

GLYKACE PROTEINŮ A FOSFOLIPIDŮ: MAILLARDOVA REAKCE *IN VIVO*

TOMÁŠ OBŠIL a ZDENĚK PAVLÍČEK

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, Přírodovědecká fakulta, Karlova univerzita, Hlavova 8/2030, 128 40 Praha 2

Dostupné dne 20. II. 1997

Obsah

1. Úvod
2. Chemie glykace (Maillardovy reakce)
 - 2.1. Iniciace glykace - tvorba Amadoriho produktů
 - 2.2. Propagace - degradace Amadoriho produktů
 - 2.3. Terminace - tvorba AGEs
3. Reakce glukosy s peptidy a proteiny *in vitro*
4. Glykace bílkovin *in vivo*
 - 4.1. Vliv struktury proteinu na specifitu glykace
 - 4.2. Glykace „dlouho žijících“ bílkovin
5. Glykace a oxidační procesy
 - 5.1. Oxidace Amadoriho produktů
 - 5.2. Oxidační degradace Amadoriho produktů
 - 5.3. Volnoradikálová-glykační teorie stárnutí
 - 5.4. Enzymová generace elektronově excitovaných stavů
6. Inhibice glykace
 - 6.1. Nízká reaktivita glukosy
 - 6.2. Oxidace Amadoriho produktů
 - 6.3. Přítomnost sloučenin reagujících s meziprodukty Maillardovy reakce
 - 6.4. Enzymová deaktivace meziprojektu Maillardovy reakce
 - 6.5. Odstraňování molekul modifikovaných Maillardovou reakcí, zprostředkované buňkami
 - 6.6. Chemická degradace koncových produktů glykace (AGEs)
7. Glykace fosfolipidů
8. Závěr iniciací, propagací a terminací (obr. 1). Toto rozdělení je

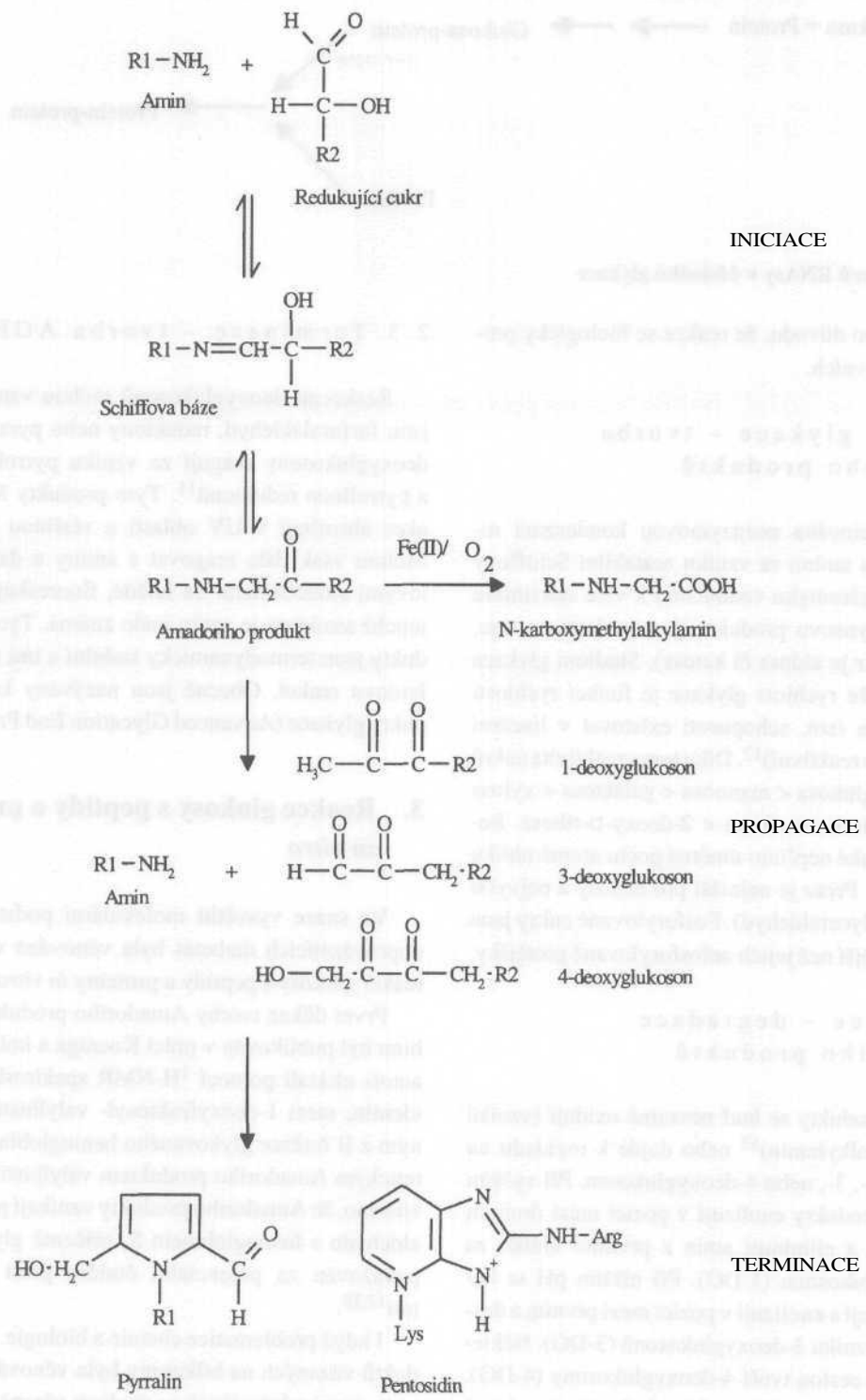
1. Úvod

Vazba karbonylových sloučenin včetně redukujících cukrů na volné aminoskupiny biomolekul bez katalytického působení enzymů se nazývá glykace (nebo starším výrazem neenzymová glykosylace). Tato reakce byla poprvé popsána Louisem Maillardem¹, který pozoroval hnědnutí bílkovin při zahřívání s cukry. Po mnoho let byla tato reakce zajímavá pouze pro potravinářské chemiky. V potravinářském průmyslu se dnes běžně používají produkty Maillardovy reakce jako je např. sojová omáčka. Maillardovy produkty jsou však také studovány z důvodů možné karcinogenity „hnědých potravin“².

V roce 1971 se zjistilo, že glykace probíhá v každém živém organismu³. Zejména ve stavech se zvýšenou koncentrací cukrů v krvi, jako je diabetes mellitus nebo galaktosemie. V prvních studiích zabývajících se glykací *in vivo* byla studována glykace hemoglobinu a kolagenu. Byla popsána existence aduktů těchto bílkovin s cukry^{3,4}. Brzy byla zjištěna zvýšená koncentrace těchto aduktů v krvi diabetiků. Tyto práce posléze vedly k zavedení nové klinické metody⁵ pro sledování metabolismu diabetiků (stanovuje se koncentrace glykovaného hemoglobinu, tzv. HbA_{1c}). Cerami a jeho kolegové^{6,7} předpokládali, že zvýšená glykace bílkovin může vysvětlit některé diabetické komplikace jako je katarakta, urychlená ateroskleróza^a neuropatie. Následovalo velké množství prací o modifikaci biologických molekul glukosou *in vitro* a *in vivo*⁸. Souvislost mezi Maillardovou reakcí a komplikacemi diabetu byla prokázána zjištěním, že fluorescenční adukty krystallinů (bílkovin oční čočky) inkubovaných určitou dobu s hexosami mají stejné fluorescenční vlastnosti jako krystalliny izolované z očí postižených kataraktou (zákal oční čočky)⁹. Koncepce, že Maillardova reakce může vysvětlit stárnutí „dlouho-žijících“ molekul vedla k formulaci nové teorie stárnutí, která je založena na tomto faktu^{10,11}.

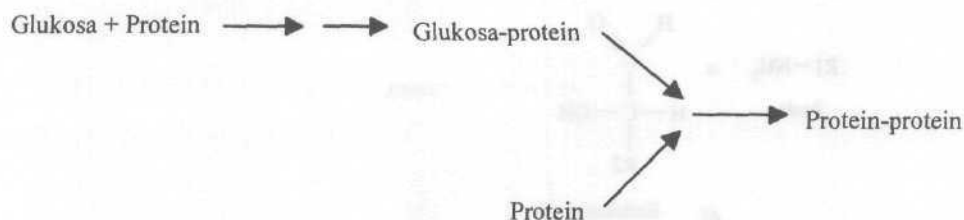
2. Chemie glykace (Maillardovy reakce)

Maillardova reakce probíhá ve třech krocích. V analogii s řetězovými radikálovými reakcemi ji můžeme rozdělit na



**Koncové produkty glykace
(Advanced Glycation End Products, AGEs)**

Obr. 1. Schéma glykace



Obr. 2. Tvorba dimerů RNAsy v důsledku glykace

užitečné také z toho důvodu, že reakce se biologicky projevuje na třech úrovních.

2.1. Iniclace glykace - tvorba Amadoriho produktů

Reakce je iniciována neenzymovou kondenzací redukujícího cukru a aminu za vzniku nestabilní Schiffovy báze. Ta podléhá přesmyku vedoucímu k více stabilnímu Amadoriho či Heynsovu produktu (v závislosti na tom, jestli reagující cukr je aldosa či ketosa). Studium glykace *in vitro* ukázalo, že rychlost glykace je funkcí rychlosti anomerizace cukru (tzn. schopnosti existovat v lineární formě, která je více reaktivní)¹². Díky tomu reaktivita cukrů roste v této řadě: glukosa < mannososa < galaktosa < xylosa < fruktosa < arabinosa < ribosa < 2-deoxy-D-ribosa. Reakční rychlost je také nepřímo úměrná počtu atomů uhlíku v molekule cukru. Proto je nejnižší pro hexosy a nejvyšší pro triosy (např. glyceraldehyd). Fosforylované cukry jsou mnohem reaktivnější než jejich nefosforylované protějšky.

2.2. Propagace - degradace Amadoriho produktů

Amadoriho produkty se buď nevratně oxidují (vzniká N-karboxymethylalkylamin)¹³ nebo dojde k rozkladu na původní amin a 1-, 3-, nebo 4-deoxyglukoson. Při vyšším pH Amadoriho produkty enolizují v pozici mezi druhým a třetím uhlíkem a eliminují amin z prvního uhlíku za vzniku 1-deoxyglukosonu (1-DG). Při nižším pH se ketoaminy přesmykují a enolizují v pozici mezi prvním a druhým uhlíkem za vzniku 3-deoxyglukosonů (3-DG). Některé diketony touto cestou tvoří 4-deoxyglukosony (4-DG). Deoxyglukosony jsou velmi reaktivní sloučeniny, které opět reagují s volnou aminoskupinou a tím propagují Maillardovu reakci a způsobují tak nevratné molekulární změny proteinů tvorbou heterocyklických produktů a inter- a intramolekulárních můstků^{14,15}.

2.3. Terminace - tvorba AGEs

Reakcemi deoxyglukosonů mohou vznikat látky jako jsou furfuraldehyd, reduktony nebo pyranony. S aminy deoxyglukosony reagují za vzniku pyrrolů, pyrrolinonů a pyrrolinon reduktů¹¹. Tyto produkty Maillardovy reakce absorbují v UV oblasti a většinou jsou bezbarvé. Mohou však dále reagovat s aminy a dalšími karbonylovými sloučeninami na hnědé, fluoreskující sloučeniny, jejichž struktura je zatím málo známá. Tyto koncové produkty jsou termodynamicky stabilní a tím terminují Maillardovu reakci. Obecně jsou nazývány koncovými produkty glykace (Advanced Glycation End Products, AGEs).

3. Reakceglukosy s peptidy a proteiny *in vitro*

Ve snaze vysvětlit molekulární podstatu komplikací doprovázejících diabetes byla věnována velká pozornost reakci glukosy s peptidy a proteiny *in vitro*.

První důkaz tvorby Amadoriho produktů na hemoglobinu byl publikován v práci Koeniga a kol.¹⁶ V této práci autoři ukázali pomocí ¹H-NMR spektroskopie strukturní identitu mezi 1-deoxyfruktosyl- valylhistidinem izolovaným z B řetězce glykovaného hemoglobinu HbA_{1c} a syntetickým Amadoriho produktem valylhistidinu. Také bylo zjištěno, že Amadoriho produkty vznikají při reakci glyceraldehydu s hemoglobinem S, přičemž glyceraldehyd byl považován za potenciální činidlo proti srpkovité anémii^{17,18}.

I když problematice chemie a biologie Amadoriho produktů vázaných na bílkoviny byla věnována velká pozornost, prací zabývajících se studiem přesné struktury proteinových AGEs je poměrně málo. Pongor a kol.¹⁹ inkubovali poly-L-lysin a hovězí sérový albumin s glukosou po dobu 28 dní. Pozorovali značné zvýšení absorbance a fluorescence (maximum excitace 370 nm, maximum emise

440 nm). Polypeptid byl poté kyselé hydrolyzován a po vysušení alkalizován hydroxidem amonným. Vzniklá tmavě žlutá sloučenina byla rozpuštěna v chloroformu. Sloučenina byla identifikována jako furoylimidazol. Další studium ukázalo, že tato sloučenina vznikla kondenzací kyselé hydrolyzovaného Amadoriho produktu s volným amoniakem a furylglyoxalem, který se uvolnil z glykované bílkoviny. Inkubace polylysinu s glukosou při teplotě 37 °C ve fosfátovém pufru (pH 7,4) vedla ke značnému zvýšení fluorescence a polymerace polylysinu²⁰. Inkubace glykovaného polymeru v přítomnosti [³H]-L-lysinu měla za následek, že lysin byl rychle inkorporován do glykovaného polylysinu s následným uvolněním fluoreskující nízkomolekulární sloučeniny. Struktura fluoreskující sloučeniny zůstala neobjasněna.

Schopnost glukosy síťovat bílkoviny a ovlivňovat tak jejich biologickou funkci byla detailně studována v práci Ebla a kol.²¹. Jako modelová bílkovina byla použita ribonukleasa (RNasa). Analýza glykovaného proteinu pomocí elektroforézy v polyakryl-amidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného ukázala tvorbu dimerů a trimerů, závislou na době glykace. Polymerace byla reakce prvního řádu vzhledem ke koncentraci glukosy, ale byla také přibližně reakcí prvního řádu vzhledem ke koncentraci bílkoviny. Tyto výsledky naznačují, že reakce probíhá podle schématu na obr. 2. V dalších pracích byla studována struktura můstků. Výsledky ¹³C-NMR spektroskopie ukázali, že se jedná o pyranosovou strukturu²².

Struktura koncových produktů glykace je stále nejasná. Byla popsána řada sloučenin vzniklých glykací modelových systémů. Tyto AGEs pak byly použity pro přípravu protilátek, které umožnily detekci AGEs *in vivo*. Příčina nevelkého pokroku ve studiu struktury AGEs bílkovin spočívá ve složitosti koncových produktů glykace, v jejich labilitě vůči kyselé hydrolyze, v malém výtěžku Maillardovy reakce a ve vzniku množství artefaktů během kyselé hydrolyzy, která je nezbytným krokem k jejich izolaci²².

4. Glykace bílkovin *in vivo*

4.1. Vliv struktury proteinu na specifitu glykace

Některé aminoskupiny proteinu jsou více reaktivní než jiné. Faktory ovlivňující kinetiku a místo glykace bílkovin jsou uvedeny v tabulce I.

Velký vliv na reaktivitu α -aminoskupin proteinu má

jejich pK_a . Nižší hodnota pK_a a tím vyšší nukleofilita urychluje tvorbu Schiffovy báze. Ale ukazuje se, že i další faktory významně ovlivňují distribuci Amadoriho produktů na molekule bílkoviny. Okolní aminokyselinové zbytky ovlivňují kinetiku Amadoriho přesmyku Schiffovy báze v každém místě, kde dochází ke glykaci²³.

Tabulka I

Faktory ovlivňující kinetiku a místo glykace bílkovin

-
1. Vliv struktury proteinu
 - plaminoskupiny
 - okolní funkční skupiny
 2. Místavázajligandy
 - místavázající ionty pufru
 - allosterická aktivní centra
 - * pro difosfoglycerát
 - * pro fosforylované meziprodukty
 - vazebná místa pro aniontové ligandy
 - * pro glykosoaminoglykany
 - * pro mastné kyseliny
 - vazebná místa pro jiné ligandy
 - * pro kationty
 - * pro farmaka
 3. Interakce na dlouhé vzdálenosti
 - ligandem indukované allosterické efekty
 - solné můstky a vodíkové vazby
-

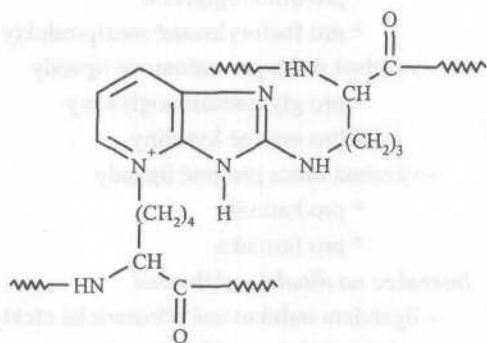
4.2. Glykace „dlouhožijících“ bílkovin

Krystalliny (bílkoviny oční čočky) jsou extrémně „dlouho žijící“ bílkoviny, které se během života téměř vůbec neobměňují. Proto mohou být glykaci silně zasaženy. U diabetických pacientů byla prokázána zvýšená glykace těchto bílkovin²⁴⁻²⁵. Glykace krystallinů se také zvyšuje během stárnutí organismu.

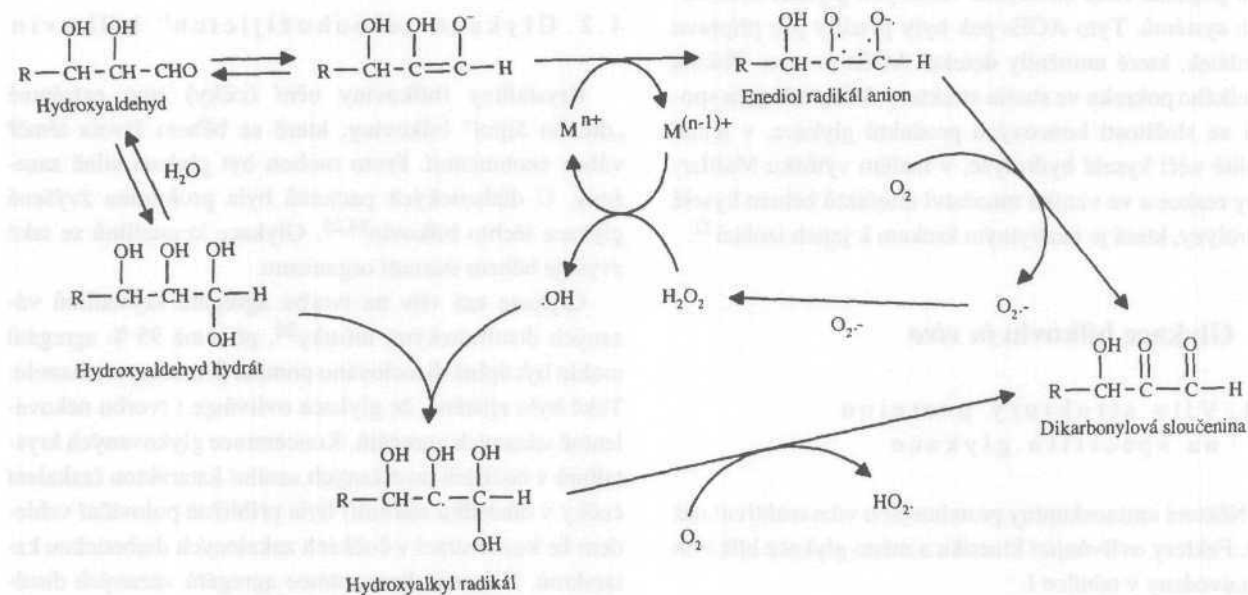
Glykace má vliv na tvorbu agregátů krystallinů vázaných disulfidickými můstky²⁶, přičemž 95 % agregátů mohlo být úplně disociováno pomocí β -merkptoethanolu. Také bylo zjištěno, že glykace ovlivňuje i tvorbu nekovalentně vázaných agregátů. Koncentrace glykovaných krystallinů v čočkách postižených senilní kataraktou (zakalení čočky v důsledku stárnutí) byla přibližně poloviční vzhledem ke koncentraci v čočkách zakalených diabetickou kataraktou. Nicméně koncentrace agregátů vázaných disulfidickými můstky byla stejná u obou typů katarakty. Z toho

plyne, že glykace nebude jedinou příčinou senilní katarakty. Výsledky této studie ukazují, že glykace krystalinů má značný vliv na tvorbu agregátů vazaných disulfidickými můstky, a tím může přispívat ke vzniku katarakty.

Jiným typem „dlouho žijících“ bílkovin jsou kolageny. Už nízká koncentrace produktů glykace způsobuje fyzikální změny kolagenů. Glykace bazální glomerulární membrány byla celkem podrobně zkoumána v práci Cohena a kol.²⁷. Bazální membrána tvoří třetí vrstvu glomerulárního filtru²⁸. Vliv glykace na bazální glomerulární membránu je mnohem silnější než na vlákna kolagenu. Byly pozorovány jasné změny pružnosti a permeability kapilár. Glykovaný kolagen typu IV bazální membrány měl několikanásobně redukovanou afinitu vůči fibronektinu a heparan sulfátu. Tyto protein-protein interakce mají zásadní význam pro optimální filtrační činnost bazální membrány.



Obr. 3. Pentosidin navázaný na peptidový řetězec



Obr. 4. Mechanismus autooxidace monosacharidů

Tento jev může vysvětlit ztenčení bazální membrány u dlouhodobého diabetu mellitu. To pak způsobuje diabetickou mikroangiopatii následovanou selháním ledvin.

V práci Sella a Monniera³⁰ byl pomocí ¹H-NMR a hmotnostní spektroskopie identifikován fluorofor, který se nazývá pentosidin. Tento fluorofor byl izolován z kolagenu tvrdé mozkomíšní pleny starých lidí. Pentosidin vzniká reakcí Amadoriho produktu pentos s argininovým zbytkem (obr. 3).

Další charakteristickou komplikací diabetu je periferní neuropatie, projevující se segmentální demyelinací³¹. Myelin je během diabetu silně glykovan. Zvýšená propustnost endoneurálních kapilár vůči bílkovinám krevní plazmy způsobuje pronikání těchto bílkovin do periferních nervů. To pak vede k poškození této tkáně³².

5. Glykace a oxidační procesy

5.1. Autooxidace

Všechny α -hydroxyaldehydy podléhají oxidaci (autooxidaci) za katalýzy přechodných kovů³³. Tato oxidace vede ke vzniku reaktivních ketoaldehydů, peroxidu vodíku a reaktivních meziproductů jako jsou hydroxylové radikály (obr. 4).

Wolff a Dean³⁴ ve své práci studovali příspěvek autooxidace glukosy na modifikaci hovězího sérového albuminu (BSA). Autoři ukázali, že autooxidace glukosy při-

spívá k tvorbě koncových produktů glykace. Autooxidace glukosy *in vitro* produkuje H_2O_2 a ketoaldehydy. Tvorba ketoaldehydů byla snížena přítomností chelatačního činidla DETAPAC (kyselina diethylenetriaminopentaoctová). To naznačuje, že tato reakce je katalyzována kovy přechodné valence. Nicméně další přidání Cu^{2+} nemělo žádný vliv na průběh reakce.

Tento rozpor se dá vysvětlit tím, že v reakční směsi je velmi malá koncentrace autooxidovatelného enediolu. Další přidání kovu tudíž nemůže ovlivnit rychlost reakce. Stejný efekt byl pozorován také u autooxidace glycerinaldehydu³³.

DETAPAC přítomná v reakční směsi snižuje vazbu glukosy na BSA. Ani v tomto případě však další přidání Cu^{2+} nezvyšuje vazbu glukosy na BSA. Tyto výsledky ukazují na to, že produkty autooxidace glukosy přispívají k vazbě glukosy na protein a k tvorbě chromoforů a fluoroforů (koncových produktů glykace).

Během autooxidace vzniká peroxid vodíku a volné radikály. Ty mohou oxidovat některé aminokyselinové zbytky a přispívat tak ke konformačním a fluorescenčním změnám bílkoviny, nebo k její fragmentaci. Autooxidační procesy spojené s glykací tak mohou hrát významnou roli v oxidativním stresu^{34,35}.

Je stále otázkou, do jaké míry se při glykaci uplatňuje Amadoriho přesmyk či autooxidace monosacharidů na vzniku dikarbonylových sloučenin. Tvorba volných radikálů a reaktivních forem kyslíku během glykace však byla jení jednoznačně prokázána^{33,37}. Hunt a kol.³⁸ ukázali, že samotná glukosa, nebo glykované LDL indukují lipoperoxidaci lipidové části LDL a fosfolipidových liposomů *in vitro* při koncentracích glukosy odpovídající hyperglykémii *in vivo*. Reakce byla urychlena přidávkem Cu^{2+} a inhibována některé přítomností chelatačního činidla. To ukazuje na volnoradikálový mechanismus této reakce.

5.2. Oxidační degradace Amadoriho produktů

Volné radikály mohou být produkovány nejen autooxidací volných hydroxyaldehydů, ale také oxidací Amadoriho produktů³⁹. V této práci byla studována produkce superoxidového anionradikálu (O_2^-) ve vzorcích glykovaných a neglykovaných bílkovin. Ve vzorcích glykovaných bílkovin byla produkce superoxidového anionradikálu 50 krát větší než u vzorků obsahujících neglykované bílkoviny. Autoři použitím fenylnitronu jako spinové pasty (spin trap) pomocí ESR ukázali, že jak Schiffovy

báze, tak Amadoriho produkty mohou produkovat volné radikály. Volné radikály nejen způsobovaly fragmentaci glyko vaných bílkovin, ale během této oxidační fragmentace docházelo k další produkci radikálů. To bylo dokumentováno iniciací peroxidace lipidů v přítomnosti glykovaných bílkovin. K stejnému závěru dospěl i Sakurai a kol.⁴⁰, kteří ve své práci iniciovali peroxidaci lipidů glykovaným polylysinem v přítomnosti Fe^{3+} a ADP.

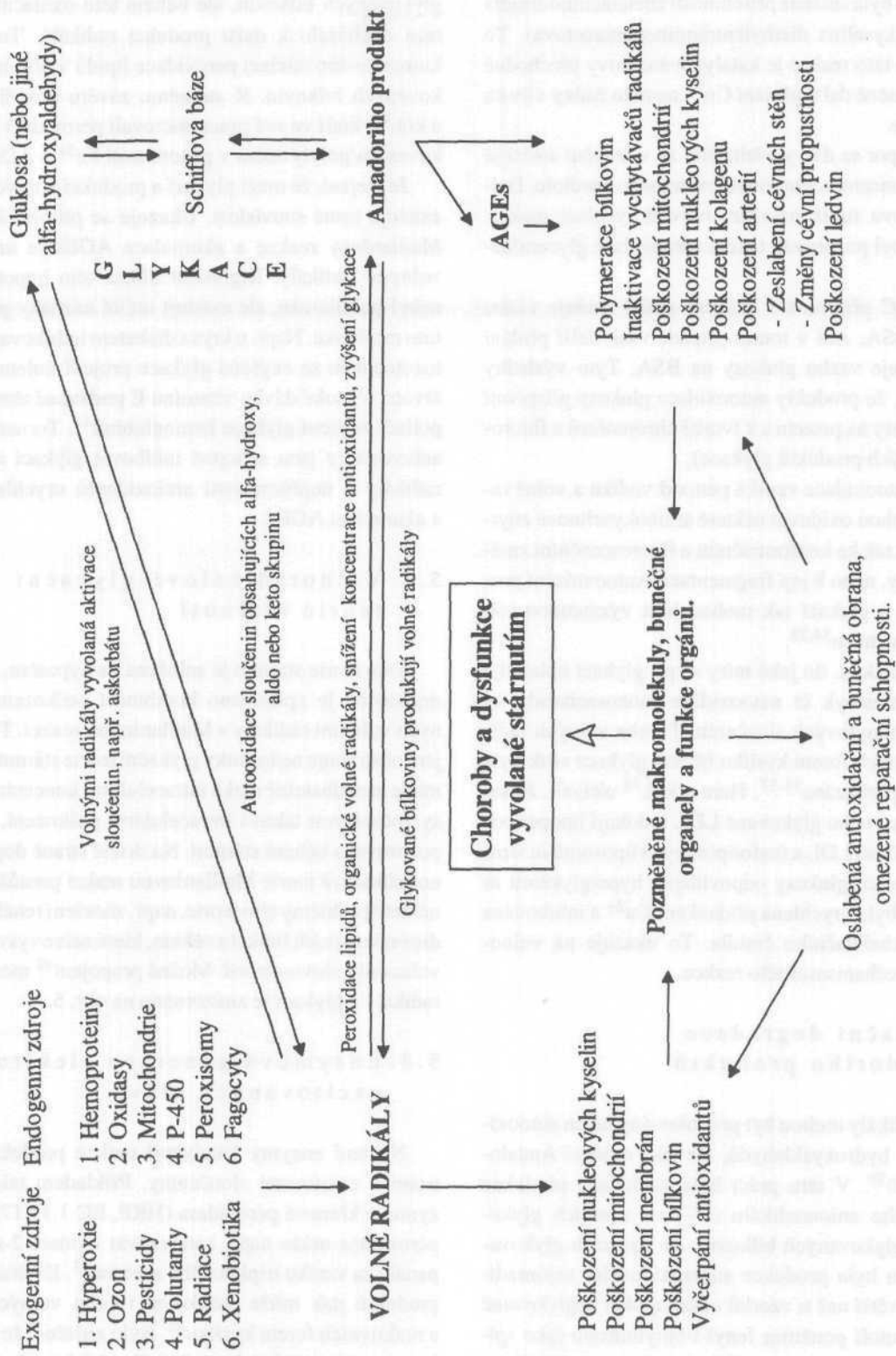
Je zřejmé, že mezi glykací a produkcí volných radikálů existuje jasná souvislost. Ukazuje se přitom, že rychlost Maillardovy reakce a akumulace AGEs je urychlována volnými radikály. Rigorózní důkaz této hypotézy zatím nebyl publikován, ale existují určité náznaky podporující tuto myšlenku. Např. u kryss s diabetem indukovaným streptozotocinem se zvýšená glykace projeví kolem 18. týdne života. Vysoké dávky vitamínu E podávané těmto krysám potlačí zvýšení glykace hemoglobinu⁴¹. To naznačuje, že antioxidanty jsou schopné inhibovat glykaci a že volné radikály v nepřítomnosti antioxidantů urychlují glykaci a akumulaci AGEs.

5.3. Volnoradikálová-glykační teorie stárnutí

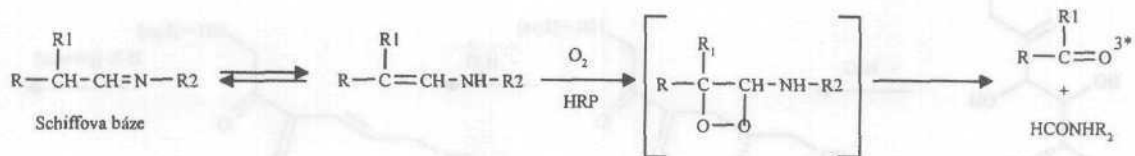
Tato teorie stárnutí je založena na hypotéze, že stárnutí organismu je způsobeno kombinací poškození iniciovaných volnými radikály a Maillardovou reakcí. Toto propo- jení odstraňuje nedostatky glykační teorie stárnutí, např. jak může zanedbatelně nízká intracelulární koncentrace glukosy způsobovat taková intracelulární poškození, která jsou pozorována během stárnutí. Na druhé straně doplnění volnoradikálové teorie Maillardovou reakcí pomůže vysvětlit některé problémy této teorie, např. zhoršení renálních a kardiiovaskulárních funkcí s věkem, které nelze vysvětlit pouze volnoradikálovou teorií. Možné propojení⁴² mezi volnými radikály a glykací je znázorněno na obr. 5.

5.4. Enzymová generace elektronově excitovaných stavů

Některé enzymy katalyzují reakce produkující elektronově excitované sloučeniny. Příkladem takového enzymu je křenová peroxidasa (HRP, EC 1.11.17). Křenová peroxidasa může např. katalyzovat oxidaci 2-methylpropanalu za vzniku tripletového acetonu⁴³. Excitační energie produktů pak může indukovat tvorbu volných radikálů a reaktivních forem kyslíku⁴⁴. Bylo zjištěno, že HRP katalyzuje oxidaci alifatických Schiffovýchází doprovázenou



Obr. 5. Možné interakce volných radikálů a glykace v procesu stárnutí



Obr. 6. Oxidace Schiffovy báze za katalýzy HRP

Tabulka II

Relativní reaktivita vybraných redukcujících cukrů

Redukující cukr	Relativní rychlost tvorby	
	Schiffovy báze	AGEs
2-Deoxy-D-ribosa	-	217
D-Ribosa	16,6	129
2-Deoxy-D-glukosa	-	26
D-Arabinosa	-	16,4
D-Fruktosa	7,5	-
D-Xylosa	4,8	7
D-Galaktosa	4,6	4,6
D-Mannosa	5,3	3
D-Glukosa	1	1

chemiluminiscenci⁴⁵ (obr. 6). Excitační energie produktů této enzymově katalyzované oxidace může přispívat koxidačním procesům, které jsou spojeny s glykací.

6. Inhibice glykace

6.1. Nízká reaktivita glukosy

Základní obranou organismu proti Maillardově reakci je to, že jako metabolický zdroj energie byla evolucí vybrána glukosa. V porovnání s jinými cukry a hydroxyaldehydy je nejméně reaktivní (tab. II). U zdravého člověka je koncentrace reaktivních cukrů a aldehydů v buňkách i v plazmě nízká. Kromě glukosy je koncentrace karbonylových sloučenin v plazmě silně závislá na činnosti jater a ledvin. Buňky i plazma kromě toho také obsahují velké množství volných nízkomolekulárních aminů, které soutěží s proteiny při reakci s glukosou a tak působí jako fyziologické inhibitory glykace⁴⁶.

6.2. Oxidace Amadoriho produktů

Amadoriho produkty mohou být oxidovány. Jako výsledek oxidace Amadoriho produktů byl identifikován N-karboxymethyllysin (CML)¹³. Tato degradace způsobuje změnu povrchového náboje bílkovin (proteiny ztrácejí kladný náboj a získávají negativní náboj). Jelikož tyto změny jsou nevratné, mohou mít vliv na biologickou funkci bílkovin. Nicméně degradace Amadoriho produktů zneumožňuje tvorbu AGEs a polymeraci bílkovin⁴⁶. CML byl zjištěn v lidské moči a v hydrolyzátu bílkovin lidské oční čočky¹³. To naznačuje, že oxidační degradace Amadoriho produktů na CML probíhá *in vivo*.

6.3. Přítomnost sloučenin reagujících s meziprodukty Maillardovy reakce

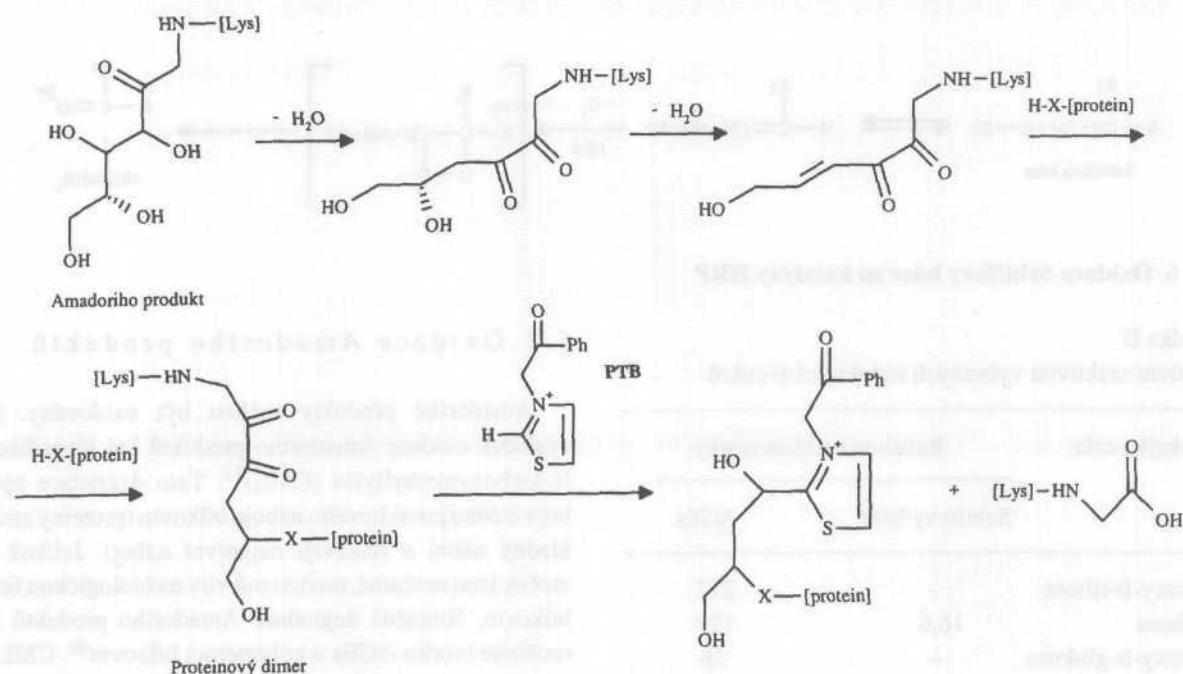
Brownlee a kol.⁴⁷ ve své práci ukázali, že aminoguanidin může blokovat tvorbu AGEs a zesilování proteinů jak v modelových systémech *in vitro*, tak i u kolagenu diabetických myší. Zjistili, že aminoguanidin reaguje přednostně s deoxyglukosony, které propagují Maillardovu reakci. Přítomnost aminoguanidinu v reakční směsi tak zabrání vzniku AGEs.

Dalšími inhibitory glykace jsou ibuprofen a kyselina acetylsalicylová. U těchto látek byly prokázány antika-taraktové účinky⁴⁸.

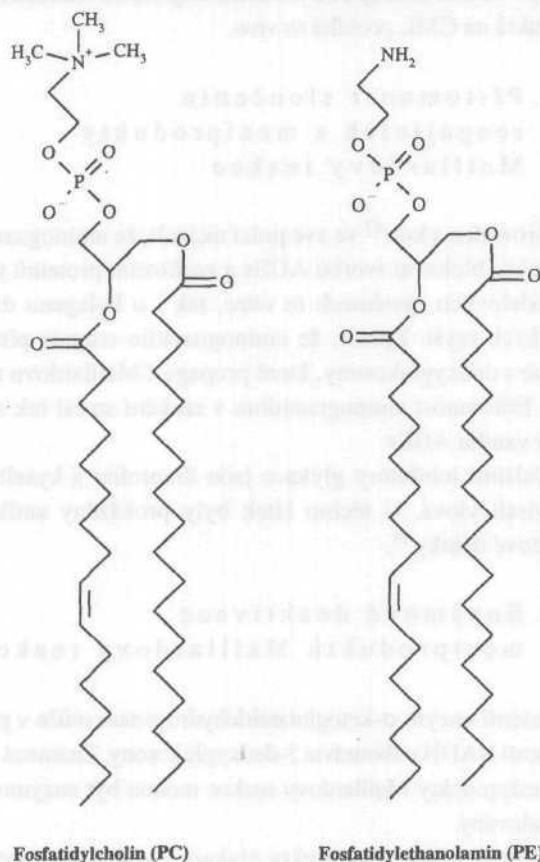
6.4. Enzymová deaktivace meziproductů Maillardovy reakce

Jaterní enzym α -ketoglutaraldehydhydrogenasa může v přítomnosti NADH odbourávat 3-deoxyglukosony. Znamená to, že meziprodukty Maillardovy reakce mohou být enzymově degradovány.

Některé koncové produkty glykace (AGEs) mají cytotoxické a mutagenní schopnosti, které mohou být spojeny s aktivací⁴⁹ prostřednictvím cytochromu P-450.



Obr. 7. Mechanismus účinku PTB štěpícího meziproteinové můstky



Obr. 8. Schéma fosfatidylcholinu (PC) a fosfatidylethanolaminu (PE)

Enzymy štěpící Amadoriho produkty u člověka zatím nebyly nalezeny. Bylo však zjištěno, že bakterie střevní flóry obsahují enzymy, které metabolizují Amadoriho produkty⁴⁶.

6.5. Odstraňování molekul modifikovaných Mailardovou reakcí, zprostředkované buňkami

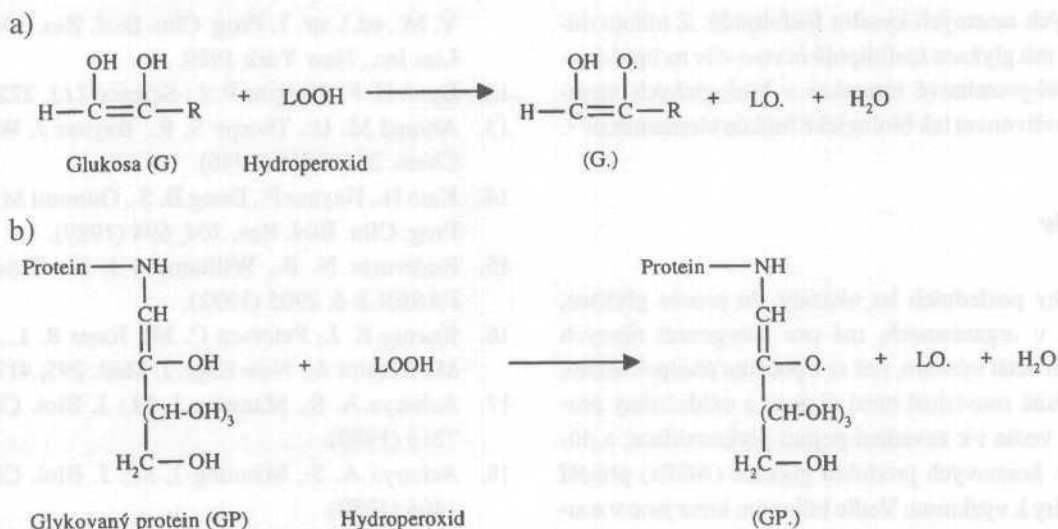
Makrofágy mají schopnost odstraňovat molekuly nebo buňky, které jsou modifikované AGEs^{50,51}. Některé buňky totiž mají specifické receptory rozpoznávající modifikované bílkoviny, a tím zabraňují hromadění AGE-bílkovin. Tyto receptory byly také nalezeny na povrchu endoteliálních buněk⁵¹.

6.6. Chemická degradace koncových produktů glykace

Vasan a kol.⁵² navrhli novou sloučeninu, která je schopna štěpit glukosové můstky způsobující zesíťování bílkovin jak *in vitro* tak *in vivo*. Jedná se o N-fenacylthiazolium bromid (PTB) (obr. 7).

7. Glykace fosfolipidů

Práci zabývající se neenzymovou glykosylací fosfolipidů bylo zatím publikováno velmi málo. Mezi první publikace v této oblasti patří sdělení Bucaly a kol.⁵³. V této



Obr. 9. Iničiace peroxidace lipidů podle Hickse a kol.⁵⁴

práci byla studována reakce glukosy s fosfatidylethanolaminem (PE), fosfolipidem s volnou aminoskupinou (obr. 8). Bylo zjištěno, že reakce glukosy s PE vede ke vzniku AGEs vázaných na lipidy. Tvorbě AGEs byla sledována prostřednictvím změn absorpce, fluorescence a imunochemických vlastností. Glykace lipidů byla doprovázena výraznou oxidací fosfolipidových zbytků nenasycených mastných kyselin. Rychlost tvorby AGEs (detegovaná pomocí imunologické metody ELISA s protilátkami proti proteinovým AGEs) byla srovnatelná s rychlostí oxidace fosfolipidů a růstem intenzity fluorescence. Glykace jiného fosfolipidu, fosfatidylcholinu (PC), nevedla k tvorbě AGEs ani k lipoperoxidaci. PC má totiž aminoskupinu blokovanou třemi methylovými zbytky (obr. 8), takže nemůže reagovat s glukosou.

Glykační pokusy byly prováděny se suspenzí fosfolipidů a s LDL (LDL byly izolovány z krve zdravých a diabetických subjektů). Při glykaci LDL *in vitro* bylo zjištěno, že tvorba lipidových AGEs probíhala rychleji než tvorba apoproteinových AGEs. Souběžně s tím byly lipoproteinové lipidy silně oxidovány. Jestliže byl do inkubační směsi přidán aminoguanidin, došlo k inhibici glykace lipidů i apoproteinů. Zároveň byla inhibována i oxidace lipidů a vznik glyko fluoroforů. Lipidy LDL izolované z diabetiků vykazovaly signifikantně vyšší stupeň oxidace než tomu bylo u LDL zdravých lidí a měli 4x větší obsah lipidových AGEs. Z toho vyplývá, že ke glykaci fosfolipidů dochází *in vivo*. Poměr mezi stupněm oxidace lipidů a množstvím AGEs (tzn. úrovní glykace) byla podobná jako u pokusů prováděných na LDL *in vitro*.

Oxidace lipidové složky LDL hraje ústřední roli v patogenezi aterosklerózy. Nicméně procesy iničující oxidaci lipidů *in vivo* jsou zatím velmi málo známy. Autoři⁵³ předpokládají, že oxidace indukovaná glykací by mohla vysvětlit vznik oxidačních procesů *in vivo*. Otázkou zůstává mechanismus tvorby volných radikálů během glykace. Bucala a kol.⁵³ se domnívají, že k tvorbě volných radikálů dochází zejména v pozdní fázi Maillardovy reakce při vzniku AGEs, který je doprovázen řadou intra- a intermolekulárních přesmyků a oxidačně-redukčních reakcí. Možnost iničiace peroxidace lipidů prostřednictvím autooxidace glukosy považují za druhořadou.

Jiný mechanismus iničiace a propagace peroxidace lipidů glykací byl navržen v práci Hickse a kol.⁵⁴. Autoři předpokládají, že hydroperoxydy lipidů reagují s enol formou glukosy (obr. 9a). Rychlost tohoto procesu je závislá na rychlosti enolizace glukosy. Hydroperoxydy lipidů (které jsou v malém množství normálně přítomny např. v biologických membránách) mohou však reagovat i s enol formou Amadoriho produktu (obr. 9b). To znamená, že Amadoriho produkty se mohou podílet na iničiaci a propagaci peroxidace lipidů.

Další důkaz o glykaci fosfolipidů *in vivo* podal Pamplona a kol.⁵⁵. Pomocí HPLC a GC/MS technik izolovali z membránových fosfolipidů jaterních buněk diabetických krys derivát Amadoriho produktu. Jednalo se konkrétně o tzv. 5-HMF (5-(hydroxymethyl)-2-furfuraldehyd). Tato látka se získá kyselou hydrolyzou Amadoriho produktu.

Z těchto prací vyplývá, že ke glykaci aminofosfolipidů *in vivo* dochází. Tento proces indukuje peroxidaci zbytků

nenasycených mastných kyselin fosfolipidů. Z tohoto důvodu může mít glykace fosfolipidů *in vivo* vliv na lipid-lipidové a lipid-proteinové interakce v biologických membránách a ovlivňovat tak biologické funkce biomembrán⁵⁵.

8. Závěr

Výsledky posledních let ukázaly, že proces glykace, probíhající v organismech, má pro patogenezi různých onemocnění větší význam, než se z počátku předpokládalo. Zejména těsná souvislost mezi glykací a oxidačními procesy, která vedla i k zavedení pojmu glykoxidace, a důležitost tzv. koncových produktů glykace (AGEs) přináší nové podněty k výzkumu. Vedle bílkovin, které jsou v souvislosti s glykací studovány již řadu let, se v poslední době objevily fosfolipidy buněčných membrán jako další možný substrát glykací.

Úkolem tohoto přehledného referátu je ukázat na důležitost glykací bílkovin a biologických membrán, na jejich souvislost s oxidačními procesy, včetně úlohy volných radikálů a na důsledky glykací pro vznik onemocnění. Uvedené možnosti inhibice glykace pak naznačují směry při hledání možné terapie.

LITERATURA

1. Maillard L. C.: *C. R. Seances Acad. Sci.* 154, 66 (1912).
2. Fujimaki M., Namiki M., Kato H. (ed.): *Amino-carbonyl Reactions in Food and Biological Systems*, Dev. Food Sci. 13, 1, Kodansha-Elsevier, Tokyo 1986.
3. Trivelli, L. A., Ranney, H. M., Lai, H.T. N.: *Engl. J. Med.* 284, 353 (1971).
4. Robins S. P., Bailey A. J.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 48, 76 (1972).
5. Koenig R. J., Peterson C. M., Kilo C., Cerami A. N.: *Engl. J. Med.* 25, 230 (1976).
6. Cerami A., Stevens V. J., Monnier V. M.: *Metabolism* 28, 431 (1979). *in Aging, Diabetes and Nutrition* (Baynes J. W., Monnier V. M., ed.), str. 109. Prog. Clin. Biol. Res. 304, Alan R. Liss Inc., New York 1989.
7. Cerami A., Vlassara H., Brownlee M.: *Diabetes Care* 11, 73 (1988).
8. Cohen M. P.: *Diabetes and Protein Glycosylation. Measurement and Biologic Relevance*. Springer Verlag, New York 1986.
9. Monnier V. M., Cerami A.: *Science* 211, 491 (1981).
10. Cerami A.: *J. Am. Geriatr. Soc.* 33, 626 (1985).
11. Monnier V. M., v knize: *The Maillard Reaction in Aging, Diabetes and Nutrition* (Baynes J. W., Monnier V. M., ed.), str. 1. Prog. Clin. Biol. Res. 304, Alan R. Liss Inc., New York 1989.
12. Bunn H. F., Higgins P. J.: *Science* 213, 222 (1981).
13. Ahmed M. U., Thorpe S. R., Baynes J. W.: *J. Biol. Chem.* 261, 8816 (1986).
14. Kato H., Hayase F., Dong B. S., Oimomi M., Baba S.: *Prog. Clin. Biol. Res.* 304, 694 (1989).
15. Ruderman N. B., Williamson J. R., Brownlee M.: *FASEB J.* 6, 2905 (1992).
16. Koenig R. J., Peterson C. M., Jones R. L., Lehrman M., Cerami A.: *New Engl. J. Med.* 295, 417 (1976).
17. Acharya A. S., Manning J. M.: *J. Biol. Chem.* 255, 7218 (1980).
18. Acharya A. S., Manning J. M.: *J. Biol. Chem.* 255, 1406 (1980).
19. Pongor S., Ulrich P. C., Bencsath F. A., Cerami A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2684 (1994).
20. Fujimaki H., Namiki M., Kato H. (ed.): *Amino-Carbonyl Reactions in Food and Biological Systems*. Kodansha Ltd., Tokyo 1986.
21. Eble A. S., Thorpe S. R., Baynes J. W.: *J. Biol. Chem.* 258, 9406 (1983).
22. Neglia C. I., Cohen H. J., Garber A. R., Thorpe S. R., Baynes J. W.: *J. Biol. Chem.* 260, 5406 (1985).
23. Borssok H., Wasteneys H.: *Biochem. J.* 19, 1128 (1925).
24. Stevens V. J., Rouzer C. A., Monnier V. M., Cerami A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2918 (1978).
25. Monnier V. M., Stevens V. J., Cerami A.: *J. Exp. Med.* 50, 1098 (1979).
26. Abraham E. C., Mruthinti S. S., Perry R. E., v knize: *The Maillard Reaction in Aging, Diabetes and Nutrition* (Baynes J. W., Monnier V. M., ed.), str. 123. Prog. Clin. Biol. Res. 304, Alan R. Liss Inc., New York 1989.
27. Cohen M. P., Urdanivia E., Surma M., Yuwu V.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 95, 765 (1980).
28. Silbernagl S., Despopoulos A.: *Atlas fyziologie člověka*, str. 109. Avicenum, Praha 1984.
29. Bailey A. J., Kent M. J. C., in: *The Maillard Reaction and Nutrition* (Baynes J. W., Monnier V. M., ed.), str. 109. Prog. Clin. Biol. Res. 304, Alan R. Liss Inc., New York 1989.
30. Sell D. R., Monnier V. M.: *J. Biol. Chem.* 264, 21597 (1989).
31. Vlassara H., Brownlee M., Cerami A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5190 (1981).
32. Van Boekel M. A. M.: *Mol. Biol. Reports* 15, 57 (1991).
33. Wolff S. P., Crabbe M. J. C., Thornalley P. J.: *Experientia* 40, 244 (1984).

34. Wolff S. P., Dean R. T.: *Biochem. J.* **245**, 243 (1987).
35. Wolff S. P., Dean R. T.: *Biochem. J.* **234**, 399 (1986).
36. Wolff S. P., Dean R. T.: *Biochem. J.* **249**, 617 (1988).
37. Hunt J. V., Wolff S. P.: *Free Rad. Res. Commun.* **12**, 115 (1991).
38. Hunt J. V., Smith C. C. T., Wolff S. P.: *Diabetes* **39**, 1420 (1990).
39. Mullarkey C. J., Edelstein D., Brownlee M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 932 (1990).
40. Sakurai R., Sugioka K., Nakano M.: *Biochim. Biophys. Acta* **1043**, 27 (1990).
41. Ozden I., Deniz G., Tasali E., Ulusarac A., Buyukdevrim S.: *Diabetes Res.* **12**, 123 (1989).
42. Kristal B. S., Yu B. P.: *J. Gerontol.* **47**, 107 (1992).
43. Cilento G.: *Pure Appl. Chem.* **56**, 1179 (1984).
44. Foote C. S.: *Photochem. Photobiol.* **54**, 659 (1991).
45. Medeiros M. H. G., Bechara E. J. H.: *Archiv. Biochem. Biophys.* **248**, 435 (1986).
46. Monnier V. M., Sell D. R., Nagaraj R. H., Miyata, S.: *Gerontology* **37**, 152 (1991).
47. Brownlee M., Vlassara H., Kooney T., Ulrich P., Cerami A.: *Science* **232**, 1629 (1986).
48. Blakytyn R., Harding J. J.: *Exp. Eye Res.* **54**, 509 (1992).
49. Shibamoto, T., in: *The Maillard Reaction in Aging, Diabetes and Nutrition* (Baynes J. W., Monnier V. M., ed.), str. 359. *Prog. Clin. Biol. Res.* **304**, Alan R. Liss Inc., New York 1989.
50. Vlassara H., Brownlee M., Cerami A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 5588 (1984).
51. Vlassara H., Brownlee M., Manogue K., Dinarello C., Pasagian A.: *Science* **240**, 1546 (1988).
52. Vasan S., Zhang X., Zhang X., Kapurniotu A., Bernhagen I., Teichberg S., Basgen J., Wagle D., Shih D., Terlecky I., Bucala R., Cerami A., Egan J., Ulrich P.: *Nature* **382**, 275 (1996).
53. Bucala R., Makita Z., Koschinsky T., Cerami A., Vlassara H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6434 (1993).
54. Hicks M., Delbridge L., Yue D. K., Reeve T. S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **151**, 649 (1988).
55. Pamplona R., Bellmunt M. J., Portero M., Riba D., *Prat I: Life Sci.* **57**, 873 (1995).

T. Obšil and Z. Pavliček (*Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague*): **Glycation of Proteins and Phospholipids: Maillard Reaction in vivo**

Glycation of proteins is extensively studied in living processes, especially with respect to various pathological states. Recently, the following new features in glycation reaction were discovered: A close connection between glycation and oxidation process, important role of free radicals, and importance of phospholipids as glycation substrates. The review summarizes the current knowledge of glycations in living organism, including various types of their inhibition and thus the potential therapy.