NADH (Kelley et al., 2008). XDH je složena ze dvou identických a katalyticky nezávislých podjednotek o velikosti asi 150 kDa. Každá podjednotka obsahuje jeden molybdopterin, dva Fe-S clustery a jeden FAD. Redoxní centrum je lokalizováno ve třech doménách: dva Fe-S clustery v 20 kDa doméně, FAD v 40 kDa doméně a molybdopterin v 40 kDa doméně (Sauer et al., 2002).

XDH může být přeměněna na xanthinoxidasu (XOD, EC 1.1.3.22) a to dvěma cestami: reversibilně prostřednictvím oxidativních procesů (tento krok může být zvrácen pomocí redukčních činidel) nebo irreversibilně tryptickou proteolýzou (Corpas et al., 2008; Sauer et al., 2002). XOD redukuje kyslík na superoxidový radikál nebo peroxid vodíku (obr. 20). Nadprodukce těchto reakčních produktů je spojena s mnoha patologickými stavy. Superoxidový

radikál a další ROS přispívají k oxidativnímu stresu a jsou zahrnuty v procesech jako zánět, arteroskleróza, reperfuční poškození po ischemii, rakovina, stárnutí, buněčná diferenciace a proliferace, obrana před napadením mikroorganismy, metabolismus xenobiotik apod. Hladina XOD v krevním séru je významně zvýšena při patologických stavech, proto má inhibice XOD velký terapeutický význam (Kelley et al., 2008; Ramallo et al., 2006). U savců bylo zjištěno, že XOD má vztah k NO. XOD i XDH jsou inaktivovány oxidem dusnatým a za určitých podmínek může XOD tvořit peroxinitrit. Peroxinitrit pak může regulovat přeměnu XDH na XOD a zpětně regulovat aktivitu XOD (Corpas et al., 2008).

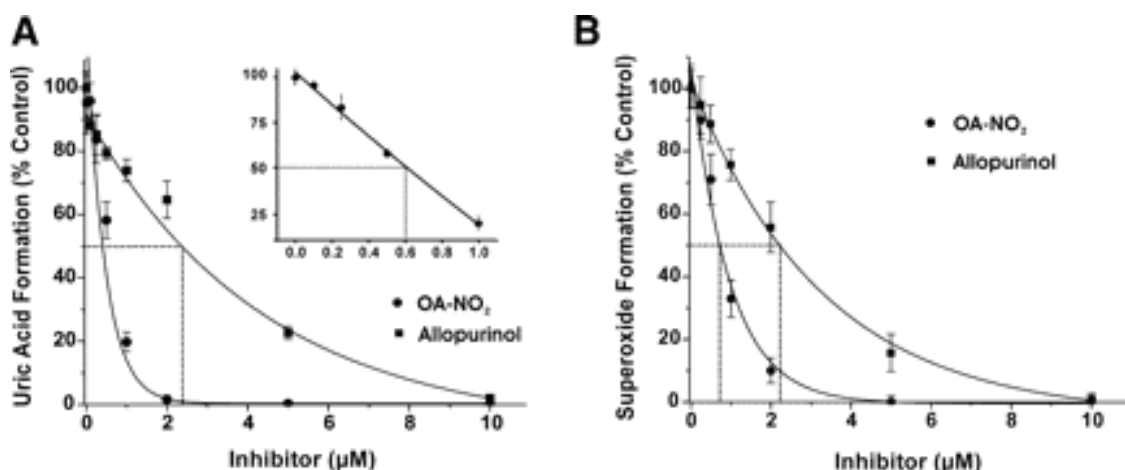


Obr. 20 Oxidace hypoxanthinu a xanthinu na kyselinu močovou katalyzovaná XOD (Ramallo et al., 2006).

Nejvíce prostudovaným enzymem z této skupiny je XDH z kravského mléka, u něhož byla vyřešena krystalová struktura. Rostlinné XDH nejsou zatím tak dobře prostudovány. (Sauer et al., 2002).

Nedávno byla zjištěna výrazná homologie (asi 50%) mezi primární strukturou živočišné XDH a rostlinnou aldehydoxidasou (ALO, EC 1.2.3.1) z rajčete, kukuřice a *Arabidopsis*. Isozymy ALO katalyzují poslední krok biosyntézy rostlinných hormonů: kyseliny indoyloctové a kyseliny abscisové. Ty působí při různých procesech, např. při reakci rostlin na environmentální stresové podněty, jako je poranění, vodní stres, tvorba semen (Sauer et al., 2002).

Mnoho rostlinných extraktů má inhibiční efekt na aktivitu XOD nebo má schopnost ničit superoxidový radikál. Některé přírodní produkty vykazují jednu z těchto vlastností (Ramallo et al., 2006). Známým syntetickým inhibitorem XOR je allopurinol. Allopurinol se oxiduje na molybdenovém kofaktoru na oxypurinol, který pak působí jako inhibitor. Kyselina nitroolejová může sloužit jako ireverzibilní inhibitor XOR. Inhibice je zprostředkována reakcí OA-NO₂ s pterinem v molybdopterinovém kofaktoru XOR (obr. 21; Kelley et al., 2008).



Obr. 21 Inhibice XOD kyselinou nitroolejovou a allopurinolem. (A) Aktivita měřená při 292 nm, kdy dochází k tvorbě kyseliny močové. (B) Aktivita měřená při 550 nm, kdy dochází k tvorbě superoxidového radikálu a redukcii cytochromu c (převzato z Kelley et al., 2008).

5.2 Inhibice glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasy

Ve fyziologické koncentraci nitroalkany inhibují glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasu (GAPDH). Šest reziduí GAPDH, které obsahují Cys, byly *in vitro* modifikovány nitroalkeny. Tyto modifikace GAPDH a také dalších biomolekul nitrovanými mastnými kyselinami významně zvyšují jejich hydrofobicitu a usnadňují jejich translokaci do membrány. Produkty reakce GAPDH s nitroalkeny byly nalezeny *in vivo* v lidských červených krvinkách (Cui et al., 2006).

5.3 Inhibice transkripčního faktoru NF-κB

Enzymatická a chemická oxidace mastných kyselin je důležitá v procesech regulace zánětlivých procesů. Prostaglandiny, thromboxany, isoprostany a leukotrieny zprostředkovávají podněty pro rozvoj zánětu prostřednictvím aktivace receptorů spřaženými s G-proteiny a aktivací nukleárních receptorů, a v některých případech i posttranslační modifikací proteinů. K regulaci zánětu přispívají elektrofilní sloučeniny prostřednictvím posttranslační modifikace transkripčního faktoru NF-κB. NF-κB je proteinový komplex sloužící jako transkripční faktor. Rodina NFκB obsahuje pět různých podjednotek (p50, p52, p65, p100a p105), které tvoří hetero- nebo homo- dimery.

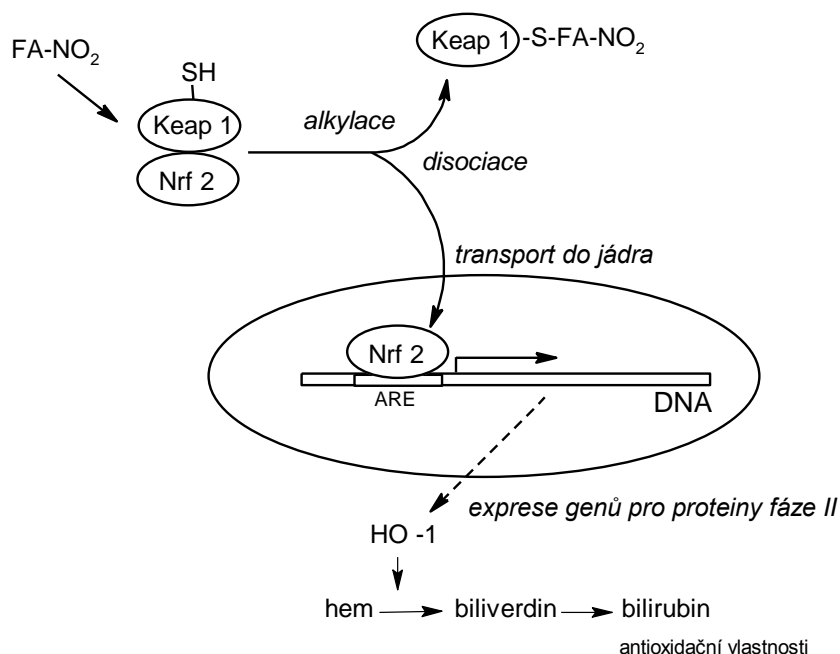
NFκB je důležitý během odezvy genů, které kódují proteiny pro syntézu cytokinů. Dimer p50/p65 podporuje expresi genů zapojených v mechanismech buněčného přežití a rozvoji zánětů. Biologické elektrofilní, nitrované mastné kyseliny a prostaglandiny, potlačují aktivaci NFκB a tím tlumí rozvoj zánětu. Inhibiční efekt nitrovaných mastných kyselin spočívá v

nitroalkylaci Cys38 podjednotky p65. Podjednotka p65 se pak nemůže vázat na oblast promotoru genů spjatých se zánětem (Freeman et al., 2008; Rubbo & Radi, 2008).

5.4 Aktivace transkripčních faktorů Keap1/Nrf2

Nitrované mastné kyseliny regulují expresi genů pro proteiny fáze II detoxifikace elektrofilních xenobiotik prostřednictvím tzv. responzního elementu pro elektrofilny (EpRE, electrophile responsive element), který je také známý jako ARE (antioxidant responsive element). Mechanismus této aktivace spočívá v alkylnaci proteinu Keap1. Keap1 je cytoplazmatický protein, který je bohatý na cystein a proto snadno podléhá elektrofilním reakcím.

Nrf2 patří mezi transkripční faktory typu leucinového zipu a nachází se v cytosolu v neaktivní formě. Alkylací Keap1 se uvolní Nrf2, který migruje do jádra. Jako heterodimer se váže na ARE v DNA a aktivuje se exprese genů pro proteiny fáze II, např. hemoxygenasy-1 (obr. 22). Proteiny fáze II jsou zodpovědné za detoxifikaci a ochranu buněk před patogeny, metabolickým stresem a nevratným poškozením důsledkem zánětlivých stavů. Elektrofilní reaktivita nitrovaných mastných kyselin inhibuje proliferaci buněk hladké svaloviny v cévách mechanismy nezávislými na PPAR γ a NO a závislými na Keap1/Nrf2 (Freeman et al., 2008; Khoo et al., 2010; Trostchanky & Rubbo, 2008).



Obr. 22 Mechanismus aktivace Keap1/Nrf2. FA-NO₂, nitrovaná mastná kyselina (upraveno podle Satoh et al., 2006).

5.5 Nitrované mastné kyseliny a glutathiontransferasy

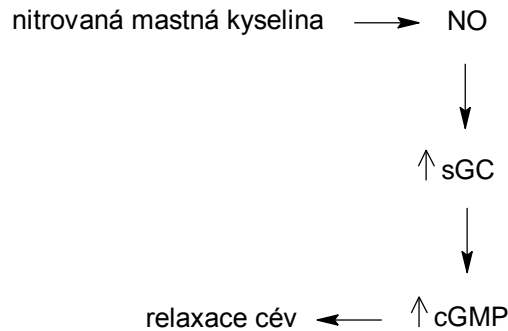
Glutathiontransferasy (GSTs) tvoří velkou skupinu isoenzymů. Jsou exprimovány v různých buňkách a tkáních a katalyzují konjugaci elektrofilních sloučenin s glutathionem, zejména elektrofilů méně chemicky reaktivních a těch, které jsou určeny k exkreci pomocí specifických membránových transportních proteinů. Některé GSTs mohou regulovat aktivitu kinas, které aktivují mitogeny a aktivitu dalších stresových kinas. Bylo zjištěno, že GSTs katalyzují konjugaci glutathionu s elektrofilními mastnými kyselinami, např. prostaglandiny. Nicméně, žádná aktivita GSTs k OA-NO₂ a LNO₂ nebyla experimentálně zjištěna. Bylo však zjištěno, že nitroderiváty mastných kyselin jsou schopné inhibovat GST již v nanomolární koncentraci. Expresí izozymů GSTs může být potlačena aktivace PPAR γ -závislé transkripce. GSTs mohou regulovat aktivaci transkripce, která je zprostředkována nitroderiváty mastných kyselin, protože nitroderiváty mastných kyselin jsou takto odstraněny od jejich jaderného cíle – PPAR γ (Bates et al., 2009).

Konjugáty glutathionu s nitrovanými mastnými kyselinami, NO₂-OA-SG a NO₂-LA-SG také interagují s GSTs. Konjugací s glutathionem ztratí nitrované mastné kyseliny reaktivní elektrofilní centrum. Interakce konjugátu s GSTs tedy nevyžaduje tvorbu kovalentní vazby. Dostupnost volných nitroderivátů mastných kyselin a jejich konjugátů s glutathionem může být regulována prostřednictvím reversibilní reakce mezi GSTs a lipidy (Bates et al., 2009).

6 Protizánětlivé účinky

Nitrované lipidy membrán a lipoproteinů mohou přenášet signální účinek NO na větší vzdálenosti a regulovat signální cesty při vzniku a rozvoje zánětů. Je známo, že nitrolinolát využívá cGMP-závislé i cGMP-nezávislé signální mechanismy (Kalyanaraman, 2004).

Molekuly, které jsou odvozené od NO a za určitých podmínek mohou NO zpět uvolňovat, regulují podobně jako NO cévní tonus. V tomto smyslu narůstá pochopení významu např. dusitanů a nitrosothiolů jako rezerv a přenašečů NO, které ovlivňují cGMP-závislou signalizaci (Freeman et al., 2008). Nitrolinolát indukuje relaxaci hladkých svalových buněk cGMP-závislým mechanismem (obr. 23; Baker et al., 2004).



Obr. 23 Indukce relaxace hladkých svalových buněk nitrovanými mastnými kyselinami v závislosti na cGMP. Vlivem NO vzrůstá aktivita sGC vedoucí ke zvýšení koncentrace cGMP a relaxaci cév.

Nitrované mastné kyseliny inhibují aktivaci velké skupiny buněk se zánětlivou funkcí také mechanismy nezávislými na NO. Inhibují funkci neutrofilů (polymorfonukleárních leukocytů, PMN) a krevních destiček mechanismy nezávislými na cGMP (Freeman et al., 2008), podílí se na aktivaci cAMP-závislé kinasy, výrazně snižují influx Ca^{2+} a podporují fosforylaci proteinů, které stimulují vasodilataci. V závislosti na cAMP inhibuje LNO_2 srážení krve, které je indukováno trombinem (Kalyanaraman, 2004). Znovuobnovení srážení krve nastává působením inhibitoru adenylátcyklasy. Aktivita adenylátcyklasy je zvyšována cAMP-závislou fosforylací Ser-159 fosfoproteinů stimuluji vasodilataci, což způsobuje snížení hydrolýzy cAMP v neutrofilech a makrofázích (Freeman et al., 2008).

Aktivace fagocytujících leukocytů a neutrofilů je hlavní charakteristikou zánětlivých onemocnění. Byl zkoumán vliv LNO_2 na prozánětlivé leukocyty, které mají centrální postavení při patogenezi atherosklerózy (Coles et al., 2002). Nitroderiváty mastných kyselin inhibují aktivaci neutrofilů indukovanou působením N-formyl-methionyl-leucyl-fenylalaninu (fMLP) a forbol-13-myristát-13-acetátu (PMA), což má za následek inhibici produkce superoxidu, mobilizaci Ca^{2+} , degranulaci azurofilních granúl a expresi glykoproteinu CD11b. Nitrace lipidů má vliv na tvorbu protizánětlivých a protektivních látek, které mohou zeslabovat prozánětlivou funkci leukocytů. Tvorba zánětu je doprovázena uvolněním proteas a dalších degradativních enzymů. LNO_2 účinně blokuje degranulaci azurofilních granúl závislou na fMLP. Z toho vyplývá, že nitroderiváty mastných kyselin zmírňují buněčné poškození (Coles et al., 2002).

Glykoprotein, CD11b (αM integrin, MAC-1), je exprimován na povrchu leukocytů jako heterodimer s CD18 (C receptor typu 3) v odpovědi na aktivační prvky jako je fMLP, a je zapojený v adhezi endotheliálních buněk a v transendotheliální migraci do místa zánětu. Při atherogenezi dochází k nahromadění leukocytů do arteriální stěny pomocí leukocytových integrinových receptorů, zahrnujících CD11b. Tento proces ovlivňují produkty lipidové oxidace

a volné radikály, např. O^{2-} , NO, prostaglandiny a isoprostany. Inhibice exprese CD11b indukované fMLP vlivem LNO_2 ukazuje, že nitroderiváty mastných kyselin mohou ovlivňovat odpověď leukocytů spjatých s rozvojem vaskulárních chorob (Coles et al., 2002).

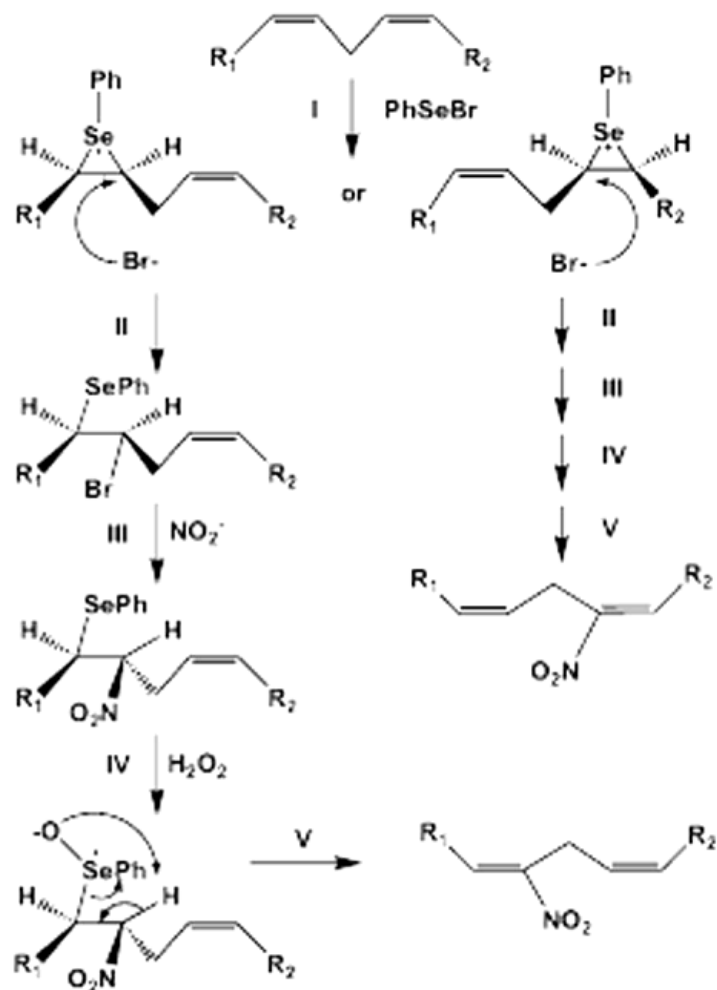
Stimulace neutrofilů fMLP nebo PMA má za následek translokaci nejméně tří cytosolických proteinů p67-phox, p47-phox, a p21-rac1 do membrány, kde tyto proteiny interagují s dvěma membránovými proteiny gp-91-phox a p22-phox za tvorby aktivního enzymového komplexu NADPH-oxidasy, který tvoří O^{2-} . Bylo zjištěno, že LNO_2 neinhibuje tvorbu O^{2-} přímým působením na NADPH-oxidasu (Coles et al., 2002).

Při aktivaci polymorfonukleárních leukocytů inhibuje LNO_2 produkci superoxidového radikálu, mobilizaci vápníku a expresi CD11b mechanismy nezávislými na NO, cAMP a cGMP (Freeman et al., 2008).

7 Možnosti syntézy a analýzy nitrovaných mastných kyselin

7.1 Syntéza LNO_2 a OA- NO_2

LNO_2 lze v laboratorních podmínkách získat nitrací kyseliny linolové pomocí radikálu NO_2 , NO_2^- nebo NO_2^+ . Výchozí látky používané jako nitrační činidla mohou být $ONOO^-$, NO_2BF_4 , NO_2 a $NaNO_2$. Syntéza pomocí kapalného NO_2BF_4 (NO_2^+) probíhá mechanismem elektrofilní substituce a v případě použití NO_2 se jedná o radikálový mechanismus. Reakce kyseliny linolové s $ONOO^-$ může probíhat dvojím mechanismem. Nitraci způsobují buď NO_2^- nebo NO_2^+ (O'Donnell et al., 1999). Posledním možným způsobem je nitrace pomocí $NaNO_2$ nebo $AgNO_2$ za přítomnosti fenylselenylbromidu (PhSeBr). Nejprve se vytvoří fenylseleniový meziprodukt, který je následně oxidován peroxidem vodíku na výsledný nitrolinolát (obr. 24; Baker et al., 2004). Nitroselenylační reakcí vzniknou nitrační i peroxidační produkty, které lze purifikovat extrakcí a chromatografií na koloně se silikagelem (Lim et al., 2002).



Obr. 24 Schéma syntézy kyseliny nitrolinolové při použití PhSeBr a NaNO₂. Kyselina linolová reaguje nejprve s PhSeBr a NO₂⁻. Vzniklý meziprodukt je pak oxidován na kyselinu nitrolinolovou. Vznikají dva polohové isomery (Baker et al., 2004).

OA-NO₂ může být syntetizována nitrací kyseliny olejové dusičnanem sodným. Reakce probíhá v prostředí DMF za přítomnosti kyseliny sírové jako katalyzátoru (Tsikas et al., 2009).

7.2 Možnosti analýzy nitrovaných mastných kyselin

LNO₂ lze analyzovat pomocí TLC, spektrofotometricky, metodami kapalinové i plynové chromatografie, NMR a IR (Baker et al., 2007; Lim et al., 2002).

Analýza TLC probíhá na vrstvě silikagelu ve směsi chloroform-methanol a po detekci v parách I₂ vytvoří analyzované lipidy barevné skvrny. Pomocí TLC lze rozlišit polohové isomery LNO₂, které mají R_f 0,45 (pro C10 isomer) a 0,50 (pro C12 isomer).

Spektrální analýza zahrnuje proměření absorpčního spektra v bazickém methanolu. Absorpční maximum pro LNO₂ v bazickém metanolu je 329 nm (Baker et al., 2004).

LNO₂ byla detekovaná pomocí LC-MS/MS v lidské plazmě v koncentraci 90 nM pro volnou formu a 550 nM pro esterifikovanou formu. Koncentrace OA-NO₂ v lidské plazmě byla stanovena 600 nM pro volnou formu a 300 nM pro esterifikovanou formu. V lidské krvi je tedy více abundantní OA-NO₂, celková koncentrace volné a esterifikované formy je asi 1000 nM (Tsikas et al., 2009).

OA-NO₂ má dostatečnou tepelnou stabilitu pro analýzu plynovou chromatografií. Tsikas et al. ve své práci analyzovali pomocí metod GC-MS a GC-MS/MS OA-NO₂ a její pentafluorobenzyl deriváty (PFB). V lidské krevní plazmě byly identifikovány dva isomery OA-NO₂ (9- a 10- OA-NO₂) v koncentraci přibližně 4 nM, což je o dva řády nižší než koncentrace publikované Freedman et al. (Tsikas et al., 2009; Freedman et al., 2008).

IR spektroskopie analyzuje vzorek z hlediska vazeb, identifikuje vazbu N=O. Touto metodou lze potvrdit přítomnost LNO₂ a vyvrátit přítomnost jiných produktů LONO nebo LONO₂ (Lim et al., 2002).

Možnosti analýzy LNO₂ a OA-NO₂ metodami HPLC/MS a GC/MS publikované v literatuře jsou shrnuty v tabulce 5.

Tab. 5 Možnosti analýzy nitrovaných mastných kyselin (ESI, ionizace elektrospejem; EI, ionizace nárazem elektronu; NICI, negativní chemická ionizace; ECNICI, negativní chemická ionizace s elektronovým záchytem)

Analyt	Metoda	Mobilní fáze	Typ kolony	Typ ionizace	Typ detekce	Literatura
LNO₂	HPLC	50-100% gradient MeOH v 0,1% k. octové 50-90% gradient B (60:40:0,1 CH ₃ OH/acetonitril/k. octová) v A (75:25:0,1 voda/acetonitril: k. octová)	Aquapore C ₈ (100 x 2,1 mm) C ₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 μm)	ESI	trojitý kvadrupól	Lim et al., 2002
	HPLC	A 0.1% NH ₄ OH B (CNCH ₃ s 0.1% NH ₄ OH) gradient 20–65% B	Luna C ₁₈ (150 x 2 mm; 3 μm)	ESI	hybridní trojitý kvadrupól a lineární iontová past	Baker et al., 2004 Baker et al., 2005
	HPLC	CH ₃ CN:H ₂ O:NH ₄ OH (85:15:0.1)	Luna C ₁₈ (150 x 2 mm; 3 μm)	ESI	hybridní trojitý kvadrupól a lineární iontová past	Baker et al., 2005
	GC	He	CP-7420 kapilární kolona (0,25 mm; fused silica, 100 m)	EI	jednoduchý kvadrupól	Baker et al., 2004
	GC	He	30 m CP-Sil 8CB MS kolona (5% fenyl / 95% dimethylpolysiloxan)	NICI	jednoduchý kvadrupól	Baker et al., 2004
OA-NO₂	HPLC	acetonitril/voda (80:20) s 0.1% k. octovou	Nucleodur C ₁₈ Gravity (250 x 4,6 mm; 5 μm)	-	absorbance při 263 nm	Tsikas et al., 2009
	HPLC	50% A (75% voda, 25% acetonitril, 0,05% k. octová) 50% B (100 % acetonitril)	Zorbax Eclipse XDB-C ₁₈ (50 x 2,1 mm; 1,8 μm)	ESI	trojitý kvadrupól MRM	Jain et al., 2008
	GC	He	30 m fused-silica Optima 17 (0,25 mm x 0,25 μm)	ECNICI	trojitý kvadrupól	Tsikas et al., 2009
	GC	He	HP-5MS (0,5 μm x 0,25 mm x 30 m)	-	-	Jain et al., 2008

POUŽITÉ ZKRATKY

6PGDH	6-fosfoglukonátdehydrogenasa
9-HODE	9-hydroxyoktadienová kyselina
13-HODE	13-hydroxyoktadienová kyselina
15-d-PGJ ₂	15- deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J ₂
AA	kyselina arachidonová
ACOX	acyl-CoA-oxidasa
AGP	alkylglycerolfosfát
ALO	aldehydoxidasa
APX	askorbátperoxidasa
ASC	redukovaný askorbát
BSA	hovězí sérový albumin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CLA	konjugovaná kyselina linolová
cPTI	2-(4-karboxyfenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin
cPTIO	2-(4-karboxyfenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid
DAF-2 DA	4,5-Diaminofluorescein DA
DHA	dehydroaskorbát
DHAR	dehydroaskorbátreduktasa
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiothreitol
EDTA	disodná sůl kyseliny tetraethylendiamintetraoctové
EPR	spektroskopie elektronové paramagnetické rezonance
FAD	flavinadenindinulkeotid
FDA	fluorescein diacetát
f-MLP	N-formyl-methionyl-leucyl-fenylalanin
G6PDH	glukosa-6-fosfátdehydrogenasa
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa
GSNO	S-nitrosoglutathion
GST	glutathiontransferasa
GC	guanylátcyklasa
GC	plynová chromatografie
GR	glutathionreduktasa
GSH	redukovaný glutathoin

GSSG	oxidovaný glutathion
H ₂ DCF-DA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát
HO	hemoxygenasa
HO-1	hemoxygenasa-1
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICDH	isocitrátdehydrogenasa
LBD	ligand vazebná doména
LC	kapalinová chromatografie
LNO ₂	kyselina nitrolinolová
LOO	peroxidový radikál
MDHA	monodehydroaskorbát
MDHAR	monodehydroaskorbátreduktasa
MeOH	methanol
MES	4-morfolinethansulfonová kyselina
MRP1	mitochondriální RNA-vážíci proteiny
MS	hmotnostní spektrometrie
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná forma)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid (redukovaná forma)
NADP ⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (oxidovaná forma)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaná forma)
NBT	nitrotetrazoliová modř
NO ₂ BF ₄	nitronium tetrafluorborát
NOS	synthasa oxidu dusnatého
OA-NO ₂	kyselina nitroolejová
PFB	pentafluorobenzylové deriváty
PhSeBr	fenylseleniumbromid
PLA ₂	fosfolipasa A ₂
PMA	forbol-13-myristát-13-acetát
PMN	polymorfonulkeární leukocyty
PMS	fenazinmetosulfát
PPAR	receptor aktivující proliferaci peroxisomů
PPRE	prvek reagující na proliferaci peroxisomů
RNO ₂	nitrososloučeniny
RNS	reaktivní formy dusíku
RONO	nitrososloučeniny
ROS	reaktivní formy kyslíku

RSNO	S-nitrosothioly
RXR	retinoidní X receptor
SDS	dodecylsírán sodný
SOD	superoxiddismutasa
TAA	kyselina <i>trans</i> -arachidonová
TEMED	N,N'-tetramethylendiamin
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TZDs	thiazolidindionové deriváty
XDH	xanthindehydrogenasa
XOD	xanthinoxidasa
XOR	xanthinoxidoreductasa

LITERATURA

Alexander R. L., Bates D. J. P., Wright M. W., King S. B., Morrow Ch. S. (2006) Modulation of nitrated lipid signaling by multidrug resistance protein 1 (MRP1): glutathione conjugation and MRP1-mediated efflux inhibit nitrooleic acid-induced, PPAR γ -dependent transcription activation. *Biochemistry* **45**, 7889-7896.

Baker P. R., Schopfer F. J., Sweeney S., Freedman B. A. (2004) Red cell membrane and plasma linoleic acid nitration products: Synthesis, clinical identification, and quantitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 11577-11582.

Baker P. R., Lin Y., Schopfer F. J., Woodcock S. R., Groeger A. L., Batthyany C., Sweeney S., Long M. H., Iles K. E., Baker L. M., Branchaud B. P., Chen Y. E., Freedman B. A. (2005) Fatty acid transduction of nitric oxide signaling. *J. Biol. Chem.* **280**, 42464-42475.

Baker L. M., Baker P. R., Golin-Bisello F., Schopfer F. J., Fink M., Woodcock S. R., Branchaud B. P., Radi R., Freeman B. A. (2007) Nitro-fatty acid reaction with glutathione and cysteine. *J. Biol. Chem.* **282**, 31085-31093.

Balazy M., Chemtob S. (2008) Trans-arachidonic acids: new mediators of nitro-oxidative stress. *Pharmacol. Therap.* **119**, 275-290.

Bates D. J. P., Lively M. O., Gorczynski M. J., King S. B., Townsend A. J., Morrow Ch. S. (2009) Noncatalytic interactions between glutathione S-transferases and nitroalkene fatty acids modulate nitroalkene-mediated activation of peroxisomal proliferator-activated receptor γ . *Biochemistry* **48**, 4159-4169.

Bloodsworth A., O'Donnell V. B., Freeman B. A. (2000) Nitric oxide regulation of free-radical- and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1707-1715.

Coles B., Bloodsworth A., Clark S. R., Lewis M. J., Cross A. R., Freeman B. A., O'Donnell V. B. (2002) Nitrooleate inhibits superoxide generation, degranulation, and integrin expression by human neutrophils. *Circ. Res.* **91**, 375-381.

- Corpas F. J., Barroso J. B., del Río L. A. (2001) Peroxisomes as a source of oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci.* **6**, 145-150.
- Corpas F. J., Palma J. M., Sandalio L. M., Valderrama R., Barroso J. B., del Río L. A. (2008) Peroxisomal xanthine oxidoreductase: Characterization of the enzyme from pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *J. Plant Physiol.* **165**, 1319 – 1330.
- Cui T., Schopfer F. J., Zhang J., Chen K., Ichikawa T., Baker P. R., Batthyany C., Chacko B. K., Feng X., Patel R. P., Agarwal A., Freeman B. A., Chen Y. E. (2006) Nitrated fatty acids: endogenous anti-inflammatory signaling mediators. *J. Biol. Chem.* **281**, 35686-35698.
- Del Río L. A., Pastori G. M., Palam J. M., Sandalio L. M., Sevilla F., Corpas F. J., Jiménez A., López-Huertas E., Hernández J. A. (1998) The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiol.* **116**, 1195-1200.
- Del Río L. A., Corpas F. J., Sandalio L. M., Palma J. M., Gómez M., Barroso J. B. (2002) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J. Exp. Bot.* **53**, 1255-1272.
- Dubuquoy L., Rousseaux C., Thuru X., Peyrin-Biroulet L., Romano O., Chavatte P., Chamaillard M., Desreumaux P. (2006) PPAR γ as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. *Gut* **55**, 1341-1349.
- Freeman B. A., Baker P. R., Schopfer F. S., Woodcock A. N., d'Ischia M. (2008) Nitro-fatty acid formation and signaling. *J. Biol. Chem.* **283**, 15515-15519.
- Gorczyński M. J., Smitherman P. K., Akiyama T. E., Wood H. B., Berger J. P., King S. B., Morrow Ch. S. (2009) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) by nitroalkene fatty acids: importance of nitration position and degree of unsaturation. *J. Med. Chem.* **52**, 4631–4639.
- Huang J., Sommers E. M., Kim-Shapiro D. B., King S. B. (2002) Horseradish peroxidase catalyzed nitric oxide formation from hydroxyurea. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 3473-3480.
- Jain K., Siddam A., Marathi A., Roy U., Falck J. R., Balazy M. (2008) The mechanism of oleic acid nitration by $\bullet\text{NO}_2$. *Free Rad. Biol. Med.* **45**, 269–283.

Kalyanaraman B. (2004) Nitrated lipids: a class of cell-signaling molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 11527-11528.

Kelley E. E., Batthyany C. I., Hundley N. J., Woodcock S. R., Bonacci G., Del Rio J. M., Schopfer F. J., Lancaster J. R., Freeman B. A., Tarpey M. M. (2008) Nitro-oleic acid, a novel and irreversible inhibitor of xanthine oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* **283**, 36176-36184.

Khoo N. K. H., Rudolph V., Cole M. P., Golin-Bisello F., Schopfer F. J., Woodcock S. R., Batthyany C., Freeman B. A. (2010) Activation of vascular endothelial nitric oxide synthase and heme oxygenase-1 expression by electrophilic nitro-fatty acids. *Free Rad. Biol. Med.* **48**, 230-239.

Lee U., Wie Ch., Fernandez B. O., Feelisch M., Vierling E. (2008) Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **20**, 786-802.

Li Y., Zhang J., Schopfer F. J., Martynowski D., Garcia-Barrio M. T., Kovach A., Suino-Powell K., Baker P. R., Freeman B. A., Chen Y. E., Xu H. E. (2008) Molecular recognition of nitrated fatty acids by PPAR γ . *Nature Struct. Mol. Biol.* **15**, 865-867.

Lim D. G., Sweeney S., Bloodsworth A., White C. R., Chumley P. H., Krishna N. R., Schopfer F., O'Donnell V. B., Eiserich J. P., Freeman B. A. (2002) Nitrolinoleate, a nitric oxide-derived mediator of cell function: synthesis, characterization, and vasomotor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 15941-15946.

Lima E. S., Mascio P. D., Abdalla S. P. (2003) Cholesteryl nitrolinoleate, a nitrated lipid present in human blood plasma and lipoproteins. *J. Lipid Res.* **44**, 1660-1666.

Lima E. S., Bonini M. G., Augusto O., Barbeiro H. V., Souza H. P., Abdalla D. S. P. (2005) Nitrated lipids decompose to nitric oxide and lipid radicals and cause vasorelaxation. *Free Radic. Biol.* **39**, 532-539.

Massey V., Komai H., Palmers G. (1970) On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by allopurinol and other pyrazolo[3,4-d]pyrimidines. *J. Biol. Chem.* **245**, 2837-2844.

Murad F. (1999) Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Biosci. Rep.* **19**, 133-154.

Nila A. G., Sandalio L. M., López M. G., Gómez M., del Río L. A., Gómez-Lim M. A. (2006) Expression of a peroxisome proliferator-activated receptor gene (xPPAR α) from *Xenopus laevis* in tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants. *Planta* **224**, 569-581.

Noriega G. O., Balestrasse K. B., Batlle A., Tomaro M. L. (2004) Heme oxygenase exert a protective role against oxidative stress in soybean leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**, 1003-1008.

O'Donnell V. B., Eiserich J. P., Chumley P. H., Jablonsky M. J., Krishna N. R., Kirk M., Barnes S., Darley-Usmar V. M., Freeman B. A. (1999) Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive nitrogen species peroxynitrite, nitrous acid, nitrogen dioxide, and nitronium ion. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 83-92.

Ozer N., Muftuoglu M., Ataman D., Ercan A., Ogus I. H. (1999) Simple, high-yield purification of xanthine oxidase from bovine milk. *J. Biochem. Biophys. Methods* **39**, 153–159.

Ramallo I. A., Zacchino S. A. and Furlan R. L. E. (2006) A rapid TLC autographic method for the detection of xanthine oxidase inhibitors and superoxide scavengers. *Phytochem. Anal.* **17**, 15–19.

Rubbo H., Radi R., Trujillo M., Telleri R., Kalyanaraman B., Barnes S., Kirk M., Freeman B. A. (1994) Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* **269**, 26066-26075.

Rubbo H., Radi R. (2008) Protein and lipid nitration: Role in redox signaling and injury. *Biochim. Biophys. Acta* **1780**, 1318–1324.

Reddy J. K. (2004) Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator-activated receptor α . *Am. J. Pathol.* **164**, 2305-2321.

Satoh T., Okamoto S.-I., Cui J., Watanabe Y., Furuta K., Suzuki M., Tohyama K., and Lipton S. A. (2006) Activation of the Keap1/Nrf2 pathway for neuroprotection by electrophilic phase II inducers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 768-773.

Sauer P., Frébortová J., Šebela M., Galuszka P., Jacobsen S., Peč P., Frébort I. (2002) Xanthine dehydrogenase of pea seedlings: a member of the plant molybdenum oxidoreductase family. *Plant Physiol. Biochemistry* **40**, 393-400.

Schopfer F. J., Baker P. R., Giles G., Chumley P., Batthyany C., Crawford J., Patel R. P., Hogg N., Branchaud B. P., Lancaster J. R., Freedman B. A. (2005) Fatty acid transduction of nitric oxide signaling. *J. Biol. Chem.* **280**, 19289-19297.

Schopfer F. J., Lin Y., Baker P. R., Ciu T., Garcia-Barrio M., Zhang J., Chen K., Chen Y. E., Freedman B. A. (2005) Nitrolinoleic acid: an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor γ ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 2340-2345.

Titorenko V. I., Rachubinski R. A. (2004) The peroxisome: orchestrating important developmental decision from inside the cell. *J. Cell Biol.* **164**, 641-645.

Trostchansky A., Souza J. M., Ferreira A., Ferrari M., Blanco F., Trujillo M., Castro D., Cerecetto H., Baker P. R. S., O'Donnell V. B., and Rubbo H. (2007) Synthesis, isomer characterization, and anti-inflammatory properties of nitroarachidonate. *Biochemistry* **46**, 4645-4653.

Trostchanski A., Rubbo H. (2008) Nitrated fatty acids: mechanism of formation, chemical characterization, and biological properties. *Free Rad. Biol. Med.* **44**, 1887-1896.

Tsikas D., Zoerner A., Mitschke A., Homsy Y., Gutzki F. M., Jordan J. (2009) Specific GC-MS/MS stable-isotope dilution methodology for free 9- and 10-nitro-oleic acid in human plasma challenges previous LC-MS/MS reports. *J. Chromatogr. B* **877**, 2895-2908.

Uppu R. M., Pryor W. A. (1996) Synthesis of peroxyxynitrite in a two-phase system using isoamyl nitrite and hydrogen peroxide. *Anal. Biochem.* **236**, 242-249.

Wright M. M., Schopfer F. J., Baker P. R., Vidyasagar V., Powell P., Chumley P., Iles K. E., Freeman B. A., Agarwal A. (2006) Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: nitrolinoleic acid potently activates endothelial heme oxygenase 1 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 4299-4304.

Wu F., Shen S., Lee L., Lee S., Chan M., Lin Ch. (2009) Tape-*Arabidopsis* Sandwich - a simpler *Arabidopsis* protoplast isolation method. *Plant Methods* **5**, 16.